

Estudi funcional de la butanodiol deshidrogenasa (Bdh1p) de *Saccharomyces cerevisiae*. Aplicacions biotecnològiques a la indústria cervesera.

Eva González Roca



Juliol de 2004

**ESTUDI FUNCIONAL DE LA BUTANODIOL DESHIDROGENASA
(Bdh1p) DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. APLICACIONES
BIOTECNOLÒGIQUES A LA INDÚSTRIA CERVESERA.**

Tesi Doctoral presentada per **EVA GONZÁLEZ ROCA**, llicenciada en Bioquímica, per a optar al Grau de Doctora en Bioquímica i Biologia Molecular.

Treball realitzat al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció dels Doctors **XAVIER PARÉS CASASAMPERA** i **JOSEP ANTONI BIOSCA VAQUÉ**.

Xavier Parés Casasampera

Josep Antoni Biosca Vaqué

Eva González Roca

Bellaterra, 12 de juliol de 2004.

Als meus pares...

... i al David.

AGRAÏMENTS

La tesi que presento és el fruit de molts anys de treball. Ha estat un llarg camí on molta gent ha contribuït a que el que llegireu a continuació, hagi arribat a bon port.

En primer lloc vull agrair al Dr. Xavier Parés que m'hagi acollit al seu grup i que m'hagi dirigit part de la tesi. De tant en tant he necessitat que algú em fes tocar de peus a terra, cosa que ha aconseguit estupendament.

També vull agrair al Dr. Biosca la co-direcció de la tesi, així com a participar en el naixement del seu grup basat en l'estudi del llevat. Els diferents punts de vista en segons algunes qüestions experimentals han aconseguit enriquir la tesi. Les idees brillants i l'entusiasme que transmet quan es posa la bata m'han fet adonar que cal mantenir la il·lusió si es vol seguir investigant al llarg de la vida.

Cal destacar el suport logístic i econòmic que m'ha prestat l'empresa S.A. Damm i en el seu nom el Sr. Francesc Xavier Castañé, Cap del laboratori d'Investigació i de Control de Qualitat de la planta del Prat de Llobregat. Gràcies al Sr. Marçal Vera, responsable del laboratori de química, i a tot el seu equip, he pogut obtenir les dades dels diferents metabolits de la cervesa produïda amb les soques de llevat modificades. També vull agrair de manera especial la col·laboració de la Sra. Remedios Mancebo i del seu equip de microbiologia (l'Anna, l'Estela, el Dani, la Yolanda...), que m'han donat un cop de mà quan m'he quedat sense most, o havia d'agafar una mostra mooolt important el dissabte al matí. Sense l'ajut de tots ells una gran part de la tesi, per mi la més una de les més atractives, no hagués estat possible.

També vull agrair al Dr. Blondin i la Dra. Dequin, la seva acollida durant la meua estada al laboratori de Microbiologie de l'Institut des Produits de la Vigne (Institut National de la Recherche Agronomique) a França, així com a la Dra. Florence Saint Prix i al Tristan Rossignol, els dos estudiant que van estar més pendents de mi. Allà vaig aprendre a modificar les soques de llevat industrial, així com la tècnica que avui dia m'ha ajudat a trobar feina.

La següent part dels agraïments és molt més personal. Per això vull començar amb una de les persones més importants que ha estat al meu costat durant aquest

temps: la Chari. Ha estat la meva mestra, però amb el temps em vaig adonar que era més que això: s'havia convertit amb una gran amiga. M'ha ensenyat a valorar la vida i a creure en un mateix. És una persona molt vitalista, i m'omple d'orgull haver pogut estar al seu costat per poder absorbir una petita part dels seus grans coneixements. Moltes gràcies, Chari.

També he compartit moltes vivències bones al laboratori, on havíem arribat a ser 8 dones! La Carol, la Trini, la Hakima, la Sandra, la Maykelis, la Chari, la Carme... De la Carol he après que s'ha de ser constant i metòdica, per això és capaç d'arribar allà on ella vulgui. La Hakima és una de les persones amb més bon cor que he conegut des de que tinc consciència, el que passa és que li va sortir una bona rival, la Sandra. Espero que surtin triomfadores en la seva conquesta de les amèriques! De la Trini vull destacar la frescor que aportava al laboratori. També amb ella he aconseguit una gran amistat que espero que duri moooooolt temps (per cert que es millori el Xevi!). Finalment vull desitjar a la Carme una fel·liç maternitat.

Hi ha un altre grup de gent a qui vull agrair el fet que m'hagin aguantat tants anys: els ADH. Gent incansable, organitzadors d'excursions (que acabava per no anar-hi) i de sopars (que si que hi anava), sempre a punt per fer alguna cosa. Tant als que hi són (Emma, Ana María, Albert, Sergi, Oriol, Xavi), com als que no hi són (Bernat, Susana o Sílvia) moltes gràcies.

Vull donar les gràcies al Salvador Bartolomé del Laboratori de Fotodocumentació, d'Electroforesis, Autoradiografies i Luminiscència de la UAB per la santa paciència que ha tingut amb mi. Sé que intentar escanejar els mocs de gels que et portava no era feina fàcil, però amb el sistema tomba-truites no hi havia problema que no es pogués solucionar. Gràcies també per la teva amistat i les teves xerrades sobre com resoldre el món tot esperant el torn de fer les fotos.

També vull destacar a l'Elena. Vam ser dels pocs laboratoris de poder gaudir de la seva alegria un dia sencer a la setmana, fet que esperàvem amb il·lusió. És una gran companya que sempre portaré en el meu record.

A la resta del departament cal agrair-los el ser bons companys i tenir sempre una conversa interessant per seguir a l'hora de dinar.

També vull mencionar a la gent del meu nou laboratori. És d'agrair trobar amb persones com el Lauro Sumoy que té una paciència de sant i que m'ha permès poder acabar aquesta tesi sense problemes d'horaris i amb comprensió. Espero que a la Laura li vagi tant bé com a mi en la seva nova etapa que començarà aviat, així com a l'Annalisa, que ja l'ha començat. A la resta del grup (David, Juanjo, Belén, Manel) també dedicar-los un pensament.

A l'Olga, la Raquel, la Laura i la Sònia, amb qui sóc amiga des de fa moltíssims anys i amb qui les trobades sempre són diferents unes de les altres. Amb elles he pogut sortir d'aquest món de tesis i investigació, i sempre han estat al meu costat pel que fes falta.

A la Bet i la Cris per la seva amistat incondicional. Amb elles he compartit tot, les alegries, els problemes, els canvis en les nostres vides. Les reunions "tuper" han estat un temps per relaxar-nos i riure, per ajudar-nos i aconsellar-nos. Gràcies per aguantar-me com sóc, per això i per moltíssimes coses més sou les meves millors amigues.

A la Maykelis, perquè s'ha convertit en la meva "germana cubana". Sé que li hagués agradat estar aquí per poder veure'm defensar la tesi que tant hem patit, ella i jo. La seva partida em va suposar la pèrdua de proximitat d'una de les persones que més a prop està de mi, però sé que els 9000 km que ens separen no són res comparats amb la força de la nostra amistat. Un petó per tu, pel Gustavo i per tota la teva família.

A la meva germana, la Sandra, que sempre m'ha tractat com una gran germana gran. Sé que està molt orgullosa que la seva germaneta hagi arribat fins aquí, així que també li vull dedicar part d'aquesta tesi a ella. Gràcies per cuidar-me. Un petó al Carles.

També vull recordar una persona que malauradament ja no es troba entre nosaltres, la meua iaia Maria. Suposo que no entenia que estigues estudiant tants anys, però sí que estava orgullosa que la seva neta fos tant "estudianta" com diria ella. Sé que estaria contenta de veure'm tant feliç.

Vull agrair especialment als meus pares. Sempre han estat al meu costat i sé que sempre ho estaran. Els omple d'orgull que la seva filla sigui doctora, tot i que no del tipus que li hagués agradat a la meua mare. Papa, ara ja pots ensenyar la tesi en la seva forma final als teus companys i si vols presumeix perquè no n'hi haurà una

segona! Mama, moltes gràcies per estar sempre pendent de mi, em vas ajudar moltíssim.

Finalment, i no per això el menys important, vull donar les gràcies al David. T'haig de donar les gràcies per moltes coses, per estimar-me tant, per cuidar-me, per mimar-me, per fer-me espavilar quan tocava i per tranquil·litzar-me quan estava nerviosa. Tens la virtut de llegir la meva cara i saber què necessito en cada moment. Bitxo, et prometo que això ja s'acaba i que el meu cap estarà on ha d'estar, al teu costat. Espero que siguem feliços tots tres!

ÍNDIX

AGRAÏMENTS	i
ÍNDIX	v
ÍNDIX DE TAULES I FIGURES	xi
ABREVIATURES	xv
RESUM	1
INTRODUCCIÓ	3
1. Alcohol deshidrogenases	3
1.1 Deshidrogenases/Reductases de cadena curta (SDR)	4
1.2 Alcohol deshidrogenases "activades per ferro"	5
2. Deshidrogenases/Reductases de cadena mitja (MDR)	5
2.1 Classificació dels membres de les MDR en famílies i subfamílies	6
2.2 Les MDR amb Zn	8
2.3 Poliòl deshidrogenases (PDH)	11
3. Les MDR amb Zn de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
3.1 Búsqueda d'enzims MDR amb Zn en el genoma de <i>S. cerevisiae</i>	13
3.2 El sistema alcohol deshidrogenasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
3.2.1 <i>Adh1p</i> i <i>Adh2p</i>	15
3.2.2 <i>Adh3p</i>	16
3.2.3 <i>Adh4p</i>	17
3.2.4 <i>Adh5p</i>	17
3.2.5 <i>Adh6p</i> i <i>Adh7p</i>	17
3.2.6 <i>FALDH</i>	18
3.2.7 <i>Sorbitol deshidrogenases</i>	18
3.2.8 <i>Xilitol deshidrogenasa</i>	19
3.2.9 <i>Butanodiol deshidrogenasa</i> i <i>Yal061p</i>	19
4. La fermentació alcohòlica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
4.1 Introducció històrica	19
4.2 La fermentació alcohòlica: glicòlisi, piruvat i producció d'etanol	20
4.3 Regulació del balanç redox durant la fermentació alcohòlica	23
4.3.1 <i>Producció de glicerol</i>	23
4.3.2 <i>Altres mecanismes de reoxidació del NADH</i>	24
4.4 Productes i subproductes de la fermentació alcohòlica	26
4.5 Producció de 2,3-butanodiol i acetoïna	27
4.6 Producció de cervesa i dels metabolits secundaris diacetil i 2,3-pentanodiona --	29
4.6.1 <i>Procés de fabricació de la cervesa</i>	29
4.6.2 <i>Productes secundaris: diacetil i 2,3-pentanodiona</i>	31
OBJECTIUS	33

