



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

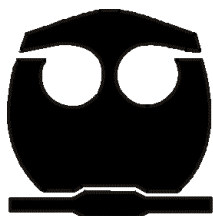
**“Selección de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*
con mayor eficiencia de fermentación de fructosa en
mostos con mezclas de azúcares”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

PRESENTA:
SELENE SEGURA MOCTEZUMA

TUTOR:
DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por apoyarme durante mis estudios mediante el convenio de beca 221022.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme nuevamente el mejor lugar para continuar mi formación profesional.

Al Dr. Francisco Ruíz Terán por permitirme trabajar en un ambiente de confianza, por su dirección y apoyo.

A la Dra. Hilda Calderón por haberme apoyado durante las determinaciones con CG y HPLC mostrando siempre la mejor disponibilidad. Gracias por haberme permitido aprender más sobre HPLC y por la confianza otorgada.

A la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch y al Dr. Antonio Peña Díaz, que como miembros del Comité Tutoral, me ayudaron con sus valiosas observaciones y sugerencias a lo largo de la Maestría.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y las importantes aportaciones que permitieron mejorar el contenido del mismo.

Dedicatoria

*A mis queridos padres:
sin ustedes nada de esto sería posible.*

JURADO ASIGNADO

Presidente Dr. Antonio Peña Díaz

Vocal Dr. Guillermo Aguilar
Osorio

Secretario Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Suplente Dra. Sobeida Sánchez
Nieto

Suplente Dr. Salvador Uribe Carvajal

Sitio donde se desarrolló el trabajo:

Laboratorio 321, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Asesor: Dr. Francisco Ruíz Terán

Sustentante: Selene Segura Moctezuma

INDICE	Página
Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1 <i>Agave tequilana</i> Weber y el tequila	5
2.2 Proceso de elaboración del tequila	5
2.2.1 Jima de la planta de agave	5
2.2.2 Cocción de los tallos de agave	5
2.2.3 Molienda de los tallos de agave	6
2.2.4 Fermentación de los mostos	6
2.2.5 Destilación de los mostos fermentados	6
2.2.6 Maduración del destilado de tequila	7
2.3 Tipos de tequila	7
2.4 Fermentación alcohólica y el uso de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
2.4.1 Efectos del uso de mezclas de azúcares	9
2.5 Metabolismo de carbohidratos	10
2.5.1 Utilización de la sacarosa	10
2.5.1.1 Hidrólisis de la sacarosa	10
2.5.1.2 Transporte de la sacarosa	11
2.5.2 Utilización de fructosa y glucosa	12
2.5.2.1 Transporte de hexosas	13
2.5.2.2 Fosforilación de hexosas	14
2.6 Selección de cepas eficientes e integración de cultivos mixtos	15
3. Justificación	18
4. Hipótesis	20
5. Objetivos	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos particulares	20
6. Materiales y métodos	21
6.1 Material biológico	22
6.2 Medios de cultivo	22
6.3 Preparación del inóculo para las fermentaciones	22

6.4 Fermentaciones.....	23
6.4.1 Crecimiento celular.....	23
6.4.2 Producción de etanol.....	23
6.4.3 Consumo de fructosa, glucosa y sacarosa	24
6.4.4 Adaptación del consumo de azúcares a ecuaciones matemáticas.....	24
6.4.5 Determinación de actividad enzimática de la invertasa	25
6.5 Extracción de DNA	26
6.5.1 Amplificación del alelo HXT3.....	26
7. Resultados y discusión	28
7.1 Fermentaciones en medio con fructosa	28
7.2 Fermentaciones en medio con sacarosa	32
7.3 Fermentaciones en medio con mezcla de azúcares	37
7.4 Fermentaciones en medio con mosto de agave y sacarosa	47
7.5 Amplificación del gen hxt3 y análisis de la secuencia.....	54
7.6 Discusión general.....	59
8. Conclusiones.....	65
9. Bibliografía	66
ANEXO A. Modelos de regresión no lineal	72
ANEXO B. Alineamiento múltiple de las secuencias de hxt3.....	74

RESUMEN

La utilización de sustratos constituidos por mezclas de fructosa, sacarosa y glucosa en fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae* conduce a que estas sean lentas o incompletas debido a la utilización preferencial de la glucosa y a la represión catabólica de otros azúcares. Esto plantea la necesidad de contar con cepas eficientes para la fermentación de mezclas con fructosa y sacarosa.

Un estudio reciente sugiere que la presencia de diez mutaciones en el gen que codifica para el transportador de hexosas Hxt3 mejora la velocidad de consumo de fructosa (Guillaume *et al.* 2007). Por otro parte, se ha reportado que el transporte facilitado de sacarosa, seguido por la hidrólisis intracelular del disacárido, mejora la velocidad de consumo de este azúcar (Stambuk *et al.*, 2000).

Con el propósito de seleccionar cepas eficientes para la fermentación de fructosa en mostos con mezclas de azúcares, se evaluaron cinco cepas de *S. cerevisiae* aisladas de fermentaciones de tequila (T3 y T4), mezcal (M1 y M2) y caña de azúcar (TC) en la fermentación de medios de cultivo con fructosa o sacarosa como fuente de carbono. Se evaluó la velocidad específica de crecimiento, la velocidad de consumo de la fuente de carbono, los rendimientos en la producción de biomasa y etanol, la productividad de etanol y la actividad enzimática de la invertasa intracelular y extracelular. La caracterización fisiológica de las cepas permitió la selección de la cepa M2 como la más eficiente para la utilización de fructosa, la cepa T3 con los mejores rendimientos en la producción de etanol en medios con fructosa y la cepa TC como la más eficiente para la fermentación de sacarosa.

Posteriormente, las cepas seleccionadas (M2, TC y T3) fueron evaluadas en medios con mezclas de azúcares (fructosa: sacarosa 51:49) o mosto de agave y sacarosa (51:49), tanto de manera individual como en asociación. De esta manera se integraron tres cultivos mixtos: M2+T3, M2+TC y T3+TC.

De la caracterización fisiológica de las cepas y cultivos mixtos en el medio con mezcla de azúcares se encontró que las cepas seleccionadas por su eficiencia para la utilización de fructosa o sacarosa (cepas M2 y TC) no presentaron tal comportamiento en el medio con mezcla de azúcares y su asociación sólo fue eficiente para la utilización de sacarosa. Los mejores rendimientos de etanol y bajos rendimientos de biomasa se obtuvieron con la cepa T3.

En las fermentaciones con mosto de agave y sacarosa la velocidad específica de crecimiento y los rendimientos de etanol se vieron afectados negativamente para las cepas y los cultivos mixtos. No obstante, el efecto fue más drástico para las cepas puras que para los cultivos mixtos.

La evaluación de la actividad enzimática de la invertasa intracelular y extracelular de las cepas y los cultivos mixtos permitió determinar que no existe una relación entre los niveles de actividad enzimática y la velocidad de utilización de la sacarosa.

De la secuenciación del gen *hxt3* de las diferentes cepas se encontró que aunque existen mutaciones, estas no coinciden con las reportadas para el gen *hxt3* de la cepa que presentaba una utilización preferencial de fructosa.

1. INTRODUCCIÓN

En México existe una variedad de bebidas destiladas de agave como el bacanora, el sotol, el tequila, el mezcal. Entre estas bebidas destaca el tequila, a la cual se le ha otorgado el reconocimiento de “Denominación de Origen”, lo que la posiciona en un estatus como al del cognac y la champaña, bebidas que reciben su nombre de la región donde se producen.

El tequila es una bebida alcohólica resultante del proceso de fermentación y destilación de extractos del tallo de *Agave tequilana* Weber variedad azul, comúnmente llamada agave azul. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994, hay dos categorías básicas de tequila: uno llamado Tequila 100% agave, elaborado exclusivamente de mostos de agave azul y otro simplemente denominado Tequila. Este último resulta del uso de 51% de mostos de agave azul y 49% de otro tipo de azúcares. En ambos tipos de tequila el principal azúcar fermentable es la fructosa, por lo que la adición de otros azúcares da por resultado mezclas de fructosa, sacarosa y glucosa. Este tipo de mezclas de azúcares repercute principalmente en la fermentación, la cual es una de las etapas más importantes del proceso de elaboración del tequila.

La especie de levadura predominante durante las fermentaciones alcohólicas es *Saccharomyces cerevisiae*, que es capaz de crecer en diversas fuentes de carbono, pero utiliza preferentemente a la glucosa y muestra la mayor velocidad de crecimiento en este sustrato. El uso de mezclas de azúcares (mezclas de glucosa y fructosa, mezclas de sacarosa, glucosa y fructosa) en las que predomina la fructosa, obliga a las levaduras a utilizar este azúcar menos preferido, lo que resulta en fermentaciones lentas o incompletas.

En el proceso industrial de elaboración del tequila se ha observado que el uso de una mezcla de mostos de agave y sacarosa como sustrato de fermentación conduce a fermentaciones más prolongadas que aquellas en las cuales el sustrato está constituido exclusivamente por mostos de agave. Este tipo de problemas podrían superarse si se realizara una selección de cepas de *S. cerevisiae* con características favorables para la fermentación de mezclas de

azúcares en las que la glucosa no es el azúcar predominante. Cepas con tales características podrían aislarse a partir de mostos de agave, que se caracterizan por presentar como azúcar principal a la fructosa, lo que podría permitir a las cepas fermentar con mayor eficiencia mezclas de azúcares con fructosa como azúcar principal, evitando así fermentaciones largas.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Agave tequilana* Weber y el tequila

El tequila es una bebida destilada alcohólica que se elabora a partir del agave. Los agaves se encuentran desde el sur de Canadá hasta la parte norte de Sudamérica; sin embargo, México y en particular, el Estado de Jalisco, posee la mayor biodiversidad (75% de las variedades de agave) (Romero, 2007).

Distintos agaves se utilizan para producir bebidas alcohólicas, pero la producción de tequila está restringida por las normas al uso de la variedad *Agave tequilana* Weber de áreas geográficas bien definidas (Jalisco, y algunos municipios de Michoacán, Nayarit, Guanajuato y Tamaulipas) (Romero, 2007).

A. tequilana Weber es la única especie empleada para la elaboración de tequila debido a su elevado contenido de inulina. El tallo de esta planta es rico en fructanos, polímeros u oligómeros compuestos principalmente por unidades de fructosa enlazadas a moléculas de sacarosa, las cuales son fácilmente hidrolizadas por tratamiento térmico (Waleckx *et al*, 2008).

2.2. Proceso de elaboración del tequila

El proceso de elaboración del tequila comprende seis etapas básicas: jima de la planta de agave, cocción de los tallos de agave, molienda de los tallos de agave, fermentación de los mostos, destilación de los mostos fermentados y una etapa opcional: la maduración.

2.2.1 Jima de la planta de agave

Cuando los agaves alcanzan la madurez fisiológica (después de 6 a 7 años de vida) se procede a la jima, una técnica que consiste en cortar las hojas de la planta al ras de la base para dejar al descubierto el tallo de la planta.

2.2.2. Cocción de los tallos de agave

Los tallos obtenidos se someten a un proceso de cocción para hidrolizar los fructanos y liberar principalmente fructosa como azúcar fermentable. Este proceso puede realizarse en hornos de mampostería o en autoclave; la diferencia radica en

que en los primeros, se emplean hasta 36 horas de cocimiento mientras que el uso de autoclaves reduce el tiempo de cocción a 8 horas.

2.2.3 Molienda de los tallos de agave

Una vez que los tallos han sido cocidos, se procede a la molienda en molinos mecánicos, seguida de la extracción del jugo y recuperación de sus mieles (mosto fresco) con la consecuente eliminación de las fibras. Como resultado de este proceso se obtiene un mosto con aproximadamente 12% de azúcares.

2.2.4 Fermentación de los mostos

Para la fermentación el mosto fresco recolectado puede mezclarse con agua y otros nutrientes. Durante la fermentación participan levaduras (tanto no-*Saccharomyces* como *Saccharomyces*) y bacterias lácticas (Lappe *et al.*, 2008). En esta etapa los azúcares del mosto son transformados en CO₂, etanol y otros compuestos congénicos como alcoholes, ácidos orgánicos, ésteres, entre otros. El tiempo de la fermentación varía con la temperatura ambiental y ésta a su vez cambia en cada época del año. Durante las bajas temperaturas de invierno la fermentación puede prolongarse más de 24 horas.

2.2.5 Destilación de los mostos fermentados

El producto de la fermentación se somete a dos destilaciones sucesivas. En la primera se obtienen tres fracciones: cabeza, corazón y cola. La primera contiene alcoholes tóxicos, en tanto que la última contiene agua y un poco de alcohol. Lo más importante de este proceso es obtener la segunda fracción (el corazón, cuya graduación alcohólica es de 30° en promedio).

La fracción obtenida de la primera destilación se somete a una segunda destilación denominada “rectificación” que produce tres nuevas fracciones. La primera fracción tiene 55° de alcohol, por lo que debe agregársele agua desmineralizada para reducir su poder alcohólico y situarlo entre los 35° y los 46° por volumen, obteniéndose de esta manera el tequila blanco.

2.2.6. Maduración del tequila destilado

Para modificar las características sensoriales del tequila blanco, puede someterse a un proceso de maduración en barriles de roble. Cuando la barrica se fabrica se le da un tostado, que puede ser ligero, medio o fuerte. El roble posee un compuesto llamado vainillina, que se libera en proporción con el tostado y permite que el tequila tome color al estar en contacto con la barrica por lixiviación.

El tiempo de reposo de un tequila se define en función del perfil que se le dará: tequila reposado (al menos 2 meses de maduración), añejo (al menos 1 año) y extra añejo (al menos 3 años).

2.3. Tipos de tequila

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994 el tequila puede clasificarse en dos categorías y cuatro clases.

La clasificación por clases se basa principalmente en si el tequila fue o no sometido a un proceso de maduración y el tiempo que permaneció en reposo. Bajo estos criterios es posible distinguir cuatro clases: blanco, joven, reposado y añejo. Como ya había sido mencionado, el tequila blanco no se somete a maduración en barricas, en tanto que el reposado y el añejo son sometidos a tiempos de reposo de al menos 2 meses y 1 año, respectivamente. Para el caso del tequila joven, se trata de una clase de tequila blanco adicionado con color caramelo, extracto de roble, glicerina o jarabe a base de azúcar para suavizar su sabor.

La clasificación por categoría se basa en el tipo de azúcares utilizados en la elaboración de la bebida. De esta manera, es posible distinguir dos categorías:

1. Tequila 100% agave. Contiene únicamente azúcares provenientes del agave.
2. Tequila. Contiene 51% de azúcares provenientes del agave y 49% provenientes de otros azúcares (piloncillo, mascabado, etc).

Las diferencias en la composición del sustrato a partir del cual se elaboran las dos categorías de tequila provocan que el desarrollo de la fermentación por levaduras para su elaboración también difiera.

2.4. Fermentación alcohólica y el uso de *Saccharomyces cerevisiae*

Durante la fermentación de mostos para la producción de tequila está presente una microbiota integrada por bacterias lácticas y levaduras, las cuales se encuentran en poblaciones mixtas o sustituyendo unas a otras (Lappe *et al.*, 2008). Sin embargo, *S. cerevisiae* es la levadura predominante durante las fermentaciones alcohólicas y la responsable de producir etanol y de aportar la mayoría de las características sensoriales al producto terminado (Fleet, 1990). Es por ello que la utilización de cepas de *S. cerevisiae* como iniciadores para la inoculación de mostos en la fermentación alcohólica, es una práctica muy común en la industria tequilera y en distintos procesos industriales (Casas, 2006).

En muchos de los procesos comerciales de producción de bebidas alcohólicas, el medio de fermentación es una mezcla compleja de diferentes azúcares. En el caso del tequila, de acuerdo con un estudio realizado por Waleckx y colaboradores (2008), en el cual se caracterizó la eficiencia de hidrólisis de los fructanos de los mostos de agave azul durante el cocimiento, se encontró que la fructosa representa más del 80% del total de carbohidratos. Esto significa que el principal azúcar presente durante la fermentación de los mostos de agave en la producción de “Tequila 100%” es la fructosa. La adición de otros azúcares al mosto de agave para producir “Tequila” da por resultado mezclas de azúcares que contienen principalmente fructosa, sacarosa y glucosa.

Las fuentes de carbono preferidas por la mayoría de las especies de levadura son las hexosas: glucosa, fructosa y manosa. *S. cerevisiae* puede crecer en diversas fuentes de carbono, pero se adapta mejor a la utilización de glucosa y muestra la mayor velocidad de crecimiento con este sustrato. En un contexto industrial la utilización de mezclas de azúcares puede desencadenar varios efectos negativos para las levaduras y afectar a su vez al producto final.

2.4.1. Efectos del uso de mezclas de azúcares

La presencia de glucosa y sacarosa en una mezcla de azúcares da como resultado la activación de dos rutas de señalización:

- Represión catabólica por glucosa. Esta ruta inactiva diversos genes involucrados en la toma y metabolismo de carbohidratos menos preferidos, así como genes involucrados en la gluconeogénesis y la respiración (Verstrepen *et al.*, 2004).
- Ruta Ras/AMPC/PKA. Controla la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo, proliferación y resistencia a estrés en respuesta a la glucosa. Entre estos genes se encuentran los que codifican para proteínas del choque térmico, como HSP12 y HSP104. Además, una alta actividad de la proteína cinasa A (PKA) causa la represión de TPS1 y TPS2, genes que codifican para la síntesis de trehalosa, la cual tiene un papel importante en la resistencia al estrés celular, pues protege a la membrana contra la desecación y la desnaturalización proteica (Verstrepen *et al.*, 2004).

De manera general la activación de estas dos rutas tiene tres consecuencias principales sobre las levaduras:

1. Represión de la respiración
2. Disminución en el consumo de otros carbohidratos (fructosa, manosa, etc)
3. Pérdida de resistencia celular al estrés

De entre estos tres efectos, la represión de la respiración no es considerada un efecto negativo para la elaboración de bebidas alcohólicas, pues la fermentación permite la producción de etanol. Sin embargo, la disminución en el consumo de otros carbohidratos y la pérdida de resistencia al estrés sí representan efectos negativos para la producción de bebidas alcohólicas.

La reducción en el consumo de otros azúcares, debida a la inactivación de diversos genes involucrados en la toma y el metabolismo de carbohidratos menos preferidos, afecta negativamente la velocidad de fermentación. Por otra parte, durante los procesos industriales, las levaduras enfrentan diversas condiciones

severas de estrés, como cambios marcados en los niveles de O₂, temperatura, osmolaridad, pH, altas concentraciones de etanol y una deficiencia de nutrientes. La incapacidad de las levaduras de responder a condiciones desfavorables conduce a fermentaciones lentas y autólisis celular; esto último promueve el desarrollo de sabores desagradables en bebidas como el vino (Belinchón *et al.* 2007; Guillaume *et al.*, 2007; Verstrepen *et al.*, 2004)

El uso de otros azúcares como la fructosa o maltosa activa en menor medida que la glucosa y la sacarosa, las dos rutas que producen los efectos mencionados. Todos estos azúcares (glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa) son metabolizados a través de la misma ruta bioquímica: la glucólisis. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a su transporte a través de la membrana y la acción enzimática a la que son sometidos (hidrólisis de los disacáridos, fosforilación de los monosacáridos) antes de que continuen una vía común, que permitirían explicar el comportamiento de la fermentación por las levaduras, de acuerdo con el sustrato utilizado. Para el caso del tequila resulta importante centrar nuestra atención en el metabolismo de la fructosa, sacarosa y glucosa.

2.5. Metabolismo de carbohidratos

2.5.1. Utilización de la sacarosa

La sacarosa es un disacárido que puede ser utilizado como fuente de carbono por *S. cerevisiae*. Se sabe que existen dos mecanismos por los cuales esta levadura puede utilizar la sacarosa:

1. Hidrólisis de la molécula a fructosa y glucosa mediante una invertasa extracelular, seguida del transporte de los monosacáridos a través de los acarreadores de hexosas.
2. Transporte de la sacarosa a través de la membrana celular y posterior hidrólisis mediante una invertasa intracelular.

2.5.1.1. Hidrólisis de la sacarosa

La invertasa cataliza la hidrólisis de la sacarosa en fructosa y glucosa. Se conocen seis genes en el genoma de *S. cerevisiae* que codifican para la invertasa: SUC1 a

SUC-5 y SUC-7. Cada gen codifica para una forma intracelular y una extracelular de la enzima. Una cepa específica puede tener uno o varios genes SUC funcionales. Aunque las propiedades catalíticas de las enzimas codificadas por los diferentes genes son muy similares difieren en el nivel de expresión, dependiendo del hábitat de la cepa y de su genotipo (Del Castillo *et al.* 1992). Los genes SUC generan dos mRNAs diferentes: un transcrito más largo que codifica una invertasa con una señal requerida para su excreción fuera de la célula, y un transcrito más corto que carece de dicha señal y por tanto codifica para una invertasa intracelular (Carlson *et al.*, 1982).

El gen SUC2 ha sido el más estudiado: se sabe que su expresión está regulada por mecanismos mediados por glucosa, la cual modifica la capacidad de diversas proteínas reguladoras de enlazarse a la región del promotor de SUC2. En presencia de grandes cantidades de glucosa en el medio un complejo integrado por Mig1, Ssn6, Tup1 y nucleosomas, se posiciona en la región del promotor de SUC2, reprimiendo su transcripción, en tanto que en presencia de una baja concentración de glucosa y fuentes de carbono no fermentables, el complejo se disocia del promotor (Türkel, 2004).

En un estudio realizado por Belinchón y colaboradores (2007) se evaluó el efecto de la eliminación de las proteínas sensoras de glucosa (Snf3, Rgt2 y Gpr1) sobre la inducción de SUC2 por glucosa. Se encontró que las proteínas sensoras son necesarias para una completa inducción de SUC2 a bajas concentraciones de glucosa (0.05%), ya que la unión de la glucosa a las proteínas sensoras activa una ruta de señalización que conduce a la separación del represor Rgt1 del promotor de SUC2.