MATERIALS I MÈTODES	35
1. Reactius	35
1.1 Reactius generals	35
1.2 Reactius de biologia molecular	36
2. Material biològic i conservació de les diferents soques utilitzades	37
2.1 Soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
2.2 Soques de <i>Escherichia coli</i>	37
2.3 Conservació de les diferents soques utilitzades	38
2.3.1 Conservació de soques de llevat	38
2.3.2 Conservació de soques d' <i>Escherichia coli</i>	38
3. Medis de cultiu	38
3.1 Medis de cultiu de llevat	38
3.2 Medis de cultiu de bacteris	42
4. Mètodes espectrofotomètrics	43
4.1 Determinació de l'activitat enzimàtica	43
4.1.1 Activitats amb la Bdh1p. Activitat estàndard	43
4.1.2 Activitats amb l'Adh2p. Activitat estàndard	44
4.2 Quantificació de glucosa en el medi	45
5. Mètodes electroforètics	46
5.1 Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS	46
5.2 Electroforesi en gels de poliacrilamida no desnaturalitzants	46
5.3 Electrofocalització analítica	47
5.3.1 Electrofocació analítica mitjançant l'equip electroforètic PhastSystem™	47
5.3.2 Electrofocació analítica en el sistema minigel vertical (Bio-Rad, Miniprotean II)	47
5.3.3 Electrofocació analítica amb gels prefets d'interval de pH 3,0-10,0 (Bio-Rad)	48
6. Tincions de proteïnes en gels de poliacrilamida	48
6.1 Tinció de proteïnes per blau de Coomassie i per sals de plata	48
6.2 Tinció per activitat	49
6.2.1 Tinció d'activitat per oxidació d'alcohols	49
6.2.2 Tinció d'activitat per reducció de cetones	50
7. Tipus de cromatografies utilitzades	51
7.1 Cromatografia en DEAE-Sepharose Fast Flow	51
7.2 Cromatografia en Hidroxilapatit Bio-Gel HT	51
7.3 Cromatografia d'afinitat Cibacron Blue 3GA Agarosa	51
7.4 Cromatografia de gel filtració amb la columna Superdex 200 HR 10/30 per HPLC	52
8. Purificació de la Bdh1p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
8.1 Estudis d'estabilitat de la Bdh1p en homogenats	53
8.2 Etapes de la purificació de la Bdh1p	53
9. Purificació de l'Adh2p	54
10. Espectrometria de masses, i cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses	56
10.1 Identificació de l'Adh2p utilitzant espectrometria de masses Maldi-Tof	56
10.2 Cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses (CG-EM) per a l'estudi de l'estereoespecificitat dels enzims Bdh1p i Adh2p	56
10.2.1 Estudi de l'estereoespecificitat de la Bdh1p. Reaccions d'oxidació i reducció	56
10.2.2 Estudi de l'estereoespecificitat de la Bdh1p i de l'Adh2p. Reaccions de reducció amb sistema de regeneració del NADH	57
10.3 Cromatografia CG-EM per a l'estudi de la producció d'estereoisòmers del	

2,3-butanodiol i de l'acetoina durant el creixement de <i>S. cerevisiae</i> en medi ric amb glucosa al 20%	59
11. Mètodes generals de DNA recombinant	60
11.1 Vectors	60
11.1.1 Vectors bacterians	60
11.1.2 Vectors llançadora bacteri-llevat	61
11.2 Extracció de DNA plasmídic de bacteri	62
11.3 Extracció de DNA genòmic de llevat	62
11.4 Electroforesi de DNA en gel d'agarosa	63
11.5 Preparació i transformació de cèl·lules competents de <i>S. cerevisiae</i>	63
11.6 Anàlisi informàtic de seqüències de DNA i proteïna	63
12. Clonatge del gen YAL060W (BDH1) al vector pYES2	64
13. Clonatge del gen ADH2 al vector pYES2	65
14. Deleció dels gens BDH1, ADH2 i YAL061W	66
14.1 Construcció de les diferents soques delecionades pel gen que codifica per la Bdh1p	66
14.1.1 Estratègia per deleccionar el gen BDH1	66
14.1.2 Anàlisi de les noves soques de llevat	67
14.2 Construcció de les diferents soques delecionades pel gen que codifica per l'Adh2p	68
14.2.1 Estratègia per deleccionar el gen ADH2	68
14.2.2 Anàlisi de les noves soques de llevat	69
14.3 Construcció de les diferents soques delecionades per el gen YAL061W	70
14.3.1 Estratègia per deleccionar el gen YAL061W	70
14.3.2 Anàlisi de les noves soques de llevat	71
15. Construcció de vectors seleccionables per genètica per l'expressió de la Bdh1p en la soca de llevat industrial SID	71
15.1 Construcció del vector pRSMX	71
15.2 Construcció del vector pRSMXY0	71
15.3 Construcció del vector pAAMX	72
15.4 Construcció del vector pAAYORMX	72
16. Construcció de soques de llevat modificades genèticament per sobreexpressar la Bdh1p	72
16.1 Modificació de la soca de laboratori S288C	73
16.1.1 Construcció del vector pUGY0 i amplificació per PCR del mòdul d'expressió de la Bdh1p i de la kanamicina flanquejada per les seqüències loxP	73
16.1.2 Anàlisi de les noves soques de llevat	74
16.1.3 Escissió del marcador de selecció kanMX4 per expressió de la Cre recombinasa del bacteriòfag P1 en la soca SCUK60	75
16.2 Modificació de la soca de llevat industrial SID	75
16.2.1 Amplificació per PCR del mòdul d'expressió de la Bdh1p i de la kanamicina flanquejada per les seqüències loxP	75
16.2.2 Anàlisi de les noves soques de llevat	76
16.2.3 Escissió del marcador de selecció kanMX4 per expressió de la Cre recombinasa del bacteriòfag P1 en les soques SIDUK60.1 i SIDUK60.4	76
16.2.4 Southern blot no radioactiu de les diferents soques industrials modificades genèticament	77
17. Fermentacions amb most industrial	78

RESULTATS	81
1. Clonatge del gen <i>BDH1</i> de <i>S. cerevisiae</i> al vector pYES2	81
2. Anàlisi de la seqüència de la Bdh1p. La Bdh1p és una MDR	83
3. Expressió del gen <i>BDH1</i> i detecció de l'activitat de la proteïna codificada	86
4. Purificació de la Bdh1p	87
4.1 Estudis d'estabilitat de la Bdh1p en homogenats	87
4.2 Expressió en de la Bdh1p en la soca de <i>S. cerevisiae</i> BJ5459	87
4.3 Purificació de la Bdh1p	88
4.3.1 Cromatografia d'hidroxilapatit	88
4.3.2 Cromatografia d'afinitat Cibacron Blue 3GA Agarosa	88
4.3.3 Cromatografia en gel filtració	89
4.4 Anàlisi del grau de puresa de l'enzim	90
5. Caracterització físico-química de l'enzim Bdh1p de <i>S. cerevisiae</i>	90
5.1 Determinació del punt isoelèctric de la Bdh1p	91
5.2 Determinació del pes molecular natiu de la Bdh1p	91
6. Caracterització cinètica de la Bdh1p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	92
6.1 Constants cinètiques i especificitat de substrat de l'enzim Bdh1p	92
6.2 Estereoespecificitat de la Bdh1p	94
7. Deleció del gen <i>BDH1</i> en la soca de <i>S. cerevisiae</i> FY834	97
7.1 Estratègia de la deleció	97
7.2 Anàlisi de les noves soques	98
8. Creixement de les soques FY834 i EG2 en 2,3-butanodiol com única font de carboni	99
8.1 Corbes de creixement de les soques FY834 i EG2 en medi ric (YPD) i amb 2,3-butanodiol al 3% com a font de carboni	99
8.2 Anàlisi de les soques crescudes en les condicions anteriors	100
9. Purificació d'una nova diacetil reductasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	103
9.1 Purificació d'una nova diacetil reductasa de <i>S. cerevisiae</i>	103
9.1.1 Cromatografia d'intercanvi iònic DEAE Sepharose Fast Flow	103
9.1.2 Cromatografia en hidroxilapatit BioGel HT	103
9.1.3 Cromatografia d'afinitat Cibacron Blue 3GA Agarosa	105
9.2 Anàlisi del grau de puresa de l'enzim	105
9.3 Identificació de la diacetil reductasa com l'Adh2p de <i>S. cerevisiae</i>	106
10. Caracterització cinètica de l'Adh2p	106
10.1 Constants cinètiques de l'Adh2p	106
10.2 Estereoespecificitat de l'Adh2p. Comparació amb la Bdh1p	107
11. Construcció de mutants delecionats per els gens <i>ADH2</i>, <i>YAL061W</i> i <i>BDH1</i>	111
11.1 Clonatge del gen <i>ADH2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al vector pYES2	112
11.2 Deleció del gen <i>ADH2</i> en les soques FY834 i EG2 de <i>S. cerevisiae</i>	113
11.2.1 Estratègia de la deleció	113
11.2.2 Anàlisi de les noves soques	113
11.3 Deleció del gen <i>YAL061W</i> en la soca FY834 de <i>S. cerevisiae</i>	114
11.4 Deleció del gen <i>BDH1</i> en la soca FY61 de <i>S. cerevisiae</i>	115
12. Estudi funcional de la Bdh1p. Paper en el metabolisme del 2,3-butanodiol de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	116
12.1 Expressió de la Bdh1p durant el creixement en medi ric i diferents fonts de carboni	116

12.1.1 Corba de creixement en glucosa al 2%. Determinació de l'activitat específica al llarg del temps	116
12.1.2 Corba de creixement en etanol al 3%. Determinació de l'activitat específica al llarg del temps	118
12.1.3 Corba de creixement en glucosa al 20%. Determinació de l'activitat específica al llarg del temps	120
12.1.4 Concentració de glucosa present el medi a diferents fases de creixement de la soca FY834 en els medis YPD i YP amb glucosa al 20%	121
12.1.5 Corbes de creixement amb diferents fonts de carboni. Expressió de la <i>Bdh1p</i> a diferents fases de creixement	122
12.2 Producció de diferents estereoisòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoïna durant el creixement de les soques FY834, EG2, FY61, FY6160, FYA2 i EGA2 en medi YP amb glucosa al 20%	125
12.2.1 Corbes de creixement dels diferents mutants delecionats en medi YPD	125
12.2.2 Corbes de creixement dels diferents mutants delecionats en medi ric amb glucosa al 20%	127
12.2.3 Anàlisi mitjançant CG-EM dels isòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoïna produïts durant el creixement de les soques FY834 i EG2 en medi ric amb glucosa al 20%	128
12.2.4 Anàlisi mitjançant CG-EM dels isòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoïna produïts durant el creixement de les soques FY834, EG2, FY61, FY6160, FYA2 i EGA2 en medi YP amb glucosa al 20%	130
13. Aplicacions biotecnològiques a la indústria cervesera I. Construcció de soques de laboratori i cerveseres que expressen la <i>Bdh1p</i> mitjançant vectors seleccionables per genètica	132
13.1 Sensibilitat de les soques de llevat S288C i SID als antibiòtics genètica i pleomicina	132
13.2 Construcció de diferents vectors d'expressió de llevat amb resistència a genètica	132
13.2.1 Construcció dels vectors <i>pRSMX</i> i <i>pRSMXY0</i>	133
13.2.2 Construcció dels vectors <i>pAAMX</i> i <i>pAAY0RMX</i>	133
13.2.3 Esquema dels nous vectors construïts	135
13.3 Transformació de les soques de llevat S288C i SID amb els vectors d'expressió seleccionables per genètica. Determinació de les activitats específiques	136
13.4 Fermentacions amb most industrial de 15 ^o P amb la soca industrial SID transformada amb diferents vectors	137
14. Aplicacions biotecnològiques a la indústria cervesera II. Integració del gen <i>BDH1</i> sota el control del promotor fort del gen <i>ADH1</i> en el genoma de les soques S288C i SID	139
14.1 Construcció de la soca modificada SCU60 derivada de la soca de laboratori S288C	139
14.1.1 Esquema de la integració del gen <i>BDH1</i> controlat pel promotor de l' <i>ADH1</i> en el genoma de la soca de <i>S. cerevisiae</i> S288C	139
14.1.2 Clonatge del casset d'expressió de la <i>Bdh1p</i> al vector <i>pUG6</i> i amplificació del mateix amb el marcador de selecció <i>kanMX4</i>	141
14.1.3 Transformació de la soca de <i>S. cerevisiae</i> S288C amb el fragment amplificat a partir del vector <i>pUG6Y0</i> i anàlisi dels clons obtinguts	142
14.1.4 Escissió del marcador de selecció <i>kanMX4</i> per expressió de la <i>Cre</i> recombinasa del bacteriòfag <i>P1</i> en la soca <i>SCUK60</i>	143
14.2 Construcció de la soca modificada SIDU60.4 derivada de la soca de llevat industrial SID	144

14.2.1 Integració del gen <i>BDH1</i> controlat pel promotor de l' <i>ADH1</i> en el genoma de la soca de llevat industrial <i>SID</i> de <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	144
14.2.2 Amplificació per PCR del mòdul d'expressió de la <i>Bdh1p</i> i de la kanamicina flanquejada per les seqüències <i>loxP</i> i transformació de la soca industrial <i>SID</i>	146
14.2.3 Anàlisi de les noves soques de llevat modificades	146
14.2.4 Escissió del marcador de selecció <i>kanMX4</i> per expressió de la <i>Cre</i> recombinasa del bacteriòfag <i>P1</i> en les soques <i>SIDUK60.1</i> i <i>SIDUK60.4</i>	147
14.2.5 Anàlisi mitjançant Southern Blot no radioactiu de la modificació genètica en les soques <i>SIDUK60.1</i> , <i>SIDU60.1</i> , <i>SIDUK60.4</i> i <i>SIDU60.4</i>	153
14.3 Expressió de la <i>Bdh1p</i> en les diferents soques modificades	154
14.4 Fermentacions amb most industrial de 15 ^o P amb la soca de laboratori S288C i la soca de laboratori modificada genèticament SCU60	156
14.5 Fermentacions amb most industrial de 15 ^o P amb la soca de llevat industrial <i>SID</i> i la soca modificada genèticament <i>SIDU60.4</i>	158
DISCUSSIÓ	161
1. La <i>Bdh1p</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pertany a la família de les MDR	161
2. Característiques estructurals i cinètiques de la <i>Bdh1p</i> de <i>S. cerevisiae</i>	163
2.1 Purificació de la <i>Bdh1p</i> de <i>S. cerevisiae</i> . Propietats físico-químiques	163
2.2 Caracterització cinètica de la <i>Bdh1p</i>	163
2.3 Estereoespecificitat de la <i>Bdh1p</i> de <i>S. cerevisiae</i>	164
3. Noves activitats de l'<i>Adh2p</i> de <i>S. cerevisiae</i>	166
4. Funció de la <i>Bdh1p</i> de <i>S. cerevisiae</i>	167
4.1 Expressió de la <i>Bdh1p</i> en diferents fonts de carboni	167
4.2 Estudi dels mutants per els gens <i>BDH1</i> , <i>ADH2</i> i <i>YAL061W</i> durant el creixement en medi ric	168
4.3 Producció dels diferents isòmers de l'acetoïna i del 2,3-butanodiol durant la fermentació alcohòlica. Funció de la <i>Bdh1p</i>	170
5. Aplicacions biotecnològiques de la <i>Bdh1p</i> a la indústria cervesera	174
5.1 Modificació genètica de la soca industrial cervesera <i>SID</i>	174
5.2 L'expressió de la <i>Bdh1p</i> en la soca industrial <i>SID</i> no disminueix els nivells de diacetil i 2,3-pentanodiona durant la fermentació de most de 15 ^o P	176
CONCLUSIONS	179
BIBLIOGRAFIA	183
ANNEX	195
1. Composició del DropOut Mix 10x per el creixement de <i>S. cerevisiae</i> en medi mínim suplementat (SMM)	195
2. Soques utilitzades	195
2.1 Genotip de les soques modificades	195
2.2 Soques i vectors	196
2.3 Mapes de vectors utilitzats	197
3. Estructura dels diferents substrats de la <i>Bdh1p</i>	198
4. Articles	198

ÍNDEX DE TAULES I FIGURES

1. Índex de taules.

Taula 1	-----	Introducció	-----	11
Taula 2	-----	Introducció	-----	15
Taula 3	-----	Introducció	-----	23
Taula 4	-----	Introducció	-----	26
Taula 5	-----	Resultats	-----	89
Taula 6	-----	Resultats	-----	90
Taula 7	-----	Resultats	-----	92
Taula 8	-----	Resultats	-----	95
Taula 9	-----	Resultats	-----	95
Taula 10	-----	Resultats	-----	103
Taula 11	-----	Resultats	-----	107
Taula 12	-----	Resultats	-----	109
Taula 13	-----	Resultats	-----	119
Taula 14	-----	Resultats	-----	120
Taula 15	-----	Resultats	-----	123
Taula 16	-----	Resultats	-----	125
Taula 17	-----	Resultats	-----	128
Taula 18	-----	Resultats	-----	138
Taula 19	-----	Resultats	-----	145
Taula 20	-----	Resultats	-----	149
Taula 21	-----	Resultats	-----	150
Taula 22	-----	Annex	-----	197
Taula 23	-----	Annex	-----	198
Taula 24	-----	Annex	-----	198

2. Índex de figures.

Figura 1	-----	Introducció	-----	3
Figura 2	-----	Introducció	-----	7
Figura 3	-----	Introducció	-----	9
Figura 4	-----	Introducció	-----	12
Figura 5	-----	Introducció	-----	21
Figura 6	-----	Introducció	-----	25
Figura 7	-----	Introducció	-----	28
Figura 8	-----	Introducció	-----	30
Figura 9	-----	Introducció	-----	32
Figura 10	-----	Materials i mètodes	-----	45
Figura 11	-----	Materials i mètodes	-----	58
Figura 12	-----	Materials i mètodes	-----	67
Figura 13	-----	Materials i mètodes	-----	68

Figura 14	-----	Resultats	-----	81
Figura 15	-----	Resultats	-----	81
Figura 16	-----	Resultats	-----	82
Figura 17	-----	Resultats	-----	85
Figura 18	-----	Resultats	-----	89
Figura 19	-----	Resultats	-----	90
Figura 20	-----	Resultats	-----	91
Figura 21	-----	Resultats	-----	91
Figura 22	-----	Resultats	-----	92
Figura 23	-----	Resultats	-----	95
Figura 24	-----	Resultats	-----	97
Figura 25	-----	Resultats	-----	99
Figura 26	-----	Resultats	-----	100
Figura 27	-----	Resultats	-----	101
Figura 28	-----	Resultats	-----	104
Figura 29	-----	Resultats	-----	105
Figura 30	-----	Resultats	-----	108
Figura 31	-----	Resultats	-----	109
Figura 32	-----	Resultats	-----	111
Figura 33	-----	Resultats	-----	112
Figura 34	-----	Resultats	-----	113
Figura 35	-----	Resultats	-----	114
Figura 36	-----	Resultats	-----	115
Figura 37	-----	Resultats	-----	115
Figura 38	-----	Resultats	-----	117
Figura 39	-----	Resultats	-----	117
Figura 40	-----	Resultats	-----	118
Figura 41	-----	Resultats	-----	119
Figura 42	-----	Resultats	-----	120
Figura 43	-----	Resultats	-----	120
Figura 44	-----	Resultats	-----	122
Figura 45	-----	Resultats	-----	123
Figura 46	-----	Resultats	-----	124
Figura 47	-----	Resultats	-----	125
Figura 48	-----	Resultats	-----	128
Figura 49	-----	Resultats	-----	129
Figura 50	-----	Resultats	-----	131
Figura 51	-----	Resultats	-----	133
Figura 52	-----	Resultats	-----	134
Figura 53	-----	Resultats	-----	134
Figura 54	-----	Resultats	-----	135
Figura 55	-----	Resultats	-----	137
Figura 56	-----	Resultats	-----	140
Figura 57	-----	Resultats	-----	141
Figura 58	-----	Resultats	-----	142
Figura 59	-----	Resultats	-----	142
Figura 60	-----	Resultats	-----	144
Figura 61	-----	Resultats	-----	145

Figura 62	-----	Resultats	-----	146
Figura 63	-----	Resultats	-----	146
Figura 64	-----	Resultats	-----	148
Figura 65	-----	Resultats	-----	149
Figura 66	-----	Resultats	-----	149
Figura 67	-----	Resultats	-----	152
Figura 68	-----	Resultats	-----	153
Figura 69	-----	Resultats	-----	155
Figura 70	-----	Resultats	-----	157
Figura 71	-----	Resultats	-----	158
Figura 72	-----	Resultats	-----	159
Figura 73	-----	Discussió	-----	172
Figura 74	-----	Annex	-----	197
Figura 75	-----	Annex	-----	198