2.5.1.2 Transporte de la sacarosa

En un estudio realizado por Stambuk y colaboradores (1999), se encontró evidencia de la existencia de dos sistemas de transporte para la sacarosa, con diferente cinética. Uno de alta afinidad ($K_m = 7$ mM) y otro de baja afinidad ($K_m = 100$ mM). El gen AGT1 codifica para el transportador de alta afinidad, en tanto que la maltosa permeasa corresponde al de baja afinidad. Ambas permeasas se caracterizan por realizar un transporte activo, en simporte con un protón.

La maltosa permeasa es un acarreador común para la maltosa y la sacarosa. De acuerdo con un estudio en el que se determinó la cinética de utilización de mezclas de sacarosa y maltosa, se detectó una inhibición competitiva en la toma de maltosa por la presencia de sacarosa (Mwesigye *et al.*, 1996).

La permeasa codificada por el gen AGT1 transporta activamente maltosa, sacarosa y otros α -glucósidos. Su expresión se induce por maltosa a través de genes reguladores de MAL, y permite incrementar la velocidad específica de crecimiento de cepas que crecen en sacarosa (Stambuk *et al.* 2000).

2.5.2. Utilización de fructosa y glucosa

La ruta bioquímica fundamental de la fermentación de las hexosas es la glucólisis. El primer paso para la utilización de la fructosa y la glucosa es su transporte a través de la membrana. Una vez internalizadas, las hexosas son fosforiladas. Posteriormente se cataliza la isomerización de la glucosa 6-fosfato a fructosa 6-fosfato por la fosfohexosaisomerasa, y a partir de este punto el metabolismo de la glucosa y la fructosa es el mismo (Figura 1).

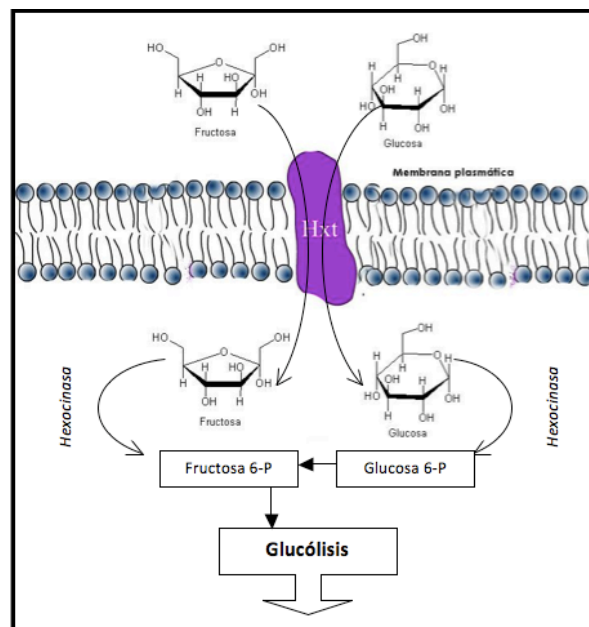


Figura 1. Toma extracelular y fosforilación de glucosa y fructosa por *S. cerevisiae* para su posterior incorporación a la vía glucolítica

De esta manera, sólo hay dos pasos en la ruta de fermentación en los cuales pueden existir diferencias que permitan explicar el consumo preferencial de glucosa sobre el de la fructosa: el transporte a través de la membrana y la fosforilación.

2.5.2.1. Transporte de hexosas a través de la membrana

El primer paso obligatorio para la utilización de las hexosas es el transporte a través de la membrana plasmática. En las levaduras, la toma de hexosas está mediada por una gran familia de proteínas transportadoras. En *S. cerevisiae* se han identificado los genes de 20 diferentes transportadores de hexosas. Seis de estas proteínas transmembranales median la toma de glucosa, fructosa y manosa para el crecimiento (Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6 y Hxt7). Otros dos catalizan únicamente el transporte de pequeñas cantidades de estos azúcares (Hxt8 y Hxt10), una proteína es transportadora de galactosa pero también es capaz de transportar glucosa (Gal2), dos transportadores están involucrados en el proceso de resistencia a fármacos (Hxt9 y Hxt11) y la función del resto de los transportadores aún no se conoce (Boles & Hollenberg, 1997).

Existe poca información acerca de la estructura tridimensional de los transportadores de hexosas no obstante, con base a sus secuencias de aminoácidos es probable que presenten de 11 a 12 cruces transmembranales (Kruckeberg, 1996).

El análisis del efecto de la inactivación de los genes HXT1-7 ha mostrado que los acarreadores de glucosa Hxt1-7 son los principales involucrados en la toma de hexosas, ya que su ausencia impide a las cepas transportarlas.

Los transportadores de hexosas exhiben afinidades diferentes por sus sustratos. Hxt1 y Hxt3 son transportadores de baja afinidad (Km para glucosa de 50 a 100 mM). Hxt1 se inducen a altas concentraciones de glucosa y la inducción de Hxt3 es independiente de la concentración de glucosa. Hxt4 y Hxt5 son transportadores de afinidad moderada en tanto que Hxt2, Hxt6 y Hxt7 son transportadores de alta afinidad (Km por glucosa de 1 a 4 mM) (Boles & Hollenberg, 1997).

La expresión de los genes que codifican para estos transportadores está controlada por las proteínas sensoras de glucosa (Snf3 y Rgt2), las cuales detectan la disponibilidad de las fuentes de carbono. De esta manera, la expresión de los distintos acarreadores está modulada por la concentración externa de glucosa, y por tanto se ve modificada en el transcurso de la fermentación (Rolland *et al.*, 2002).

En un estudio reciente se analizó el patrón de expresión de los transportadores Hxt1-7 durante la fermentación alcohólica del vino, y se encontró que Hxt2 tiene una función importante durante la fase de retardo (lag), Hxt1 sólo se expresa al inicio de la fermentación, Hxt3 se expresa al inicio de la fermentación, su expresión se maximiza al inicio de la fase estacionaria y disminuye lentamente durante el transcurso de esta fase. Por otra parte, los acarreadores de alta afinidad Hxt6 y Hxt7 se inducen al inicio de la fase estacionaria y mantienen su actividad durante ella (Pérez *et al.* 2005).

Recientemente se aisló un alelo hxt3 con diez mutaciones a partir de una cepa de levadura comercial con alta capacidad de utilización de fructosa. Este alelo mejoró significativamente la utilización de fructosa en una cepa que no expresaba ninguno de los genes que codifican para los transportadores de hexosas (Hxt1-Hxt7). Se detectaron características cinéticas similares en el transporte de glucosa y fructosa del transportador mutado con respecto al transportador de una cepa silvestre pero su sobreexpresión produjo un mejor consumo de fructosa y disminuyó el tiempo de la fermentación (Guillaume *et al.* 2007).

2.5.2.2. Fosforilación de hexosas

Una vez que los azúcares son importados dentro de la célula, éstos son fosforilados por una de las tres hexocinasas Hxk1 (hexocinasa 1), Hxk2 (hexocinasa 2) y Glk1 (glucocinasa 1), las cuales difieren en su afinidad por la glucosa y la fructosa.

La glucocinasa Glk1 sólo fosforila glucosa en tanto que las hexocinasas Hxk1 y Hxk2 fosforilan tanto a la glucosa como a la fructosa, pero tienen mayor afinidad por glucosa que por fructosa. Hxk1 muestra mayor afinidad por glucosa que la

enzima Hxk2. Por otra parte, Hxk1 tiene una V_{max} tres veces mayor con fructosa que con glucosa y Hxk2 tiene una V_{max} ligeramente mayor con glucosa que con fructosa. Sin embargo, las concentraciones celulares de estos dos azúcares suelen ser menores a los valores de K_m , por lo que no se alcanza la V_{max} , lo cual concuerda con una detección de mayor velocidad en el consumo de glucosa sobre fructosa a pesar de que la V_{max} con fructosa de la Hxk1 es superior (Reifenberger *et al.*, 1997).

En un estudio reciente se determinó la actividad total de fosforilación de las hexocinasas y los parámetros cinéticos en extractos celulares de cepas de *S. cerevisiae* cultivadas en glucosa, fructosa y una mezcla de ambas. Estas cepas se modificaron para expresar únicamente una hexocinasa (Hxk1 ó Hxk2). Se encontró que sólo la sobreexpresión de HXK1 aumentaba el consumo de fructosa más que el de glucosa pero que la actividad total de fosforilación de la hexocinasa no está relacionada con la diferencia en la velocidad de consumo de glucosa y fructosa (Berthless *et al.*, 2008).

2.6. Selección de cepas eficientes e integración de cultivos mixtos para la elaboración de Tequila

El sustrato empleado en la elaboración de “Tequila” comprende el uso de mostos de agave y sacarosa. Como ya se mencionó, la sacarosa puede ser hidrolizada a fructosa y glucosa por una invertasa extracelular o bien ser transportada intacta mediante la maltosa permeasa o la permeasa codificada por AGT1 y posteriormente ser hidrolizada. En ambos casos el azúcar predominante es la fructosa (un azúcar menos preferido por *S. cerevisiae*), pero en el caso de la hidrólisis extracelular de sacarosa se libera glucosa, capaz de activar la ruta de represión catabólica y la ruta Ras/AMPC/PKA y desencadenar efectos negativos durante la fermentación.

Dado que los problemas observados durante la producción de “Tequila” son atribuidos a la presencia de mezclas de azúcares, es posible que el uso de cepas eficientes para la fermentación de fructosa y sacarosa evite tales problemas. Por otro parte, la utilización de cultivos mixtos para la fermentación de sustratos con mezclas de azúcares, ha mostrado tener un alto potencial biotecnológico en

procesos como la producción de alimentos fermentados, bebidas alcohólicas, bioetanol y en la biorremediación (Reeves *et al.*, 2003). En este contexto, el uso de cultivos mixtos ha partido de la selección de cepas con determinadas características, que al ser utilizadas en asociación permiten mejorar la producción de algún metabolito de interés o bien hacer más eficiente el consumo de los azúcares presentes en el sustrato. Tal es el caso de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos, en los cuales hay mezclas de hexosas y pentosas. En este tipo de procesos, se ha evaluado la utilización de cultivos mixtos integrados por cepas eficientes para la fermentación de cada tipo de azúcar (*S. cerevisiae* para el consumo de hexosas y *Pichia stipitis* para el consumo de pentosas), promoviendo así el consumo simultáneo y la conversión total de los azúcares en etanol (Grootjen *et al.*, 1990).

De manera similar, en diversos estudios se ha evaluado la utilización de cultivos mixtos para mejorar la calidad de los vinos. Por ejemplo, para modular el perfil aromático a través de la producción de ésteres se han evaluado cultivos mixtos de *Hanseniaspora osmophila* y *S. cerevisiae*, lo que ha permitido obtener vinos con un fuerte aroma frutal (Viana *et al.*, 2009). La integración de cultivos mixtos con *Candida stellata* y *S. cerevisiae* ha mejorado la producción de glicerol en vinos (Soden *et al.*, 2000), en tanto que los cultivos mixtos de *Debaryomyces vanriji* han permitido incrementar la producción de geraniol (García *et al.*, 2002).