ABREVIATURES

°P	Graus Balling
ADH	Alcohol deshidrogenasa
BDH	Butanodiol deshidrogenasa
BSA	Albúmina de sèrum boví
CADH	Cinamil alcohol deshidrogenases
CO ₂	Diòxid de carboni
Da	Dalton
DNA	Àcid desoxiribonuclèic
dNTPs	Desoxiribonucleòtid 5'-trifosfat
DTT	1,4-ditiotreitòl
EBC	European Brewing Convention
FALDH	Formaldehid deshidrogenasa depenent de glutatió
HPLC	"High Performance Liquid Chromatography"
kb	Kilobase
kcat	Constant catalítica
kDa	KiloDalton
Km	Constant de Michaelis
MCS	"Multi-cloning site"
MDR	Deshidrogenases/Reductases de cadena mitja
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleòtid (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtid (forma reduïda)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (forma oxidada)

Abreviatures

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (forma reduïda)
NBT	"Nitroblue" tetrazoli
nm	Nanòmetre
O.D. ₆₀₀	Dispersió òptica a 600 nm
pb	Parell de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDC	Piruvat descarboxilasa
PDH	Poliol deshidrogenases o Piruvat deshidrogenases (segons context)
pI	Punt isoelèctric
PMS	Metasulfat de N-metilfenazoni
ppb	Part per bilió
ppm	Part per milió
psi	0,068 atmosferes
r.p.m.	Revolucions per minut
SDH	Sorbitol deshidrogenasa
SDR	Deshidrogenases/Reductases de cadena curta
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SGD	Saccharomyces Genome Database
U	Unitat internacional d'activitat enzimàtica
Tris	Tris (hidroximetil) aminoetà
VDKs	Dicetones vicinals
Vh	Volt-hora
Y-ADH	Alcohol deshidrogenases de llevat
Zn	Zinc

RESUM

RESUM

La seqüenciació del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* al 1996 va revelar que el 60% dels aproximadament 6000 gens del llevat codificaven per proteïnes de funció desconeguda. Donat que el nostre laboratori investiga l'estructura i funció d'enzims de la superfamília de les deshidrogenases/reductases de cadena mitja (MDR), vàrem realitzar una búsqueda en el genoma del llevat de possibles membres MDR encara no caracteritzats. Es van identificar 12 ORFs, dels quals 5 eren de funció desconeguda. La present tesi doctoral ha estudiat la funció de l'enzim codificat per un d'aquests gens, el *YAL060W*.

S'ha clonat i expressat el gen *YAL060W* de *S. cerevisiae* per determinar l'activitat del seu producte gènic. El gen *YAL060W*, que s'ha anomenat *BDH1*, codifica per una butanodiol deshidrogenasa: la Bdh1p. Aquest enzim pertany a la superfamília enzimàtica de les MDR i és la primera butanodiol deshidrogenasa d'aquesta superfamília descrita en un organisme eucariòtic.

Els principals substrats de l'enzim són l'acetoïna i el 2,3-butanodiol, i a més, és estereoespecífic pels isòmers d'aquests substrats en configuració *R*. Altres substrats de l'enzim són el diacetil i la 2,3-pentanodiona, a més de compostos amb grups diol, dicetona o hidroxicetona contigus. La Bdh1p és un enzim específic pel coenzim NAD(H).

La Bdh1p s'expressa preferencialment a la fase estacionària quan s'escgota la glucosa del medi, així com quan es creix el llevat en fonts de carboni com l'etanol o la galactosa.

S'ha identificat un altre enzim actiu amb diacetil i NADH en els homogenats de *S. cerevisiae* que ha resultat ser l'alcohol deshidrogenasa II (Adh2p). Aquest enzim és també actiu amb 2,3-pentanodiona, però no ho és amb acetoïna o 2,3-butanodiol. La reducció d'aquests compostos també és estereoespecífica però pels grups en configuració *S*.

Durant la fermentació, *S. cerevisiae* produeix i acumula acetoïna i 2,3-butanodiol. La Bdh1p és la responsable de la producció de l'isòmer (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol. La deleció del gen *BDH1* elimina l'acumulació d'aquest compost al medi així com l'activitat

acetoïna reductasa en homogenats de llevat crescut en glucosa. Per tant, durant la fermentació alcohòlica la Bdh1p reduiria l'acetoïna sintetitzada a partir d'acetaldehid per la piruvat descarboxilasa, produint el 2,3-butanodiol. La Bdh1p seria l'enzim responsable d'aquesta branca secundària del metabolisme fermentatiu, que podria contribuir a regular el balanç redox de manera fina.

En canvi la deleció dels gens *ADH2* i *YAL061W* (amb un 51% d'identitat seqüencial amb el *BDH1*) no afecten al patró d'excreció del butanodiol, però es veu reduïda l'activitat diacetil reductasa en un 58% en fase exponencial i un 34% a la fase estacionària.

Diacetil i 2,3-pentanodiona, també anomenats VDKs, són compostos organolèptics indesitjables que es produeixen durant la fabricació industrial de cervesa i que són eliminats durant un llarg període de maduració. Les VDKs són substrats de la Bdh1p, el que donava la possibilitat de que soques de llevat que sobreexpressessin la Bdh1p acceleressin l'eliminació d'aquests compostos i poguessin reduir el temps de maduració de la cervesa. Per això es va sobreexpressar la Bdh1p sota el control del promotor *ADH1* en la soca industrial cervesera SID amb vectors centromèrics i multicòpia. Aquestes soques disminuïen, en certes condicions, l'acumulació de VDKs durant la fermentació del most. També es va modificar genèticament la mateixa soca industrial per tal de sobreexpressar la Bdh1p de manera estable, però la fermentació de most industrial amb aquesta soca modificada no va afectar els nivells d'acumulació de VDKs al medi. Les aplicacions biotecnològiques es varen estudiar amb la participació de l'empresa S.A. Damm.

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. Alcohol deshidrogenases.

Les alcohol deshidrogenases (ADHs) són enzims pertanyents a la classe enzimàtica de les oxidoreductases i tenen la propietat de catalitzar la oxidació reversible d'alcohols als corresponents aldehids o cetones amb la consegüent reducció del coenzim NAD(P)⁺ (Figura 1). Es troben en tots els regnes dels organismes vius, des dels procariotes fins als eucariotes superiors (Jörnvall, i cols., 1987).



FIGURA 1: Reacció genèrica de les alcohol deshidrogenases.

Les alcohol deshidrogenases es poden classificar en tres superfamílies enzimàtiques:

1. Deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDR) (Jörnvall i cols., 1995), on s'hi inclou l'alcohol deshidrogenasa de *Drosophila melanogaster*.

2. Alcohol deshidrogenases "activades per ferro". Es troben representades per l'alcohol deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis* (Conway i cols., 1987).

3. Deshidrogenases/reductases de cadena mitja (MDR) (Jörnvall i cols., 1987, Persson i cols., 1994). S'han identificat més de 1.000 membres en aquesta superfamília, presentant molts d'ells un àtom de zinc amb funció catalítica en el centre actiu, algunes altres, sobretot les ADHs dimèriques de vertebrats i plantes, tenen un segon àtom de zinc amb funció estructural (estabilitzant un *loop* extern present en la seva estructura) (Nordling i cols., 2002). En l'apartat 2 s'ampliaran les característiques d'aquesta superfamília per la seva important participació en el metabolisme fermentatiu de *Saccharomyces cerevisiae*, organisme d'estudi del present treball.

1.1 Deshidrogenases/Reductases de cadena curta (SDR).

Els enzims de la superfamília de les deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDR) són proteïnes NAD(P)H dependents compostes de 250-350 residus organitzats en

un sol domini. Poden tenir segments transmembranals als extrems N o C de la proteïna, tenir pèptids senyal o formar part de complexes multienzimàtics (Kallberg i cols., 2002a). En aquest grup hi ha proteïnes amb funcions diverses: esteroïd deshidrogenases, 2,3-butanodiol deshidrogenases... que abarquen diferents classes enzimàtiques des de les oxidoreductases fins a les liases o topoisomereses, essent les oxidoreductases les majoritàries del grup (Jörnvall i cols., 1995).

Fins el moment hi ha identificades unes 3.000 formes de SDR on s'hi inclouen les variants d'espècie presents en tots els regnes de la Natura (Kallberg i cols., 2002b, Oppermann, i cols., 2002). Només presenten una identitat de seqüència entre elles del 15% al 30%, indicant una divergència temprana en l'evolució, però mantenen el seu patró de plegament, de manera que l'estructura tridimensional resolta de 27 membres de la superfamília tenen l'esquelet carbonat superposable entre ells (Ghosh i cols., 2001, Oppermann i cols., 2002).

Es conserven diferents motius seqüencials, com els motius TGxxxGxG i NNAG en la regió d'unió al coenzim o plegament Rossman (Rossman i cols., 1974) que són importants per mantenir l'estructura de la fulla β central del motiu i que es troba localitzat a l'extrem N-terminal de la proteïna. Per una altra banda es conserva la seqüència T₁₅₁xxxK₁₅₅ (nomenclatura de la $3\beta/17\beta$ -hidroxiesteroïd deshidrogenasa de *C. testosteron*) i els residus Ser 138 i Asn 111, que formen una tètrada catalítica en el centre actiu (Jörnvall i cols., 1995, Oppermann i cols., 2002).

Els membres de la superfamília de les SDR presenten un ampli espectre d'activitats i de substrats. Utilitzen compostos com els esteroides, alcohols, sucres i compostos aromàtics o xenobiòtics. Basant-se en la conservació dels diferents motius de seqüència es distingeixen famílies enzimàtiques dins de la superfamília de les SDR: clàssiques, extenses, intermitges, divergents i complexes (Persson i cols., 1995, Kallberg i cols., 2002a). Aquesta classificació pretén sistematitzar la nomenclatura i classificació dels diferents membres d'aquesta àmplia superfamília, on s'hi inclouen noves seqüències dia rere dia.

1.2 Alcohol deshidrogenases “activades per ferro”.

Aquesta és una família d'alcohol deshidrogenases NAD(P)-depenents que té pocs membres identificats (Reid i cols., 1994, Ruzheinikov i cols., 2001). Les primeres proteïnes que se'n va determinar la seva estructura primària van ser l'alcohol deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis* (ADH II) que utilitza ferro per a la seva activitat (Conway i cols., 1987) i l'ADH IV (o Adh4p) de *Saccharomyces cerevisiae* (Williamson i Paquin, 1987). Recentment s'ha identificat l'*adh4* de *Schizosaccharomyces pombe* com enzim homòleg de les anteriors (Sakurai i cols., 2004). Però tot i l'ús del nom d'ADHs “activades per ferro”, el que s'ha vist és que són enzims que requereixen ions divalents per a la seva activitat, alguns utilitzen ferro, mentre que altres necessiten zinc. Per això, Ruzheinikov i col·laboradors (2001) proposen canviar el nom de la superfamília pel de família III de poliol deshidrogenases metall-depenents.

Les subunitats generalment tenen 380-390 aminoàcids, però en poden tenir més. Presenten una baixa identitat de seqüència entre elles (aproximadament del 15%), però es manté en major proporció el plegament tridimensional. En base a l'estructura tridimensional de la glicerol deshidrogenasa de *B. stearothermophilus* es coneix que la subunitat de l'enzim està organitzada en dos dominis que formen una butxaca profunda on s'hi troba l'àtom de zinc, el NAD⁺ i el substrat (Ruzheinikov i cols., 2001). L'extrem N-terminal presenta una variant del plegament de Rossmann i es conserva un segment ric en glicines. També es conserven els tres lligands del zinc que són l'Asp174, i les His256 i His274, essent el quart una molècula d'aigua. Els residus d'unió al substrat varien més degut a la diversitat de funcions que hi ha entre els diferents membres de la família. Finalment, l'estructura quaternària difereix bastant entre ells presentant-se dímers, tetràmers, i fins i tot octàmers com en el cas de la glicerol deshidrogenasa de *B. stearothermophilus*.

2. Deshidrogenases/Reductases de cadena mitja (MDR).

La superfamília de les alcohol deshidrogenases de cadena mitja (MDR) ha estat intensament estudiada. Aquesta superfamília conté representants en tots els regnes de la naturalesa i inclou uns 1.000 membres amb diferents activitats enzimàtiques, alguns fins i tot, no presenten cap activitat catalítica coneguda. Els enzims de la superfamília

de les MDR tenen uns 350 residus de mitja i presenten diferents localitzacions subcel·lulars, diferent filogènia i diferent distribució entre espècies (Nordling i cols., 2002, Riveros-Rosas i cols., 2003).

2.1 Classificació dels membres de les MDR en famílies i subfamílies.

Recentment, i gràcies a la seqüenciació completa del genoma de moltes espècies s'ha analitzat en profunditat l'origen i la classificació de la superfamília de les MDR. En les darreres propostes de classificació de les MDR en famílies i subfamílies s'ha tingut en compte incloure les anotacions funcionals i de taxonomia que acompanyen les seqüències en els bancs de dades. Segons això, Riveros-Rosas i cols. (2003) defineixen una **família enzimàtica** com un conjunt de subfamílies enzimàtiques que presenten una identitat de seqüència i/o similaritat entre si major que amb qualsevol altra proteïna pertanyent a una altra família enzimàtica. Això porta a definir una **subfamília proteica** com un conjunt de proteïnes homòlogues que realitzen la mateixa funció, i que formen un grup amb identitat de seqüència (aproximadament del 30%) i/o similitud estadísticament més elevat al que presenten amb qualsevol altra proteïna que s'inclogui en una altra subfamília.

En la Figura 2 podem veure la classificació de les MDR d'organismes eucariotes. De manera anàloga, es pot obtenir un arbre similar amb les MDR de procariotes o amb totes les seqüències a l'hora, on la distribució de les subfamílies és equivalent (Riveros-Rosas i cols., 2003).

La **macrofamília I** es troba composta de 7 subfamílies agrupades en 2 famílies enzimàtiques: la família de les alcohol deshidrogenases (ADH) i la de les poliol deshidrogenases (PDH). En la família de les ADH s'inclouen les ADH clàssiques d'animals i plantes sense homòlegs en arqueobacteries. Generalment, són citoplasmàtiques excepte la classe III que en animals i *S. cerevisiae* també es detecta en nucli (Iborra i cols., 1992; Fernández i cols., 2003). Totes contenen zinc, són homodímers i uneixen NAD(H), a excepció de l'ADH8 de *Rana perezi* que uneix NADP(H) (Peralba i cols., 1999 i Rossell i cols., 2003). Participen en el catabolisme i a més de metabolitzar etanol, les ADH d'animals són actives amb substrats endògens involucrats en la síntesi de l'àcid retinòic, d'àcid biliar, serotonina, dopamina, etc. (Riveros-Rosas i cols., 1997).

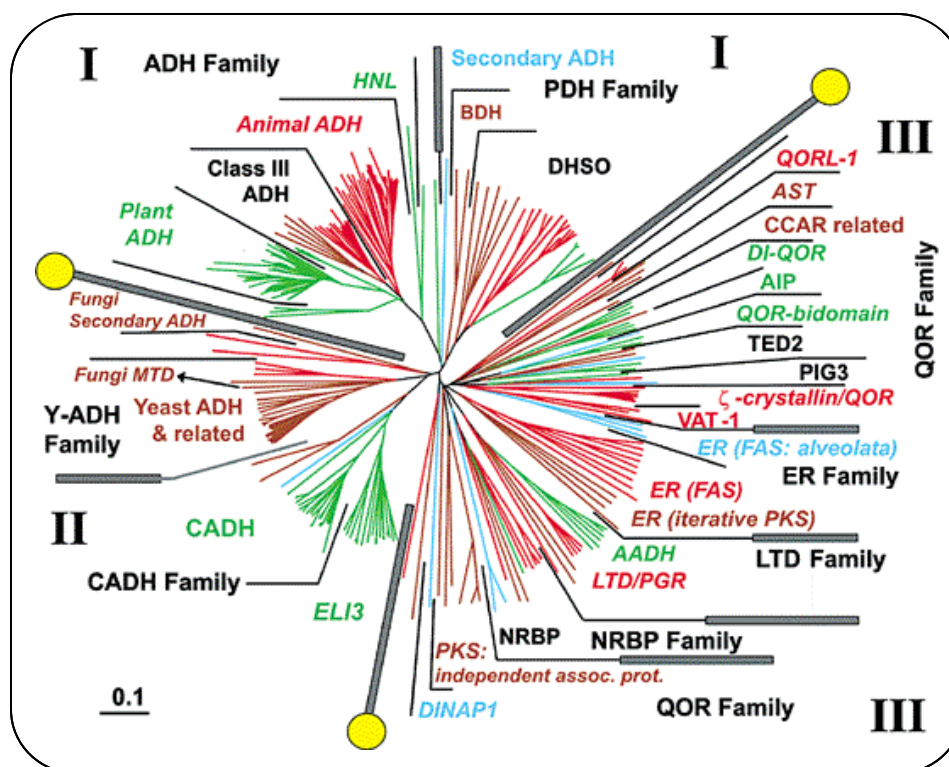


FIGURA 2: Arbre filogenètic sense arrel construït amb 328 seqüències proteiques de la família de les MDR d'organismes eucariotes. Els colors identifiquen el regne al qual pertanyen les seqüències: vermell per animals, verd per plantes, marró per fongs i blau per protistes. En l'arbre hi ha identificades les tres macrofamílies amb nombres romans (cluster de famílies) i el nom de cada família i subfamília es troben abreujats. Les ratlles grises marquen els límits de les famílies, i les que contenen un cercle groc marquen el límit de les macrofamílies. Les subfamílies que es troben en només un dels regnes es designen en cursiva (Riveros-Rosas i cols., 2003). *Abreviacions:* AADH, allyl alcohol deshidrogenasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; AST, proteïna de tràfic de membrana; BDH, 2,3-butanodiol deshidrogenasa; CADH, cinamil alcohol deshidrogenasa; CCAR, crotonil-CoA reductasa; DHSO, sorbitol deshidrogenasa; DINAP, proteïna associada a nucli de dinoflagelats; DI-QOR, quinona oxidoreductasa induïda per fosc; ELI3, proteïnes associades a defensa induïbles per elicitors; ER, enoil reductases; FAS, sintases d'àcids grassos; HNL, hidroxinitril liasa; LTD, leucotriè B₄ 12-deshidrogenasa; NRB, proteïna d'unió a receptors nuclears; PDH, poliol deshidrogenases; PGR, 15-oxoprostaglandina 13-reductasa; PIG3, gen animal induït per p53; PKS, poliketid sintasa; QOR, quinona oxidoreductasa; QORL-1, quinona oxidoreductasa like; TED2, quinona oxidoreductasa involucrada en la diferenciació traqueal de plantes.

La **macrofamília II** es compon de 6 subfamílies enzimàtiques agrupades en 2 famílies enzimàtiques: les ADH de llevat, les cinamil alcohol deshidrogenases (CADH) i enzims relacionats. Les CADH són enzims amb zinc i dimèrics, que utilitzen NADP(H). Participen en la biosíntesi de cinamil alcohols que s'utilitzen en la síntesi de la lignina de les plantes, i en bacteris participen en la síntesi de lípids de membrana. En llevats podrien participar en la lignolisi o en la síntesi d'alcohols superiors (amilalcohol, isoamilalcohol, etc.) (Larroy i cols., 2002 a i b). Una altra subfamília ben coneguda és la de les alcohol deshidrogenases de llevat (Y-ADH). Com en el cas anterior també contenen zinc i uneixen NAD(H). Participen en el metabolisme de l'etanol i d'alcohols de cadena curta.

La **macrofamília III** és la més heterogènia de totes. Composta per 4 famílies i 16 subfamílies, cap d'elles conté zinc per a la seva funció i la majoria uneixen NADP(H) com a cofactor. Dins d'aquest grup trobem proteïnes amb i sense activitat enzimàtica. S'hi inclouen les quinones oxidoreductases, les ξ -cristal·lí, les enoil reductases o les proteïnes d'unió a receptors nuclears entre d'altres.

Aquesta classificació, tot i ser més acurada, és similar a la obtinguda per Nordling i cols. (2002), on s'identifiquen, analitzen i classifiquen diferents membres de la superfamília de les MDR de 6 genomes d'organismes eucariotes seqüenciats (*Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Escherichia coli*). La divisió que més s'emfatitza és la divisió entre MDR que uneixen zinc o no. Comparant amb la classificació anterior es pot observar que la macrofamília III proposada per Riveros-Rosas i cols. (2003) correspon al conjunt de famílies que no uneixen zinc en la classificació de Nordling i cols. (2002). La presència o no de zinc és doncs, un dels aspectes importants a tenir en compte quan s'intenta classificar un nou membre de les MDR.