De esta manera, la integración de cultivos mixtos con cepas de *S. cerevisiae* eficientes para el consumo de fructosa o sacarosa, podría ser una alternativa interesante respecto al uso individual de cepas durante las fermentaciones para la producción de “Tequila”. En este contexto, sería de gran utilidad contar con criterios que permitieran realizar la selección de cepas eficientes para la fermentación de fructosa o sacarosa.

Para el caso de la utilización de fructosa, las bases moleculares que determinan la utilización preferencial de la glucosa sobre la fructosa no han sido elucidadas completamente. No obstante, el transporte de hexosas es uno de los pasos determinantes y un estudio reciente sugiere que la presencia de diez mutaciones en el alelo *hxt3* mejora la utilización de fructosa en cepas que expresan este alelo

(Guillaume *et al.*, 2007). En cuanto a la utilización de sacarosa, está reportado que su transporte activo seguido por su hidrólisis intracelular por la invertasa mejoró la velocidad específica de crecimiento de cepas cultivadas en medios con sacarosa (Stambuk *et al.*, 2000).

Partiendo de estos antecedentes, es posible que las mutaciones en el alelo *hxt3* puedan utilizarse como un criterio de selección de cepas con utilización preferencial de la fructosa. En tanto que los niveles de actividad enzimática de la invertasa intracelular podrían emplearse como criterio de selección de cepas eficientes para la fermentación de sacarosa.

3. JUSTIFICACIÓN

La especie de levadura predominante durante las fermentaciones alcohólicas para la producción de diversas bebidas es *S. cerevisiae*. Esta levadura es la responsable de producir etanol y de aportar la mayoría de las características sensoriales al producto terminado (Fleet, 1990).

En muchos procesos comerciales, el medio de fermentación es una mezcla compleja de diferentes azúcares fermentables como: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa (Verstrepen, 2004). Bajo estas condiciones las fermentaciones son lentas o incompletas.

Diversos estudios relacionados con procesos de fermentación con mezclas de azúcares (fructosa-xilosa, glucosa-fructosa, entre otros), demuestran la utilidad de emplear cultivos mixtos para mejorar la velocidad de consumo de los azúcares o bien incrementar la producción de determinado metabolito, lo cual está en función de las características de las cepas que constituyen el cultivo mixto (Harrison & Wren, 1976; Grootjen *et al.*, 1990; Ingram *et al.*, 1999; Reeves *et al.*, 2003). No obstante, no existen estudios sobre el comportamiento de cultivos mixtos eficientes para la fermentación de mostos con mezclas de fructosa-sacarosa, que posiblemente evitarían fermentaciones prolongadas.

La integración de un cultivo mixto eficiente para la fermentación de fructosa y sacarosa plantea a su vez la necesidad de contar con cepas eficientes para el consumo de cada azúcar. Para ello sería de gran utilidad tener criterios de selección de cepas eficientes para la fermentación de fructosa o sacarosa. Dado que en un estudio se sugiere que la presencia de diez mutaciones en el gen del transportador de hexosas Hxt3 mejora la capacidad de utilización de fructosa es posible que tales mutaciones puedan servir como criterio de selección de cepas eficientes para la fermentación de fructosa. Por otra parte, ha sido reportado que el transporte activo de sacarosa seguido por la hidrólisis intracelular del disacárido mejora la velocidad de utilización de este azúcar, no obstante no existe información relacionada con los niveles de actividad de las invertasas.

En este trabajo se plantea caracterizar las propiedades de fermentación de fructosa y sacarosa (velocidad de crecimiento, consumo del sustrato y rendimientos de etanol y biomasa) de diferentes cepas de *S. cerevisiae* aisladas a partir de mostos de agave y caña de azúcar, lo que nos permitirá seleccionar a la cepa más eficiente para cada medio de fermentación. Posteriormente, se evaluará la capacidad fermentativa de las cepas más eficientes tanto de manera individual como asociadas (cultivos mixtos) en medios con mezclas de fructosa-sacarosa o mosto de agave-sacarosa. Finalmente determinaremos si la capacidad mejorada de utilización de fructosa se debe a la presencia de mutaciones en el gen que codifica para el transportador de hexosas Hxt3 y si la capacidad de utilización de sacarosa depende de la actividad enzimática de las invertasas.

De encontrar una relación entre la capacidad de utilización de fructosa y sacarosa con la presencia de determinadas mutaciones en el gen *hxt3* o con los niveles de actividad enzimática de las invertasas posibilitaría su posterior uso como criterios de selección en la búsqueda de cepas eficientes para la fermentación de fructosa en mostos con mezclas de azúcares.

4. HIPÓTESIS

El uso de cultivos mixtos integrados por cepas eficientes para el consumo de fructosa o sacarosa en la fermentación de mostos con mezclas de fructosa-sacarosa permitirá un consumo más eficiente de los azúcares que si se emplean cepas de manera individual.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Seleccionar cepas de *S. cerevisiae* eficientes para la fermentación de mezclas de fructosa-sacarosa.

5.2. Objetivos particulares

- Evaluar las características de fermentación (velocidad de crecimiento, consumo de azúcares y rendimientos de etanol y biomasa) de diferentes cepas de *S. cerevisiae*, aisladas a partir de mostos industriales de agave y caña de azúcar, en medios con fructosa y sacarosa.
- Seleccionar la cepa de *S. cerevisiae* con la mejor velocidad de consumo de fructosa y la mayor producción de etanol.
- Seleccionar la cepa de *S. cerevisiae* que presente la mejor capacidad de utilización de sacarosa y altos rendimientos de etanol.
- Evaluar la capacidad fermentativa (velocidad de crecimiento, consumo de azúcares y rendimientos de etanol y biomasa) de las cepas seleccionadas a partir de los medios con fructosa o sacarosa, de forma individual y asociadas en cultivos mixtos, en medios con mezclas de fructosa-sacarosa o mosto de agave y sacarosa.
- Evaluar la actividad enzimática de la invertasa extracelular e intracelular de las diferentes cepas y cultivos mixtos de *S. cerevisiae*.
- Determinar si existen diferencias en el gen *hxt3* de las distintas cepas de *S. cerevisiae*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

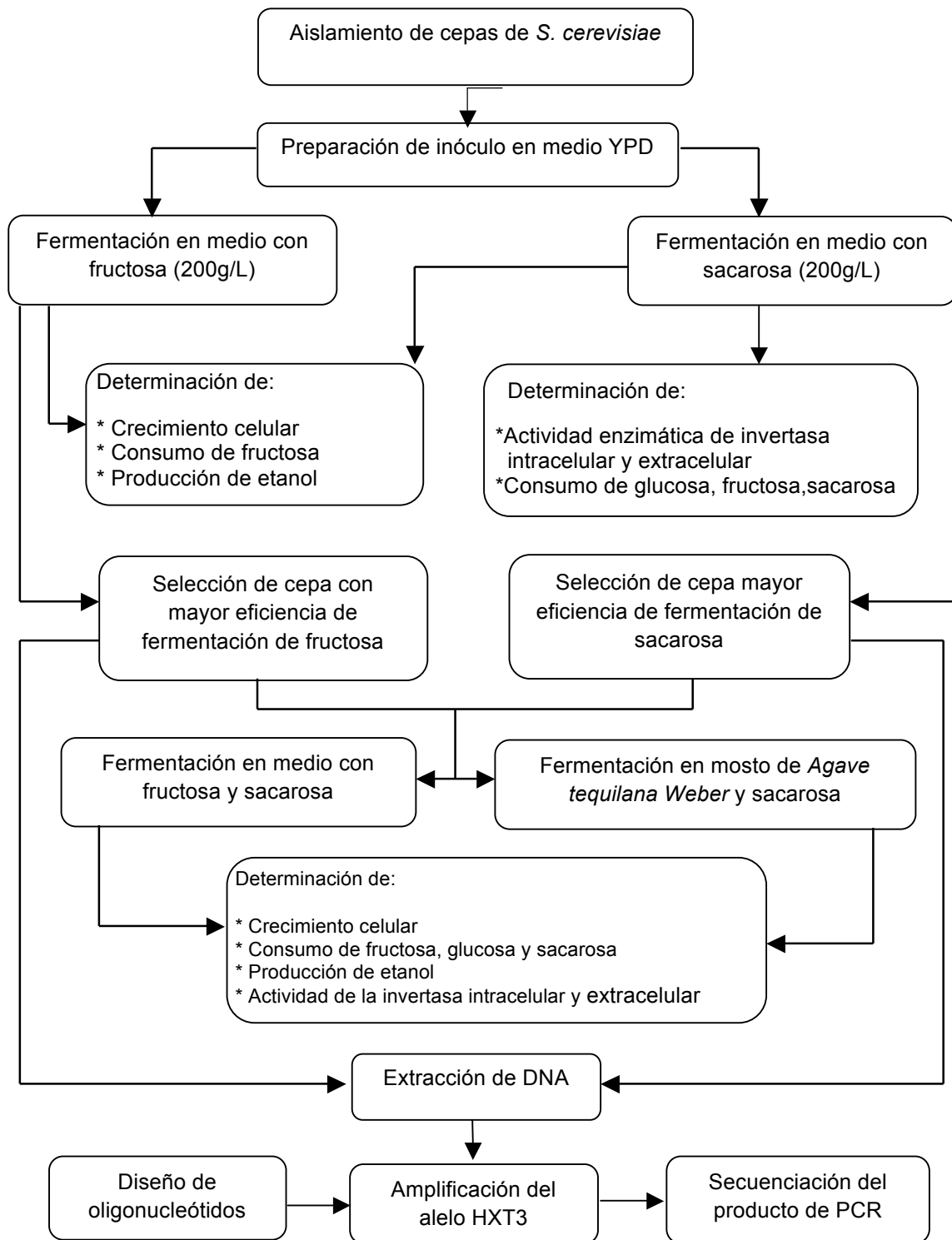


Figura 2. Diagrama general de la metodología empleada para la selección de cepas con alta capacidad de fermentación de mezclas de fructosa y sacarosa

6.1. Material biológico

Se emplearon 4 cepas de *S. cerevisiae* aisladas a partir de mostos de agave (Andrade, 2006; Rivera, 2007) para la producción de mezcal (Cepa M1 y M2) y tequila (Cepa T3 y T4), así como 1 cepa aislada de fermentaciones de caña de azúcar (Cepa TC). La caracterización de las cepas fue realizada por amplificación del dominio D1-D2 del gen 26S del ARNr. La tipificación de las cepas se realizó mediante la comparación del cariotipo con la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Las cepas están almacenadas a -80°C.

6.2. Medios de cultivo

Para el aislamiento de las cepas y la preparación de los inóculos se utilizó el medio YPD (Extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%). Para el medio sólido se adicionó 1.5% de agar bacteriológico.

Para el desarrollo de las fermentaciones se evaluaron los siguientes medios de cultivo:

Medio con fructosa (Extracto de levadura 1%, peptona 2%, fructosa 20 %)

Medio con sacarosa (Extracto de levadura 1%, peptona 2%, sacarosa 20%)

Medio con mezcla de azúcares (Extracto de levadura 1%, peptona 2%, fructosa 10.2%, sacarosa 9.8%)

Medio con mosto de agave y sacarosa (Extracto de levadura 1%, peptona 1%, mosto de *A. tequilana* Weber 10.2% y sacarosa 9.8%)

En todos los casos el medio se esterilizó en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos.

6.3. Preparación del inóculo para las fermentaciones

Las diferentes cepas de *S. cerevisiae* aisladas en medio YPD se inocularon en matraces de 250 mL con 50 mL de medio estéril YPD y se incubaron a 30°C con agitación constante (150 rpm) durante 24 horas. Se tomaron alícuotas de 1 mL a las 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas. Se realizaron diluciones decimales de cada una de las

muestras con agua destilada estéril para determinar la densidad óptica a 580 nm en un espectrofotómetro. De esta manera se obtuvieron las curvas de crecimiento para las diferentes cepas.

6.4. Fermentaciones

Se inocularon 5 mL del medio YPD (con una densidad aproximada de 10^6 células/mL en fase exponencial) en matraces de 250 mL con 50 mL del correspondiente medio de fermentación (fructosa, sacarosa, fructosa y sacarosa o mosto de agave y sacarosa). Los matraces se mantuvieron en incubación a 30°C sin agitación durante 60 horas.

Durante las fermentaciones se monitorearon los siguientes parámetros:

- Crecimiento celular
- Producción de etanol
- Consumo de fructosa, glucosa y sacarosa (dependiendo del medio de fermentación).
- Actividad enzimática de la invertasa intracelular y extracelular (en los medios en que se utilizó sacarosa como fuente de carbono).

6.4.1. Crecimiento celular

Se tomaron alícuotas de 2 mL a las 0, 6, 10, 12, 16, 18, 20, 24, 35 y 60 horas de la fermentación. Las muestras se filtraron a través de membranas Millipore de 0.45 μm (previamente secadas y pesadas) y se secaron en estufa a 120°C durante 12 horas. Se determinó el peso de las muestras secas y con estos datos se construyeron las curvas de crecimiento.

6.4.2. Producción de etanol

Se tomó una muestra de 20 mL a las 60 horas de la fermentación. La muestras se centrifugaron a 8500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se destiló mediante un equipo Quick Fit recolectando aproximadamente 18 ml de destilado. El contenido de etanol en el destilado se determinó por cromatografía de gases.

Se utilizó un cromatógrafo Agilent 6590 equipado con un detector de ionización de llama (FID) 560 y una columna Innowax de la misma marca. El equipo se utilizó a una temperatura de inyector de 250°C con un volumen de inyección de 1 µl. El programa de temperaturas fue el siguiente: una temperatura inicial de 80 °C durante 1 minuto y después un aumento de 15°C por minuto hasta alcanzar 150 °C durante 3 minutos, los gases acarreadores fueron H₂ a un flujo de 40 ml/min, aire a 400ml/min y N₂ a 5.0 ml/min.

La cuantificación de etanol se realizó comparando el área de los picos que coincidieran con los tiempos de retención de soluciones estándar de etanol.

6.4.3. Consumo de sacarosa, fructosa y glucosa

Para determinar el consumo de sacarosa, fructosa y glucosa (dependiendo del medio de fermentación) durante la fermentación se tomaron alícuotas de 1 mL a las 0, 2, 4, 6, 8, 18, 24, 35 y 60 horas de la fermentación. Las muestras se centrifugaron a 10 000rpm durante 10 min. Posteriormente se filtraron a través de filtros de 0.45 µm de diámetro (Millipore).

Se utilizó un cromatógrafo Waters 525 equipado con un detector de índice de refracción Serie 200 (Perkin Elmer) y una columna Sugar Pack. El volumen de inyección fue de 10 µl y la fase móvil H₂O con EDTA 0.05g/L a un flujo de 0.4 ml/min y una temperatura de 70°C. La temperatura de la columna se mantuvo a 85°C y se evitó que superara los 95°C. La concentración de glucosa, fructosa y sacarosa se determinó por el método de estándar externo a partir de curvas de calibración.

6.4.4 Adaptación del consumo de azúcares a ecuaciones matemáticas

Se evaluó el uso de modelos de regresión no lineal para la descripción del consumo de azúcares durante las fermentaciones con los diferentes medios de cultivo. El software utilizado fue OriginPro 8.1 (OriginLab, US), los modelos empleados fueron el modelo de decaimiento exponencial y el modelo de decaimiento sigmoidal (ecuación modificada de Gompertz) utilizados en estudios previos (Arroyo *et al.*, 2008; Lambert & Pearson, 2000; Tronchoni *et al.*, 2009). La selección del modelo a utilizar en cada uno de los casos se basó en identificar el que tuviera el mayor valor de R² y los menores intervalos de confianza para los diferentes parámetros. En el

Anexo A se describen los parámetros de cada modelo. A partir de las ecuaciones que describen el perfil de consumo de cada azúcar, se determinó el tiempo requerido para consumir la mitad de la concentración de sustrato inicial (valor de t_{50})

6.4.5. Determinación de actividad enzimática de la invertasa

Para determinar la actividad enzimática de la invertasa se tomaron dos alícuotas de 1 mL a las 0, 2, 4, 6, 8, 18, 24, 35 y 60 horas de la fermentación.

Para la determinación de la actividad de la invertasa extracelular las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y las células se lavaron en dos ocasiones con agua destilada estéril, agitación y centrifugación a 10000 rpm durante 15 minutos. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril. Para el ensayo de la invertasa extracelular se emplearon células intactas (Goldstein & Lampen, 1975; Vitolo & Borzani, 1982; Mwesigye & Barford, 1994).

Para la determinación de la actividad de la invertasa intracelular las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y las células se lavaron en dos ocasiones por adición de agua destilada estéril y centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril y se adicionaron 0.3 g de perlas de vidrio (0.45-0.5 mm de diámetro). Las células se lisaron por agitación en el vórtex en 4 intervalos de 2 minutos entre los cuales la muestra se enfrió en hielo durante 1 minuto. Posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue utilizado para la determinación de la actividad de la invertasa intracelular (Herwig *et al.* 2002).

Para los ensayos de actividad de la invertasa se mezclaron 50 μ l del sobrenadante (ya sea el que contenía la invertasa extracelular o la invertasa intracelular) con 200 μ l de solución de sacarosa (120 g/l en amortiguador de acetato de sodio pH 5.0) y se incubó a 30 °C por 60 minutos. La reacción enzimática se detuvo por adición de 50 μ l del amortiguador K_2HPO_4 (pH 7.0) y los tubos se colocaron inmediatamente en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos (Herwig *et al.* 2002). Posteriormente, los

tubos se enfriaron y los azúcares reductores producidos se cuantificaron por el método DNS (Miller, 1959).

La actividad específica de la invertasa se expresó como mg de azúcares reductores/min mg célula.

6.5. Extracción de DNA

Se preparó un cultivo en 20 ml de medio YPD de la cepa correspondiente (agitación continua de 180 rpm durante 18 horas a 30°C). El cultivo se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos y descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 500 µl de agua destilada estéril, posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante.

Al paquete celular obtenido se adicionaron 200 µl de buffer de lisis, 0.3 g de perlas de vidrio previamente lavadas en ácido (de 0.45-0.5 mm de diámetro) y 200 µl de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1). Los tubos se agitaron en el vórtex a máxima velocidad durante 90 segundos. Posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 10000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se adicionaron 500 µl de etanol al 100% frío. Se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 400 µl de buffer TE (Tris 10mM pH 8, EDTA 1 mM), 40 µl de Acetato de sodio 3M y 1000 µl de etanol al 70% frío. Se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente el DNA precipitado se resuspendió en 50 µl de buffer TE. El templado de DNA se almacenó en congelación a -20°C hasta su utilización.

6.5.1. Amplificación del alelo HXT3

Para la amplificación del alelo *hxt3* se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

- Oligonucleótido sentido: 5'- CTGAGTTAAACAATCATGAATTCAACTCC -3'
- Oligonucleótido antisentido: 5'- ACGGTTTAGCGTGAAATTATTTCTTGCC -3'

Para la reacción de PCR se probaron diferentes concentraciones de MgCl₂ (1.0, 1.5, 2.0 y 4.0 mM). Los reactivos y cantidades empleadas para la reacción de PCR se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición de la mezcla de reacción empleada para la amplificación del gen hxt3

Reactivo	Volumen (μl)
DNA	3.0
Oligonucleótido sentido (0.5 μM)	0.5
Oligonucleótido antisentido (0.5 μM)	0.5
Amortiguador	2.5
MgCl ₂ (1.5 mM)	1.0/ 1.5 / 2.0 / 4.0
dNTPs (10 μM)	0.5
H ₂ O c.b.p.	25
Taq polimerasa (2.5 U/μl)	0.2

Las condiciones de la PCR fueron:

95°C por 5 min

95°C, 30 s

60°C, 2 min

76°C, 2 min

76°C, 5 min

35 ciclos

Los productos se analizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.5 μg/ml) y se visualizaron bajo luz UV.

Los productos de PCR se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los alineamientos de las secuencias se realizaron en la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el software Geneious V5.0 (Biomatters, US).

8. Conclusiones

- La tendencia de una cepa a destinar el sustrato preferencialmente hacia la producción de biomasa o de etanol no se ve afectada por el uso de medios con fructosa, sacarosa o glucosa, o bien medios con mezclas de estos azúcares.
- Los perfiles de consumo de azúcares en medios con fructosa, sacarosa y glucosa se ven modificados en comparación al consumo en medios con una sola fuente de carbono, por lo que la integración de cultivo mixtos no necesariamente conduce a un comportamiento más eficiente de estos en comparación con el uso de cepas puras.
- Durante las fermentaciones los cultivos mixtos de *S. cerevisiae* son más resistentes a los compuestos inhibitorios presentes en hidrolizados de agave que las cepas puras.
- La actividad enzimática de la invertasa intracelular y extracelular no es un factor determinante en la velocidad de consumo de sacarosa por las cepas de *S. cerevisiae* y la fructofilia de las cepas en estudio no está determinada por la presencia de diez mutaciones en el gen *hxt3*, por lo que no son características generales que puedan ser empleadas como criterios de selección de cepas eficientes para la fermentación de fructosa en medios con mezclas que además contienen glucosa y sacarosa.
- El estudio muestra la complejidad de los factores que intervienen en el comportamiento de las distintas cepas; sin embargo, parece ser que la cepa T3, que presentó alto rendimiento de etanol y bajo rendimiento de biomasa, podría ser empleada para la producción de bebidas alcohólicas en las que el sustrato está constituido por fructosa / mosto de agave, sacarosa y glucosa.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, O. E. 2006. Identificación de levaduras por medio de PCR-RFLP de la region RNAr 5.8S-ITS aisladas durante la fermentación de mescal de la region de Sola de Vega Oaxaca. **Tesis de Maestría**. UNAM, México, D.F.
- Arroyo, L., J. Bautista, M.C. Durán, A. Garrido. 2008. Effects of ascorbic acid, sodium metabisulfite and sodium chloride on freshness retention and microbial growth during the storage of Manzanilla-Aloreña cracked table olives. **LWT Food Science and Technology**. 41: 551–560.
- Batista, A.S., Miletto, L., Stambuk B.U. 2004. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology** , 826-33
- Badotti F., Dário M.G., Alves Jr S.L, Cordioli M.A.A., Miletto L. C., de Araujo P., Stambuk B.U. 2008 Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories** 7:4
- Boles, E. & C. Hollenberg. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeast. **FEMS Microbiology Reviews**. 31: 85-111.
- Belinchón, M & J. Gancedo. 2007. Different signaling pathways mediate glucose induction of SUC2, HXR1 and pyruvate decarboxylase in yeast. **FEMS yeast Reviews**. 7:40-47.
- Berthels, N., R. Cordero, F. Bauer, I. Pretorius & J. Thevelein. 2008. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **Applied Microbial and Cell Physiology**. 77:1083-1091.
- Carlson, M & D. Botstein. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' end encodes secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**. 28: 148-154.
- Casas, R. 2006. Between traditions and modernity: Technological strategies at three tequila firms. **Technology in Society**. 28: 407-419.