2.2 Les MDR amb Zn.

En el conjunt de les MDR amb Zn s'hi inclouen les famílies de les ADH de vertebrats i plantes (també anomenades clàssiques o dimèriques), les ADH de llevat, les cinamil alcohol deshidrogenases (CAD), i les poliol deshidrogenases (PDH) (Nordling i cols., 2002, Riveros-Rosas i cols., 2003). Els membres d'aquestes famílies presenten aproximadament un 20% d'identitat seqüencial entre ells i variades funcions, però conserven una elevada homologia estructural de manera que un mateix plegament proteic es pot fer servir per un elevat nombre de funcions diferents (Edwards i cols., 1996). Tot i compartir estructura terciària, es donen diferències en l'estructura quaternària doncs existeixen dímers i tetràmers, representats per les ADH de cavall i de llevat respectivament.

Les subunitats de totes les MDR estan organitzades en dos dominis, el domini d'unió a coenzim i el domini d'unió a substrat (Figura 3). Es conserven els diferents motius estructurals secundaris, i les principals diferències recauen en els *loops* i regions que connecten els diferents elements estructurals, on es poden trobar el major nombre d'insercions i delecions (Edwards i cols., 1996). Els dos dominis formen una esclatxa

profunda on s'hi acomoden substrat i coenzim. Un domini uneix el coenzim (residus 175 fins al 318 segons la nomenclatura de l'estructura de la isoforma E de l'ADH de cavall), l'altre dóna lligands al zinc catalític i, en cas de tenir-ne, també al zinc estructural, a més de contenir els grups que controlen la unió i catàlisi del substrat (residus 1-174 i 319 a 374) (Eklund i Brändén, 1987). Mitjançant un alineament de 47 proteïnes de la superfamília de les MDR, on s'hi inclouen enzims sense zinc, es trobaren 9 residus conservats en totes elles (Sun i Plapp, 1992); 8 eren glicines, i l'altre una valina.



FIGURA 3: El model d'ADH en forma dimèrica pertany a l'ADH humana. L'estructuració de la cadena d'aminoàcids en hèlix α es presenta de color vermell i en làmina β de color verd. També es mostren els àtoms de zinc (lila) i dues molècules de coenzim (verd) situades en el domini d'unió del coenzim de cada una de les subunitats de la proteïna. En primer plànol (quadre blanc) es veu el zinc estructural d'una de les subunitats localitzat en un *loop* força variable entre els diferents membres de les MDR. Així mateix també es mostra l'extrem N-terminal i l'extrem C-terminal d'una de les subunitats. La figura va ser creada amb el programa ICM (Molsoft LLC).

El domini catalític està comprès majorment per fulles β on es conserven cinc dels 9 residus conservats en l'alienament anterior: les glicines 66, 71, 77 i 86, i la valina 80 (segons la nomenclatura de l'ADH E de fetge de cavall, la primera en ser cristal·litzada), tots ells compresos en un fragment de 21 aminoàcids.

Al domini d'unió a coenzim es troben força conservades les altres quatre glicines, totes localitzades en un fragment de 54 residus i en les posicions 192, 201, 204 i 236 (Sun i Plapp, 1992), en l'estructura de 6 fulles β paral·leles flanquejades per α hèlixs descrita per Rossmann i cols. al 1974. També pertany al domini d'unió a coenzim l'aspàrtic 223, força conservat en la família, implicat en l'especificitat pel coenzim NAD^+ .

En canvi, enzims que prefereixen el NADP(H) acostumen a tenir un residu positiu o neutre en aquesta posició, doncs la cadena lateral de l'Asp223 interferiria estèrica i electrostàticament amb el grup fosfat extra del NADP. Un exemple d'enzim dependent de NADP(H) és l'ADH8 de *Rana perezzi*, que presenta una glicina en la posició 223, a més de canviar el residus conservats Ile/Leu224 i Asn225 pels residus Thr224 i His225 (Rossell i cols., 2003), creant un entorn més adient per a la unió del fosfat.

Els enzims poden coordinar 1 o 2 àtoms de zinc, essent el zinc estructural menys conservat que el zinc catalític. L'àtom de zinc catalític té tres lligands que pertanyen a la cadena polipeptídica, mentre que el quart és una molècula d'aigua que queda desplaçada en coordinar-se el substrat. Els residus que coordinen el zinc a l'ADH-E de cavall són les cisteïnes 46 i 174, i la histidina 67. La posició 174 és la més variable essent bastant comú trobar un glutàmic en les sorbitol deshidrogenases (SDH) (Johansson, K. i cols., 2001). Un aspàrtic a la posició 174 es troba en la treonina deshidrogenasa de *E. coli*, i en les ADH d'*A. euthorpus* i *T. Brokii*. A part d'aquests residus es conserven l'aspàrtic 49 (glutàmic a l'ADH6 humana) i el glutàmic 68, que formen una segona esfera de coordinació del zinc catalític (Sun i Plapp, 1992, Edwards i cols., 1996).

En referència al zinc estructural la seva presència és variable. En aquelles que el presenten es conserven quatre cisteïnes: 97, 100, 103 i 111, que es troben en un *loop* superficial sense estructura secundària definida. S'ha proposat que el zinc estructural participa en l'estabilització del *loop* on està coordinat (figura 3, quadre blanc), que es troba proper a la zona d'interacció entre les subunitats de l'enzim. En les proteïnes que presenten el zinc estructural, aquest contribueix a mantenir la regió on es troba en la orientació correcta perquè es puguin realitzar les interaccions entre les subunitats de l'enzim i, d'aquesta manera, contribuir al manteniment de l'estructura quaternària (Karlsson i cols., 1995).

En quant a l'estructura quaternària cal dir que podem trobar dímers, essent les ADH de vertebrats i plantes els principals exemples, i tetràmers amb les ADH de llevat com a representants. Els dímers, com el presentat en la Figura 3, es formen per interaccions hidrofòbiques entre les 6 fulles β del domini d'unió a coenzim de cada

subunitat, de manera que es crea una estructura compacta de 12 fulles β antiparal·leles amb els dominis catalítics de cara a l'exterior (Eklund i cols., 1976).

2.3 Poliol deshidrogenases (PDH).

Les poliol deshidrogenases formen un grup heterogeni on menys de la meitat dels seus membres posseeixen alguna activitat relacionada amb el metabolisme dels poliols. Els enzims més característics d'aquesta família són les sorbitol deshidrogenases (DHSO/SDH) i les treonina deshidrogenases (TDH), però també es troben els enzims 2,3-butanodiol deshidrogenases (BDH), sorbosa-1-fosfat deshidrogenasa (SORE) i l'ADH secundària entre altres. Les PDH es troben presents en tots els regnes de la naturalesa (Taula 1) (Riveros-Rosas i cols., 2003).

Taula 1

Principals subfamílies que componen la família de les PDH de les MDR

Nom	Activitat	Regnes
DHSO/SDH	sorbitol deshidrogenasa	B, F, PL, AN
BDH	2,3-butanodiol deshidrogenasa	B, F
TDH	treonina deshidrogenasa	A, B
BCHC	2-desacetil-2-hidroxiethyl bacterioclorofil·la a deshidrogenasa	B
SORE	L-sorbosa-1-fosfat deshidrogenasa	B
ADH secundària	alcohol deshidrogenasa secundària	B, P
GATD	galactitol-1-fosfat deshidrogenasa	B
SSP i relacionades	sensing starvation protein	B
FDEH	5-exo-hidroxicamfor deshidrogenasa	B
BDOR	oxidoreductasa bi-domini	B
GDH	glucosa deshidrogenasa	A
FADH	formaldehid deshidrogenasa independent de cofactor/formaldehid dismutasa	A, B

Abreviacions dels diferents regnes: A, arqueobacteris; B, eubacteris; F, fongs; P, protistes; PL, plantes; AN, animals. Taula obtinguda de Riveros-Rosas i cols., 2003.

Els diferents membres caracteritzats d'aquesta família contenen, generalment, un àtom de zinc i en alguns casos dos (cetosa reductasa de *Bemissia argentifolii*), presenten activitats deshidrogenasa o reductasa, generalment uneixen NAD(H) i acostumen a ser enzims citosòlics. Poden organitzar-se en dímers o tetràmers i es troben involucrades en diferents vies metabòliques implicades en el catabolisme d'aril/alquil alcohols (ADH, BDH...), del formaldehid, de carbohidrats (DHSO, SORE, GATD i GDH) i de la treonina i derivats (TDH i SSP).

El membre més conegut i àmpliament estudiat de la família és la sorbitol deshidrogenasa (DHSO o SDH). Presenten SDH des dels bacteris fins els humans i l'identitat de seqüència entre elles és del 81,2 al 99,7% (Nordling i cols., 2002). Recentment s'ha resolt l'estructura tridimensional de la SDH de rata (Johansson i cols., 2001) on queden paleses les característiques diferencials respecte de les ADH clàssiques. La principal característica de la SDH és la seva estructura quaternària: és un homotetràmer format per un dímer de dímers (Figura 4).

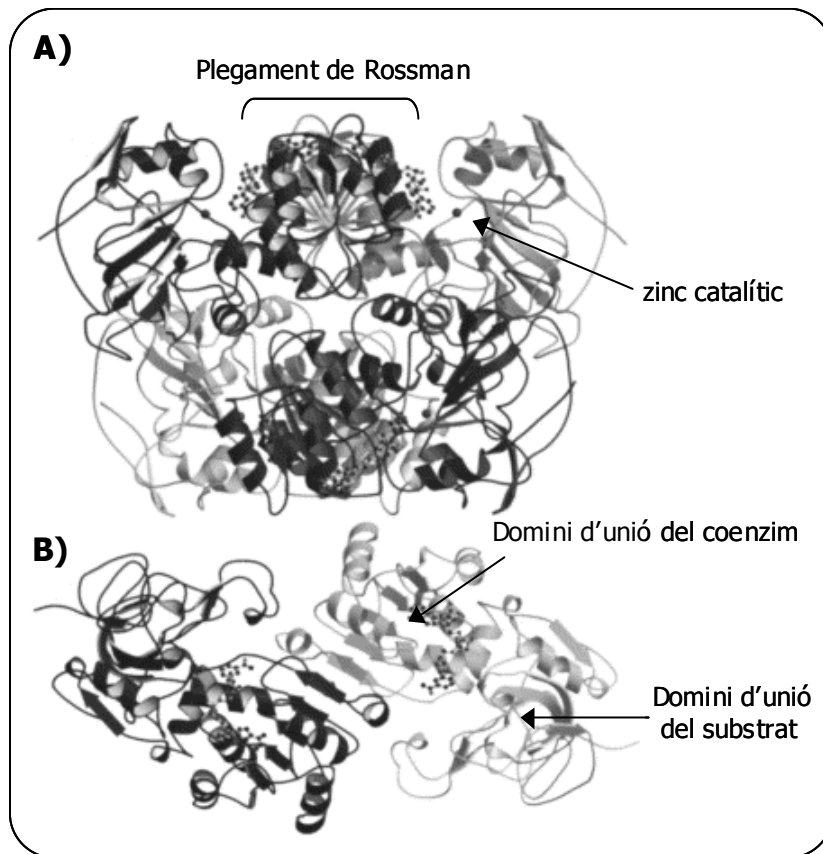


FIGURA 4: Estructura tridimensional de la SDH de rata (Johansson i cols., 2001).