-
- Claros, M.G. & G. von Heijne. 1994. TopPred II: An Improved Software For Membrane Protein Structure Predictions. **CABIOS**. 10, 685-686.
 - Ciani, M., F. Comitini, I. Mannazu & P. Dominizio. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non -*Saccharomyces* yeasts in winemaking. **FEMS Yeast Reserch**. 10: 123-133.
 - Del Castillo, L., A. Nieto & R. Sentandreu. 1992. Differential expression of the invertase-encoding SUC genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**. 120: 59-65.
 - Fernández, T., C. Martín & M. Taherzadeh. 2009. Resistencia de cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae* a inhibidores de la fermentación presentes en hidrolizados ácidos de bagazo de caña de azúcar. In: **XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería**.
 - Fleet, G. H.1990. Growth of yeasts during wine fermentation. **Journal of wine research**. 1, 211-219.
 - García, A., C. Carcel, L. Dulau, A. Samson, E. Aguera, E. Agosin & Z. Günata. 2002. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. **Journal of Food Science**. 67: 1138-1143.
 - Goldstein, A., J.O. Lampen. 1975. β -D-Fructofuranoside-fructohydrolase from yeast. **Methods Enzimology**. 420: 504-511.
 - Grootjen, D.R.J, L. Meijlink, R. Van der Lans & K. Luyben. 1990. Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbiology Technology**. 12: 860-864.
 - Guillaume, C., P. Delobel, J.M. Sablayrolles & B. Blondin. 2007. Molecular basis of fructose utilization by the yeast wine *Saccharomyces cerevisiae*: a Mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. 73: 2432-2438.
 - Harrison, D.E.F & S.J. Wren. 1976. Mixed microbial cultures as a basis for future fermentation processes. **Process Biochemistry**. 11, 30–32.
 - Herwig, C, F. Chetreau, P. Niederberger, I. Marison &U. von Stockar. 2002. Quantitative analysis of the impact of HXK” and REG1 deletion in

Saccharomyces cerevisiae on invertase expression and respiration. **Enzyme and Microbial Technology**. 31:505-515.

- Hirokawa T., S. Boon-Chieng & S. Mitaku. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. **Bioinformatics**, 14: 378-379.
- Ingram, L.O., H.C Aldrich, A.C. Borges, T.B. Causey, A. Martinez, F. Morales, A. Saleh, S.A. Underwood, L.P. Yomano, L.P., & W. York. 1999. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. **Biotechnol. Prog.** 15, 855–866.
- Kasahara, T., M. Ishiguro & M. Kasahara. 2004. Comprehensive chimeric analysis of aminoacid residues critical for high affinity glucose transport by Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**. 279: 30274-30278.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne. & E.L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**. 305 (3): 567-580.
- Kruckeberg, A. L .1996. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch Microbiol**. 166: 283–292.
- Lambert, R.J.W & J. Pearson. 2000. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. **Journal of Applied Microbiology**. 88, 784–790.
- Lappe, P., R. Moreno, J. Arrizón, T. Herrera, A. García & A. Gschaedler. 2008. Yeasts associated with the production of mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. **FEMS**. 8: 1037-1052.
- Leandro, M.J., C. Fonseca & P. Golçalves. 2009. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS Yeast Research**. 9: 511-525.
- Lemaire, K., Van de Velde S., Van Dijck, P., Thevelein, J.M. 2004. Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular cell**. 16: 293-299 .

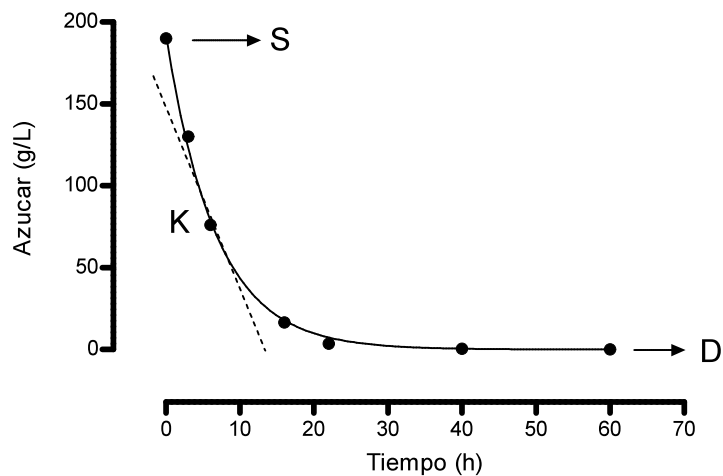
-
-
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem.** 31: 426-428.
 - Mwesigye, P. & J. Barford. 1994. Transport of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 6: 687-690.
 - Mwesigye, P. & J. Barford. 1996. Batch growth and transport kinetics of utilization of mixtures of Sucrose and Maltose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 82:101-108.
 - Nilsson, I., A. Sääf, P. Whitley, G. Gafvelyn, C. Waller & G. von Heijne. 1998. Proline-induced Disruption of a Transmembrane α -Helix in its Natural Environment. **Journal of Molecular Biology.** 284: 1165-1175.
 - **Norma Oficial Mexicana. NOM-006-SCFI-1994.** Bebidas alcohólicas. Tequila. Especificaciones.
 - Ozcan S. & M. Johnston. 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiol Mol Biol Rev.** 63(3):554-69
 - Pérez, M., K. Luyten, R. Michel, C. Riou & B. Blondin. 2005. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. **FEMS Yeast Reserch.** 5: 351-361.
 - Reeves, G., A. Narang & S. Pilyugin. 2003. Growth of mixed cultures on mixtures of substitutable substrates: the operating diagram for a structured model. **Journal of Theoretical Biology.** 226: 143-157.
 - Reifemberger, E., E. Boles & M. Ciriacy. 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **Eur J Biochem.** 245: 324-333.
 - Rivera, A. 2007. Comparación de la diversidad de las levaduras entre una fermentación natural y una inoculada en mostos de agave 100% para la producción de tequila. **Tesis de maestría**, UNAM, México, D.F.

-
- Romero, A.M. 2007. **Los Aromas del Tequila. El arte de la cata.** Ed. Porrúa. México, págs. 80-93.
 - Rolland, P., J. Winderickx & J.M. Thevelein. 2002. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. **FEMS Yeast Research.** 2: 183-201.
 - SGD project. "Saccharomyces Genome Database" <http://www.yeastgenome.org/> (2/06/10).
 - Soden, A., I. L. Francis, H. Oakey & P.A. Henschke. 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research.** 6: 21-30.
 - Stambuk, B., M. da Silva, A.D. Panek & P. de Araujo. 1999. Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters.** 170: 105-110.
 - Stambuk, B., A. Batista & P. de Araujo. 2000. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** 89: 212-214.
 - Tronchoni, J., A. Gamero, F.N. Arroyo, E. Barrio & A. Querol. 2009. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. **International Journal of Food Microbiology.** 134: 237-243.
 - Türkel, S. 2004. Non-Histone proteins Nhp6A and Nhp6b are required for the regulated expression of SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** 98: 9-13.
 - Van Maris, A., B.M. Barker, M. Brandt, A. Boorsma, M. J. Teixeira de Mattos, L.A. Grivell, J.T. Pronk, J. Blom. 2001. Modulating the distribution of fluxes among respiration and fermentation by overexpression of HAP4 in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research.** 1: 139-149.
 - Vitolo, M., W. Borzani. 1982. Measurement of Invertase Activity of Cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Analytical Biochemistry.** 130: 469-470.

-
-
- Verduyn, C., E. Postma, W.A. Schejers, J.P. van Dijken. (1990). Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **J. Gen. Microbiol.** 136, 395-403.
 - Verduyn, C. (1991) Physiology of yeasts in relation to growth yields. **Antonie van Leeuwenhoek.** 60, 325-353.
 - Verstrepen, K.J., D. Iserentant, P. Malcorps, G. Derdelinckx, P. Van Dijck, J. Winderickx, I. Pretorius, J. Thevelin & F. Delvaux. 2004. Glucose and sucrose: hazardous fast food for industrial yeast? **Trends in Biotechnology.** 22: 531-537.
 - Viana, F., J.V. Gil, S. Vallés & P. Manzanares. 2009. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology.** 135: 68–74.
 - Vukacinovic, T., M. Rakin & S. Iler-Marinkovic. 2007. Utilization of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for the production of yeast extract: effects of different enzymatic treatments on solid, protein and carbohydrate recovery. **J. Serb. Chem. Soc.** 72 (5): 451-457.
 - Waleckx, E., A. Gschaedler, B. Colonna-Ceccaldi & P. Monsan. 2008. Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana Weber* var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. **Food Chemistry.** 108: 40-48.
 - Walker, G.M. 1998. **Yeast Physiology and Biotechnology.** John Wiley & Sons. England, 1ª ed. Págs. 66-76.

ANEXO A**Modelos de regresión no lineal**

1. Modelo de decaimiento exponencial



$$\text{Función: } Y = D + Se^{(K \cdot t)}$$

Donde:

Y= Concentración de azúcar presente (g/L)

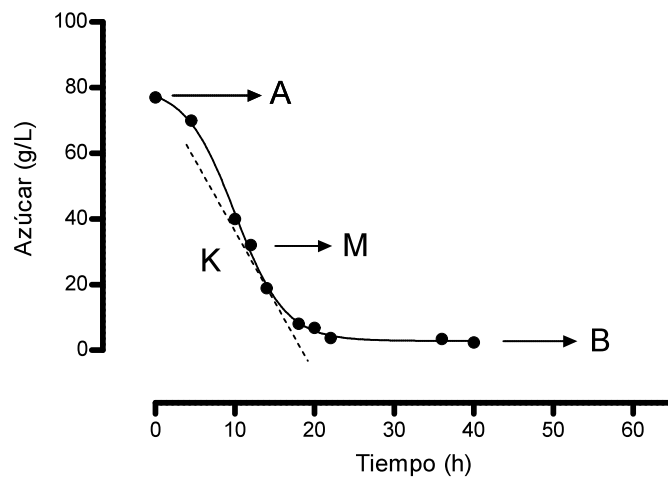
t= Tiempo transcurrido en la fermentación (h)

D=Valor específico cuando t tiende a infinito (g/L)

S=Valor estimado de cambio (g/L)

K= Constante cinética (g/L · h)

2. Modelo de decaimiento sigmoidal (Ecuación alterada de Gompertz)



Función: $Y=B + Ae^{(-e(k*(x-M))}$

Donde:

Y= Concentración de azúcar presente (g/L)

t= Tiempo transcurrido en la fermentación (h)

A= Distancia entre la asíntota mayor y la asíntota menor (g/L)

B= Asíntota menor cuando t tiende a infinito (g/L)

K= Constante cinética (g/L · h)

M= Tiempo al que se obtiene el punto de inflexión (h)

Apéndice B

Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *hxt3* de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* con la secuencia estándar del gen HXT3 de la cepa SC288 y la del gen mutado de la cepa Fermichamp.

	50	60	70	80	90	100	110	120	12	
SC288	TCGAA TGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAA TGAA CATGCCTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCA									
Frame 1	S N A D L P S N S S Q V M N M P E E K G V Q D D F Q									
FERMICHAMP	TCGAA TGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAA TGAA CATGCCTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCA									
Frame 1	S N A D L P S N S S Q V M N M P E E K G V Q D D F Q									
M1	TCGAA TGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAA TGAA CATGCCTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCA									
Frame 1	S N A D L P S N S S Q V M N M P E E K G V Q D D F Q									
M2	TCGAA TGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAA TGAA CATGCCTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCA									
Frame 1	S N A D L P S N S S Q V M N M P E E K G V Q D D F Q									
T3	TCGAA TGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAA TGAA CATGCCTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCA									
Frame 1	S N A D L P S N S S Q V M N M P E E K G V Q D D F Q									
T4	TCGAA TGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAA TGAA CATGCCTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCA									
Frame 1	S N A D L P S N S S Q V M N M P E E K G V Q D D F Q									
TC	TCGAA TGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAA TGAA CATGCCTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCA									
Frame 1	S N A D L P S N S S Q V M N M P E E K G V Q D D F Q									
	130	140	150	160	170	180	190	200		
SC288	AAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGG TAAAGGTGCATA TGTCACCTGTGTCTA TCTGTTGTTGTT									
Frame 1	Q A E A D Q V L T N P N T G K G A Y V T V S I C C V									
FERMICHAMP	AAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGG TAAAGGTGCATA TGTCACCTGTGTCTA TCTGTTGTTGTT									
Frame 1	Q A E A D Q V L T N P N T G K G A Y V T V S I C C V									
M1	AAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGG TAAAGGTGCATA TGTCACCTGTGTCTA TCTGTTGTTGTT									
Frame 1	Q A E A D Q V L T N P N T G K G A Y V T V S I C C V									
M2	AAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGG TAAAGGTGCATA TGTCACCTGTGTCTA TCTGTTGTTGTT									
Frame 1	Q A E A D Q V L T N P N T G K G A Y V T V S I C C V									
T3	AAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGG TAAAGGTGCATA TGTCACCTGTGTCTA TCTGTTGTTGTT									
Frame 1	Q A E A D Q V L T N P N T G K G A Y V T V S I C C V									
T4	AAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGG TAAAGGTGCATA TGTCACCTGTGTCTA TCTGTTGTTGTT									
Frame 1	Q A E A D Q V L T N P N T G K G A Y V T V S I C C V									
TC	AAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGG TAAAGGTGCATA TGTCACCTGTGTCTA TCTGTTGTTGTT									
Frame 1	Q A E A D Q V L T N P N T G K G A Y V T V S I C C V									
	210	220	230	240	250	260	270			
SC288	ATGGTTGCCTTCGGTGGTTTCGTTTTTCGGTTGGGATAC TGGTACCATTTCTGGTTTCGTCGCCCAAAC TGATTTC!									
Frame 1	M V A F G G F V F G W D T G T I S G F V A Q T D F I									
FERMICHAMP	ATGGTTGCCTTCGGTGGTTTCGTTTTTCGGTTGGGATAC TGGTACCATTTCTGGTTTCGTCGCCCAAAC TGATTTC!									
Frame 1	M V A F G G F V F G W D T G T I S G F V A Q T D F I									
M1	ATGGTTGCCTTCGGTGGTTTCGTTTTTCGGTTGGGATAC TGGTACCATTTCTGGTTTCGTCGCCCAAAC TGATTTC!									
Frame 1	M V A F G G F V F G W D T G T I S G F V A Q T D F I									
M2	ATGGTTGCCTTCGGTGGTTTCGTTTTTCGGTTGGGATAC TGGTACCATTTCTGGTTTCGTCGCCCAAAC TGATTTC!									
Frame 1	M V A F G G F V F G W D T G T I S G F V A Q T D F I									
T3	ATGGTTGCCTTCGGTGGTTTCGTTTTTCGGTTGGGATAC TGGTACCATTTCTGGTTTCGTCGCCCAAAC TGATTTC!									
Frame 1	M V A F G G F V F G W D T G T I S G F V A Q T D F I									
T4	ATGGTTGCCTTCGGTGGTTTCGTTTTTCGGTTGGGATAC TGGTACCATTTCTGGTTTCGTCGCCCAAAC TGATTTC!									
Frame 1	M V A F G G F V F G W D T G T I S G F V A Q T D F I									
TC	ATGGTTGCCTTCGGTGGTTTCGTTTTTCGGTTGGGATAC TGGTACCATTTCTGGTTTCGTCGCCCAAAC TGATTTC!									
Frame 1	M V A F G G F V F G W D T G T I S G F V A Q T D F I									
	280	290	300	310	320	330	340	350		
SC288	TGAGAAGATTTCGGTATGAGCAAAAAGATGGTAGTTATTATTGCTAAGGTTAGAACGGTTAATGTCTCCATT									
Frame 1	L R R F G M K H K D G S Y Y L S K V R T G L I V S I									
FERMICHAMP	TGAGAAGATTTCGGTATGAGCAAAAAGATGGTAGTTATTATTGCTAAGGTTAGAACGGTTAATGTCTCCATT									
Frame 1	L R R F G M K H K D G S Y Y L S K V R T G L I V S I									
M1	TGAGAAGATTTCGGTATGAGCAAAAAGATGGTAGTTATTATTGCTAAGGTTAGAACGGTTAATGTCTCCATT									
Frame 1	L R R F G M Q H K D G S Y Y L S K V R T G L I V S I									
M2	TGAGAAGATTTCGGTATGAGCAAAAAGATGGTAGTTATTATTGCTAAGGTTAGAACGGTTAATGTCTCCATT									
Frame 1	L R R F G M Q H K D G S Y Y L S K V R T G L I V S I									
T3	TGAGAAGATTTCGGTATGAGCAAAAAGATGGTAGTTATTATTGCTAAGGTTAGAACGGTTAATGTCTCCATT									
Frame 1	L R R F G M K H K D G S Y Y L S K V R T G L I V S I									
T4	TGAGAAGATTTCGGTATGAGCAAAAAGATGGTAGTTATTATTGCTAAGGTTAGAACGGTTAATGTCTCCATT									
Frame 1	L R R F G M K H K D G S Y Y L S K V R T G L I V S I									
TC	TGAGAAGATTTCGGTATGAGCAAAAAGATGGTAGTTATTATTGCTAAGGTTAGAACGGTTAATGTCTCCATT									
Frame 1	L R R F G M K H K D G S Y Y L S K V R T G L I V S I									

670 680 690 700 710 717 720 730 741

SC288 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTTGCTTGGCTTTGTTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W A L F M I

FERMICHAMP 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTTGCTTGGCTTTGTTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W A L F M I

M1 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTTGCTTGGCTTTGTTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W P L F M I

M2 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTTGCTTGGCTTTGTTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W P L F M I

T3 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTTGCTTGGCTTTGTTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W P L F M I

T4 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTTGCTTGGCTTTGTTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W P L F M I

TC 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTTGCTTGGCTTTGTTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W P L F M I

40 750 760 770 778 780 790 800 810

SC288 TCGGTGGTATGACTTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCT
 Frame 1 I G G M T F V P E S P R Y L V E A G Q I D E A R A S

FERMICHAMP TCGGTGGTATGACTTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCT
 Frame 1 I G G M T F V P E S P R Y L V E A G Q I D E A R A S

M1 TCGGTGGTATGACTTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAG
 Frame 1 I G G M T F V P E S P R Y L V E A G Q I D E A

M2 TCGGTGGTATGACTTTTCGTTCCAGAAACCCCCACGTTATTTGGTTGAAGC
 Frame 1 I G G M P F V P E T P R Y W V E

T3 TCG
 Frame 1 I

T4 TCGGTGGTATGACTTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCT
 Frame 1 I G G M T F V P E S P R Y L V E A G Q I D E A R A S

TC TCGGTGGTATGACTTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCT
 Frame 1 I G G M T F V P E S P R Y W V E A G Q I D E A R A S

770 780 790 800 810 820 830 841 843

SC288 CCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCTTTCCAAAGTTAAACAAGGTTGCCCA
 Frame 1 3 P R Y L V E A G Q I D E A R A S L S K V N K V A P

FERMICHAMP CCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCTTTCCAAAGTTAAACAAGGTTGCCCA
 Frame 1 3 P R Y L V E A G Q I D E A R A S L S K V N K V A P

M1 CCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAG
 Frame 1 3 P R Y L V E A G Q I D E A

M2 CCCCACGTTATTTGGTTGAAGC
 Frame 1 P R Y W V E

T3
 Frame 1

T4 CCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCTTTCCAAAGTTAAACAAGGTTGCCCA
 Frame 1 3 P R Y L V E A G Q I D E A R A S L S K V N K V A P

TC CCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCTTTCCAAAGTTAAACAAGGTTGCCCA
 Frame 1 3 P R Y W V E A G Q I D E A R A S L S K V

50 60 70 80 90 100 110

SC288 CATCAA TGCATCAGCA TCGTAGT TAGCA CCTCTTTGAGATGTTGGAA CCA TGAAG CAGACTTCCA TGGTAG
 Reverse Frame 1 M L A D A D Y N A G R Q S T P V W S A S K W P L

FERMICHAMP CATCAA TGCATCAGCA TCGTAGT TAGCA CCTCTTTGAGATGTTGGAA CCA TGAAG CAGACTTCCA TGGTAG
 Reverse Frame 1 M L A D A D Y N A G R Q S T P V W S A S K W P L

M1 CATCAA TGCATCAGCA TCGTAGT TAGCA CCTCTTTGAGATGTTGGAA CCA TGAAG CAGACTTCCA TGGTAG
 Reverse Frame 1 M L A D A D Y N A G R Q S T P V W S A S K W P L

M2 CATCAA TGCATCAGCA TCGTAGT TAGCA CCTCTTTGAGATGTTGGAA CCA TGAAG CAGACTTCCA TGGTAG
 Reverse Frame 1 M L A D A D Y N A G R Q S T P V W S A S K W P L

T3 CATCAA TGCATCAGCA TCGTAGT TAGCA CCTCTTTGAGATGTTGGAA CCA TGAAG CAGACTTCCA TGGTAG
 Reverse Frame 1 M L A D A D Y N A G R Q S T P V W S A S K W P L

T4 CATCAA TGCATCAGCA TCGTAGT TAGCA CCTCTTTGAGATGTTGGAA CCA TGAAG CAGACTTCCA TGGTAG
 Reverse Frame 1 M L A D A D Y N A G R Q S T P V W S A S K W P L