A) Estructura del tetràmer on s'observa l'estructura dels dos dímers, un a la part superior i l'altre a la part inferior. Les entrades al centre actiu, on s'indica la posició del zinc catalític, queden a l'exterior i les interaccions entre els dímers es realitzen per la cara oposada.

B) Estructura del dímer, molt similar al de les ADH clàssiques, on es mostra el domini d'unió del coenzim amb una molècula de NAD^+ unida, i el domini d'unió del substrat.

Els tetràmers de la SDH (Figura 4A) estan compostos de dos dímers que interaccionen per la banda oposada a l'entrada del centre actiu, essent interaccions per pocs ponts d'hidrogen entre cadenes laterals de les subunitats que mantenen l'estructura. La unió del tetràmer és més dèbil que la del dímer, doncs hi ha molt

poques interaccions hidrofòbiques en l'àrea de contacte. Al centre del tetràmer s'observa una cavitat on s'hi troben residus polars.

L'estructura del dímer és molt similar al de les ADH clàssiques (Figura 4B), conté el domini d'unió a substrat i d'unió al coenzim i només difereix en la coordinació del zinc catalític, l'entrada del substrat i la regió on l'ADH conté el zinc estructural, absent en la SDH. La coordinació del zinc es realitza pels residus Cys44, His69 i Glu155, essent aquest darrer un residu diferent al de les ADH clàssiques, i que ha estat confirmat per mutagènesi dirigida (Karlsson i Höög, 1993). L'entrada del substrat al centre actiu és una cavitat polar i conté diferents residus localitzats de manera que ancoren la molècula de sorbitol per realitzar la catàlisi.

En un estudi de modelatge a gran escala (Nordling i cols., 2002), es calcula que el volum del centre actiu és gran en els membres de la família de les PDH, i varia entre 77 i 257 Å³ segons el tipus d'enzim. Així, les SDH presenten els majors volums del centre actiu, adaptats als substrats voluminosos (sorbitol, iditol, xilitol...) i disminueix en les BDH on els substrats són més petits (2,3-butanodiol, acetoina, etc.). En totes elles el centre actiu és bastant polar i es conserven els residus que el conformen, presentant petites variacions entre enzims amb diferents especificitats.

Les butanodiol deshidrogenases (BDH) estan incloses en aquest grup. Tot i tenir accés a un gran nombre de genomes d'organismes eucariotes i de diferents regnes (*C. elegans*, *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *A. thaliana*), totes les BDH de la superfamília de les MDR que s'han trobat fins el moment són bacterianes, excepte els codificats pels gens *BDH1* i *YAL061W* de *S. cerevisiae*, objectiu d'aquesta tesi (Nordling i cols., 2002, Riveros-Rosas i cols., 2003).

3. Les MDR amb Zn de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1 Búsqueda d'enzims MDR amb Zn en el genoma de *S. cerevisiae*.

L'abril de 1996 es va fer públic a Internet la seqüència sencera del genoma del llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau i cols., 1996), on un 60% dels ORF determinats corresponien a gens amb funció desconeguda, de manera que era probable que entre ells es trobessin ADHs de la superfamília de les MDR. Per tal d'identificar nous

enzims ADH en el llevat es va realitzar una búsqueda en el banc de dades del genoma de *S. cerevisiae* (Yeast Genome Database –SGD-, www.yeastgenome.org) utilitzant una seqüència conservada en les MDR que uneixen zinc: GHExxGxxxxx(G,A)xx(I,V,A,C,S) (Sun i Plapp, 1992, Edwards i cols., 1996). La seqüència correspon a una zona on es troben les glicines 66, 71 i 77, a més de la valina 80, situades al domini catalític. En aquesta regió també s'hi troba la histidina 67, un dels lligands de l'àtom de zinc catalític, i el glutàmic 68, que constitueix un dels lligands que creen la segona esfera de coordinació del zinc catalític (Sun i Plapp, 1992).

La búsqueda va trobar 12 seqüències. Vuit de les proteïnes corresponents tenien funció coneguda, mentre que la resta s'han caracteritzat recentment al nostre laboratori (González i cols., 2000 i 2001, Larroy i cols., 2002a i b). Posteriorment, Jörnvall i cols. (1999) van identificar 5 membres més de la superfamília MDR en llevat, enzims dependents de NADP(H) per la seva funció i que no contenen àtoms de zinc.

3.2 El sistema alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

La importància de les alcohol deshidrogenases (ADHs) de les MDR en el metabolisme del llevat, recau en que són les responsables del metabolisme de l'etanol i permeten la coordinació entre el metabolisme fermentatiu (producció d'etanol) i el metabolisme oxidatiu del carboni (assimilació de l'etanol), de manera que les fonts de carboni presents al medi s'aprofiten al màxim. Així doncs, a altes concentracions de sucres al medi (ja sigui en presència o absència d'oxigen) la fermentació alcohòlica es troba activa i l'enzim ADH I (o Adh1p en la nomenclatura sistemàtica) redueix l'acetaldehid a etanol per regenerar el NAD⁺ produït durant la glicòlisi. Quan ja s'ha utilitzat tot el sucre assimilable del medi i en presència d'oxigen, comença la oxidació de l'etanol a acetaldehid, en aquest cas per acció de l'ADH II (o Adh2p), que utilitza NAD⁺ i genera NADH (Ciriacy, 1997). L'acetaldehid obtingut s'oxida a acetat per les aldehyd deshidrogenases (Ald6p i Ald4p) i l'acetat pot donar Acetil-CoA (per l'Acs1p), necessari pel creixement del llevat (Figura 5).

3.2.1 Adh1p i Adh2p.

Els enzims Adh1p i Adh2p tenen 347 aminoàcids i presenten una identitat de seqüència del 93%, diferint només en 22 aminoàcids. Tot i que s'han obtingut cristalls

de l'Adh1p, encara no s'ha resolt la seva estructura tridimensional (Ramaswamy i cols., 1994), però es coneix que ambdós són enzims tetramèrics i citosòlics (Ciriacy, 1975 i Wills i Jörnvall, 1979). Uneixen dos àtoms de zinc per subunitat, i es creu que l'estructural estabilitza l'estructura terciària dels enzims (Magonet i cols., 1992). Com en el cas de la SDH (apartat 2.3) els enzims Adh1p i Adh2p presenten una deleció en un *loop* superficial on l'ADH E de cavall presenta el zinc estructural, regió per on s'associen els dos dímers per formar l'estructura tetramèrica (Johansson i cols., 2001).

Taula 2

Constants cinètiques de les diferents alcohol deshidrogenases de *S. cerevisiae*

	Adh1p			Adh2p			Adh3p		
	Km (mM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Km (mM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Km (mM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Etanol	17	340	20	0,81	130	160	12	450	37,5
NAD ⁺	0,17			0,11			0,24		
Acetaldehid	1,1	1700	1540	0,09	1040	11550	0,44	2100	4770
NADH	0,11			0,05			0,07		

Les activitats estan determinades en fosfat potàssic 83 mM i KCl 40 mM a pH 7,3 i 30°C. Dades de Ganzhorn i cols., 1987 i recollides i revisades a Leskovac i cols., 2002.

Tot i que l'Adh1p i l'Adh2p tinguin una alta identitat de seqüència, els valors de Km pels substrats i cofactors (tant reduïts com oxidats) difereixen bastant entre ells, essent els valors de Km per l'etanol i l'acetaldehid inferiors per l'Adh2p (Taula 2) (Wills, 1976, Ganzhorn i cols., 1987). L'Adh3p (apartat 3.2.2) es comporta cinèticament de manera similar a l'Adh1p, excepte que la seva localització és mitocondrial. L'Adh2p presenta els valors d'eficiència catalítica (kcat/Km) més alts de tots tres isoenzims ADH de *S. cerevisiae*. Així, les Km de l'Adh2p per l'etanol i l'acetaldehid són unes 20 vegades més petites de les que presenta l'Adh1p, en canvi, la constant catalítica per l'etanol és dues vegades superior per aquest últim (340 s⁻¹ vs. 130 s⁻¹).

L'activitat de l'Adh1p i l'Adh2p amb diferents alcohols primaris varia segons la longitud de les cadenes alifàtiques que presentin. Així els enzims mostren màxima activitat envers l'etanol, activitat que disminueix a mida que augmenta el nombre de carbonis fins al pentanol, i llavors torna a augmentar fins que s'observa un altre pic de màxima activitat amb el decanol (Dickinson i Dack, 2001).

L'Adh1p, codificada per el gen *ADH1*, és l'enzim utilitzat durant el creixement fermentatiu que catalitza la conversió de l'acetaldehid en etanol, essent expressat

preferentment en presència de glucosa (Denis i Young, 1983). Soques de llevat on s'ha deletionat el gen *ADH1* creixen lentament en glucosa, produeixen nivells baixos d'etanol i acumulen acetaldehid, acetat i glicerol (Ciriacy, 1976, Wills i Jörnvall, 1979 i Drewke i cols., 1990). Els nivells d'Adh1p augmenten de 5 a 10 vegades en presència de glucosa o altres sucres fermentables i l'augment d'expressió proteica està relacionada amb l'augment en la quantitat de mRNA de l'enzim (Denis i cols., 1983).

L'Adh2p, codificada pel gen *ADH2*, permet l'ús de l'etanol com a font de carboni per *S. cerevisiae*. Aquesta utilització de l'etanol per créixer va relacionada amb una desrepressió del gen *ADH2* de 100 vegades (Ciriacy, 1975) respecte a l'expressió en glucosa. El principal activador de l'Adh2p és l'Adr1p. Aquest és un factor de transcripció que s'uneix al gen *ADH2* per una seqüència palindròmica de 22 nucleòtids (Thukral i cols., 1991). Per a l'expressió total de l'Adh2p també és necessari l'activador Cat8p (Hedges i cols., 1995), que reconeix la seqüència d'unió general anomenada CSRE ("carbon source-responsive element") (Gancedo, 1998) necessària per permetre el creixement de *S. cerevisiae* en fonts de carboni no fermentables. Adr1p i Cat8p activen sinèrgicament el gen *ADH2*, de manera que ambdós contribueixen a la seva expressió (Walther i Schüller, 2001).