TC CATCAA TGCATCAGCA TCGTAGT TAGCA CCTCTTTGAGATGTTGGAA CCA TGAAG CAGACTTCCA TGGTAG
 Reverse Frame 1 M L A D A D Y N A G R Q S T P V W S A S K W P L

120 130 140 150 160 164 170 180 1

SC288 AACACCTTCAGCGTACATATCAATTGACTTCTTCCAAAGTCAAACCCCTTAGTTTCTGGCACAAAGAAGAAAAC
 Reverse Frame 1 V G E A Y M D N V E E L T L G K T E P V F F F V

FERMICHAMP AACACCTTCAGCGTACATATCAATTGACTTCTTCCAAAGTCAAACCCCTTAGTTTCTGGCACAAAGAAGAAAAC
 Reverse Frame 1 V G E A Y M D N V E E L T L G K T E P V F F F V

M1 AACACCTTCAGCGTACATATCAATTGACTTCTTCCAAAGTCAAACCCCTTAGTTTCTGGCACAAAGAAGAAAAC
 Reverse Frame 1 V G E A Y M D N V E E L T L G K T E P V F F F V

M2 AACACCTTCAGCGTACATATCAATTGACTTCTTCCAAAGTCAAACCCCTTAGTTTCTGGCACAAAGAAGAAAAC
 Reverse Frame 1 V G E A Y M D N V E E L T L G K T E P V F F F V

T3 AACACCTTCAGCGTACATATCAATTGACTTCTTCCAAAGTCAAACCCCTTAGTTTCTGGCACAAAGAAGAAAAC
 Reverse Frame 1 V G E A Y M D N V E E L T L G K T E P V F F F V

T4 AACACCTTCAGCGTACATATCAATTGACTTCTTCCAAAGTCAAACCCCTTAGTTTCTGGCACAAAGAAGAAAAC
 Reverse Frame 1 V G E A Y M D N V E E L T L G K T E P V F F F V

TC AACACCTTCAGCGTACATATCAATTGACTTCTTCCAAAGTCAAACCCCTTAGTTTCTGGCACAAAGAAGAAAAC
 Reverse Frame 1 V G E A Y M D N V E E L T L G K T E P V F F F V

200 210 220 230 240 250 260

SC288 GTAGAAGTAGGCGAAAA CCATA CAGCCCA TGAAAACGTAACCGTAGTAGAAGTTAATAGCAC CAGTAATAAA!
 Reverse Frame 1 Y F Y A F V M C G M F V Y G Y Y F N I A G T I F

FERMICHAMP GTAGAAGTAGGCGAAAA CCATA CAGCCCA TGAAAACGTAACCGTAGTAGAAGTTAATAGCAC CAGTAATAAA!
 Reverse Frame 1 Y F Y A F V M C G M F V Y G Y Y F N I A G T I F

M1 GTAGAAGTAGGCGAAAA CCATA CAGCCCA TGAAAACGTAACCGTAGTAGAAGTTAATAGCAC CAGTAATAAA!
 Reverse Frame 1 Y F Y A F V M C G M F V Y G Y Y F N I A G T I F

M2 GTAGAAGTAGGCGAAAA CCATA CAGCCCA TGAAAACGTAACCGTAGTAGAAGTTAATAGCAC CAGTAATAAA!
 Reverse Frame 1 Y F Y A F V M C G M F V Y G Y Y F N I A G T I F

T3 GTAGAAGTAGGCGAAAA CCATA CAGCCCA TGAAAACGTAACCGTAGTAGAAGTTAATAGCAC CAGTAATAAA!
 Reverse Frame 1 Y F Y A F V M C G M F V Y G Y Y F N I A G T I F

T4 GTAGAAGTAGGCGAAAA CCATA CAGCCCA TGAAAACGTAACCGTAGTAGAAGTTAATAGCAC CAGTAATAAA!
 Reverse Frame 1 Y F Y A F V M C G M F V Y G Y Y F N I A G T I F

TC GTAGAAGTAGGCGAAAA CCATA CAGCCCA TGAAAACGTAACCGTAGTAGAAGTTAATAGCAC CAGTAATAAA!
 Reverse Frame 1 Y F Y A F V M C G M F V Y G Y Y F N I A G T I F

270 280 290 300 310 313 320 330

SC288 JAGTGAAGAAACCAATCAAGAAACCCACAA CCAATTAGCAGCTGTAGCAATAGACA TAGCCTTAGACTTGAC
 Reverse Frame 1 T F F G I L F G W L W N A A T A I S M A K S K V

FERMICHAMP JAGTGAAGAAACCAATCAAGAAACCCACAA CCAATTAGCAGCTGTAGCAATAGACA TAGCCTTAGACTTGAC
 Reverse Frame 1 T F F G I L F G W L W N A A T A I S M A K S K V

M1 JAGTGAAGAAACCAATCAAGAAACCCACAA CCAATTAGCAGCTGTAGCAATAGACA TAGCCTTAGACTTGAC
 Reverse Frame 1 T F F G I L F G W L W N A A T A I S M A K S K V

M2 JAGTGAAGAAACCAATCAAGAAACCCACAA CCAATTAGCAGCTGTAGCAATAGACA TAGCCTTAGACTTGAC
 Reverse Frame 1 T F F G I L F G W L W N A A T A I S M A K S K V

T3 JAGTGAAGAAACCAATCAAGAAACCCACAA CCAATTAGCAGCTGTAGCAATAGACA TAGCCTTAGACTTGAC
 Reverse Frame 1 T F F G I L F G W L W N A A T A I S M A K S K V

T4 JAGTGAAGAAACCAATCAAGAAACCCACAA CCAATTAGCAGCTGTAGCAATAGACA TAGCCTTAGACTTGAC
 Reverse Frame 1 T F F G I L F G W L W N A A T A I S M A K S K V

TC JAGTGAAGAAACCAATCAAGAAACCCACAA CCAATTAGCAGCTGTAGCAATAGACA TAGCCTTAGACTTGAC
 Reverse Frame 1 T F F G I L F G W L W N A A T A I S M A K S K V

6 340 350 360 370 380 390 400

SC288 TCTCAA TGGGAAAGTTTCAGAAA TAACAACATAAGCAATTGGAGCCCAAGTGGTAG CAAAACAGAAAA TATA
 Reverse Frame 1 R L P F T E S I V V Y A I P A W T T A F C F I Y

FERMICHAMP TCTCAA TGGGAAAGTTTCAGAAA TAACAACATAAGCAATTGGAGCCCAAGTGGTAG CAAAACAGAAAA TATA
 Reverse Frame 1 R L P F T E S I V V Y A I P A W T T A F C F I Y

M1 TCTCAA TGGGAAAGTTTCAGAAA TAACAACATAAGCAATTGGAGCCCAAGTGGTAG CAAAACAGAAAA TATA
 Reverse Frame 1 R L P F T E S I V V Y A I P A W T T A F C F I Y

M2 TCTCAA TGGGAAAGTTTCAGAAA TAACAACATAAGCAATTGGAGCCCAAGTGGTAG CAAAACAGAAAA TATA
 Reverse Frame 1 R L P F T E S I V V Y A I P A W T T A F C F I Y

T3 TCTCAA TGGGAAAGTTTCAGAAA TAACAACATAAGCAATTGGAGCCCAAGTGGTAG CAAAACAGAAAA TATA
 Reverse Frame 1 R L P F T E S I V V Y A I P A W T T A F C F I Y

T4 TCTCAA TGGGAAAGTTTCAGAAA TAACAACATAAGCAATTGGAGCCCAAGTGGTAG CAAAACAGAAAA TATA
 Reverse Frame 1 R L P F T E S I V V Y A I P A W T T A F C F I Y

TC TCTCAA TGGGAAAGTTTCAGAAA TAACAACATAAGCAATTGGAGCCCAAGTGGTAG CAAAACAGAAAA TATA
 Reverse Frame 1 R L P F T E S I V V Y A I P A W T T A F C F I Y

590 600 610 620 630 640 650 660
SC288 AATGAGAGGTA CTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATG ATTA CCTTGGG TATTTTCTGGGTTACTGTACCAACTTCG
 Frame 1 M R G T L V S C Y Q L M I T L G I F L G Y C T N F
FERMICHAMP AATGAGAGGTC CTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATG GTTACCTTGGG TATTTTCTGGGTTACTGTACCAACTTCG
 Frame 1 M R G A L V S C Y Q L M V T L G I F L G Y C T N F
M1 AATGAGAGGTA CTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATG ATTA CCTTGGG TATTTTCTGGGTTACTGTACCAACTTCG
 Frame 1 M R G T L V S C Y Q L M I T L G I F L G Y C T N F
M2 AATGAGAGGTA CTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATG ATTA CCTTGGG AATTTTCTGGGTTACTGTACCAACTTCG
 Frame 1 M R G T L V S C Y Q L M I T L G I F L G Y C T N F
T3 AATGAGAGGTA CTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATG ATTA CCTTGGG TATTTTCTGGGTTACTGTACCAACTTCG
 Frame 1 M R G T L V S C Y Q L M I T L G I F L G Y C T N F
T4 AATGAGAGGTA CTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATG ATTA CCTTGGG TATTTTCTGGGTTACTGTACCAACTTCG
 Frame 1 M R G T L V S C Y Q L M I T L G I F L G Y C T N F
TC AATGAGAGGTA CTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATG ATTA CCTTGGG TATTTTCTGGGTTACTGTACCAACTTCG
 Frame 1 M R G T L V S C Y Q L M I T L G I F L G Y C T N F

670 680 690 700 710 717 720 730 740
SC288 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTG TGT TTTG CCTGG GCTTTGTTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W A L F M I
FERMICHAMP 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTG TGT TTTG CCTGG GCTTTGTTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W A L F M I
M1 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTG TGT TTTG CCTGG CTTTGT TTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W P L F M I
M2 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTG TGT TTTG CCTGG CTTTGT TTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W P L F M I
T3 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTG TGT TTTG CCTGG CTTTGT TTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W P L F M I
T4 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTG TGT TTTG CCTGG CTTTGT TTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W P L F M I
TC 3GTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTG TGT TTTG CCTGG CTTTGT TTTATGAT
 Frame 1 G T K N Y S N S V Q W R V P L G L C F A W P L F M I

40 750 760 770 778 780 790 800 810
SC288 TCGGTGGTATGACTTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCT
 Frame 1 I G G M T F V P E S P R Y L V E A G Q I D E A R A S
FERMICHAMP TCGGTGGTATGACTTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCT
 Frame 1 I G G M T F V P E S P R Y L V E A G Q I D E A R A S
M1 TCGGAGGTATGACTTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAG
 Frame 1 I G G M T F V P E S P R Y L V E A G Q I D E A
M2 TCGGAGGTATG CTTTTCGTTCCAGAAACCCACGTTATTTGGTTGAAGC
 Frame 1 I G G M P F V P E T P R Y W V E
T3 TCG
 Frame 1 I
T4 TCGGTGGTATGACTTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCT
 Frame 1 I G G M T F V P E S P R Y L V E A G Q I D E A R A S
TC TCGGTGGTATGACTTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCT
 Frame 1 I G G M T F V P E S P R Y W V E A G Q I D E A R A S