3.2.2 Adh3p.

L'Adh3p es sintetitza com una proteïna de 375 aminoàcids on els 28 de l'extrem N-terminal constitueixen una pre-seqüència que la dirigeix a mitocondri. Allà s'escindeix aquesta cua deixant una proteïna madura de 347 aminoàcids (Young i Pilgrim, 1985, Van Loon i Young, 1986).

Presenta una identitat de seqüència d'un 80% amb les Adh1p i Adh2p, sense considerar els 28 aminoàcids de l'extrem N-terminal de l'Adh3p, pel que s'ha inferit que la seva estructura també és tetramèrica. Conté els residus implicats en la unió dels dos àtoms de zinc per subunitat i les seves constants cinètiques són molt semblants a les de l'Adh1p (Taula 2, Ganzhorn i cols., 1987). També s'indueix fins a 3 vegades durant el creixement en glucosa (Young i Pilgrim, 1985).

Recentment s'ha demostrat el paper de l'Adh3p en la llançadora etanol-acetaldehid, funcional durant el creixement anaeròbic (figura 6) i, per tant, important

pel manteniment del balanç redox durant la fermentació alcohòlica (Bakker i cols., 2000).

3.2.3 *Adh4p*.

Existeix una quarta alcohol deshidrogenasa activa amb etanol que està codificada al gen *ADH4*. La proteïna, *Adh4p*, està formada per 465 aminoàcids, té una estructura dimèrica i no té cap relació amb les proteïnes de la família de les MDR. Presenta homologia amb el gen *ADH2* de *Zymomonas mobilis*, que pertany a la família de les alcohol deshidrogenases activades per ferro, però a diferència d'aquesta, l'*Adh4p* no s'activa per ferro, sinó per zinc (Williamson i Paquin, 1987).

Aquesta ADH no s'expressa en condicions estàndard de creixement, tot i que sembla que s'expressa en algunes soques cerveseres (Drewke i Ciriacy, 1988). Requereix NAD^+ com coenzim i mostra un màxim d'activitat amb etanol, la qual disminueix amb alcohols lineals llargs. Tampoc mostra activitat amb alcohols secundaris ni glicerol. En estudis recents d'expressió global dels gens de llevat en cultius amb baixa concentració de zinc, s'ha demostrat que hi ha disminució de molts gens entre ells els gens de les alcohol deshidrogenases *ADH1*, *ADH2*, *ADH3* i *ADH5*, mentre que el gen *ADH4* augmenta la seva expressió, indicant un possible paper funcional en condicions de creixement amb baixa concentració de zinc (www.transcriptome.ens.fr/ymgv/).

3.2.4 *Adh5p*.

L'últim gen conegut de les alcohols deshidrogenases típiques de *S.cerevisiae* és el gen *ADH5*, que codificaria per un polipèptid amb alt grau de similitud amb les *Adh1p* i *Adh2p* (80%) i *Adh3p* (70%). També pertany a la família de les MDR, i conté els residus necessaris per unir dos àtoms de zinc per subunitat. El seu producte gènic, però, encara no s'ha purificat ni caracteritzat, i per tant no se'n coneixen les seves propietats cinètiques.

3.2.5 *Adh6p* i *Adh7p*.

Els productes gènics dels gens *YMR318C* i *YCR105W*, *Adh6p* i *Adh7p* respectivament, es van caracteritzar recentment per Larroy i col·laboradors (2002a i b) com a nous membres de la família de les MDR, presentant una identitat seqüencial

entre ells del 64%. Es troben classificades en la família de les cinamil alcohol deshidrogenases de les MDR, i són les úniques proteïnes de llevat incloses en ella.

L'Adh6p és un enzim dimèric de 360 residus per subunitat, dependent de NADPH i que mostra activitat amb aldehids aromàtics (com el benzaldehid, el cinamaldehyd o el veratraldehyd), aldehids alifàtics lineals (pentanal, hexanal...) i ramificats (2-metilbutanal, 3-metilbutanal...). Pot catalitzar la reacció d'oxidació dels corresponents alcohols però amb una eficiència catalítica menor. L'Adh7p també és un enzim dimèric amb subunitats de 361 aminoàcids cadascuna. L'especificitat de substrat és molt similar a la que s'observa per l'Adh6p, però difereixen en les propietats cinètiques.

La funció en el llevat d'aquests enzims encara no està clara, però es creu que podrien participar en la síntesi dels alcohols superiors, en la lignolisi i en la homeòstasi del NADP(H).

3.2.6 FALDH.

Aquest és un enzim amb activitat formaldehyd deshidrogenasa dependent de glutatió, codificat en el gen *SFA1* (Wehner i cols, 1993, Fernández i cols., 1995). La subunitat consta de 385 aminoàcids i presenta un 63% d'identitat seqüencial amb la corresponent FALDH humana. L'activitat FALDH dependent de glutatió és present des de bacteris fins a humans. Estudis filogenètics fan pensar que la FALDH és la MDR antecessora de les ADH de vertebrats.

Una de les funcions d'aquest enzim és eliminar el formaldehyd generat en diferents vies metabòliques, oxidant el S-hidroximetilglutatió (adducte generat espontàniament entre el formaldehyd i el glutatió) a S-formilglutatió. Aquest compost s'hidrolitza posteriorment per una esterasa que genera format i regenera el glutatió. Finalment el format s'oxida a CO₂. Una altra activitat de la FALDH humana i de *S. cerevisiae* és la reducció del S-nitrosoglutatió, adducte format entre l'òxid nítric i el glutatió, en una reacció dependent de NADH (Jensen i cols., 1998, Fernández i cols., 2003).

3.2.7 Sorbitol deshidrogenases.

Troben dues sorbitol deshidrogenases a *S. cerevisiae*, codificades als gens *SOR1* i *SOR2*. Ambdues presenten entre si un 99% d'identitat de seqüència, amb 358 aminoàcids per subunitat, i són enzims tetramèrics. Tenen activitat sorbitol

deshidrogenasa depenent de NAD^+ , produint fructosa a partir de sorbitol. Aquesta activitat permet al llevat créixer en un medi que contingui sorbitol com a única font de carboni, encara que moltes soques presenten fases de latència extraordinàriament llargues (de 2 a 4 setmanes). La fructosa obtinguda en la reacció a partir del sorbitol pot ser degradada per la via glucolítica (Sarthy i cols., 1994).

3.2.8 Xilitol deshidrogenasa.

El gen *XYL2* codifica per una proteïna de 356 aminoàcids amb activitat xilitol deshidrogenasa (XDH) que catalitza la interconversió entre el xilitol i la xilulosa en una reacció dependent de NAD(H) . L'enzim encara no s'ha purificat, però es creu que podria ser tetramèric per la similitud de seqüència que presenta amb la SDH. La xilosa és un dels monòmers que componen l'hemicel·lulosa, el segon sucre més abundant en la naturalesa, que forma part de la lignocel·lulosa de les plantes. Aquesta xilosa és substrat per l'aldosa reductasa que la redueix a xilitol utilitzant NAD(P) , i el xilitol format és substrat per la XDH de llevat, que l'oxida a xilulosa, entrant aquesta a la via de les pentoses, prèvia transformació en xilulosa-5-fosfat (Richard i cols., 1999).

3.2.9 Butanodiol deshidrogenasa i *Yal061p*.

Finalment, els últims gens de *S. cerevisiae* que codificarien per MDRs que contenen Zn són *BDH1* i *YAL061W*. Els dos gens es troben en tàndem en el cromosoma I del llevat i els seus productes presenten una identitat de seqüència del 51% (Storms i cols., 1997). El tema de la present tesi doctoral és l'enzim (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol deshidrogenasa (Bdh1p) codificat en el gen *BDH1*, la seva caracterització cinètica i molecular, i les seves possibles aplicacions biotecnològiques.

4. La fermentació alcohòlica en *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1 Introducció històrica.

Fa més de 6.000 anys que l'home utilitza els beneficis de la fermentació alcohòlica del llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Les civilitzacions mesopotàmiques ja produïen una beguda que es podria anomenar cervesa i s'utilitzava el llevat per a la fabricació de pa, processos que també van ser utilitzats pels antics egipcis (Samuel, 1996). Com és

conegut, Grècia i Roma van preferir el producte de la fermentació del raïm, el vi, per al seu ús quotidià. I a l'Edat Mitjana, on les condicions higièniques no eren gaire correctes i l'aigua no sempre era potable, la cervesa era una beguda més saludable que l'aigua.

Fins a l'Edat Moderna la producció domèstica de cervesa era molt corrent i només hi havia producció a gran escala en abadies i monestirs. La indústria de la cervesa va avançar ràpidament a partir del segle XIX, mentre que la vinícola s'havia conservat de manera tradicional fins fa poques dècades. Un factor comú dels països occidentals ha estat, doncs, el consum de begudes alcohòliques i les activitats al voltant de la producció "màgica" de compostos tant comuns com el vi, la cervesa o el pa. En tots ells, l'experimentació domèstica ha estat la clau per avançar en la millora de la producció. En els nostres dies, l'avenç que hi ha en cada cas ja és producte d'experimentació científica, i una de les inicials fites a recordar és la demostració per part de Pasteur que el llevat *Saccharomyces cerevisiae* era el responsable de la desaparició de sucres dels medis de cultiu i de la producció de l'etanol i el diòxid de carboni que caracteritzen la fermentació (Boulton i Quain, 2001).

4.2 La fermentació alcohòlica: glicòlisi, piruvat i producció d'etanol.

S. cerevisiae és una de les més de 400 espècies de llevat capaç d'utilitzar glucosa, fructosa o manosa com a font de carboni. La oxidació i obtenció d'energia d'aquests sucres és similar en la majoria de llevats, que utilitzen la via de Embden-Meyerhof-Parnas per convertir la glucosa-6-fosfat en piruvat i obtenir ATP mitjançant la fosforilació a nivell de substrat (Figura 5). Durant el creixement de *S. cerevisiae* en glucosa, la glicòlisi és molt activa i els enzims glicolítics poden arribar a ser un 50% de la proteïna soluble de la cèl·lula (Gancedo i Serrano, 1989).

Molts llevats es diferencien en el metabolisme de la glucosa segons el destí que pugui seguir el piruvat produït en la glicòlisi. En *S. cerevisiae* trobem tres vies majoritàries d'utilització del piruvat, totes actives en major o menor proporció durant el creixement en glucosa, que realitzen tres enzims diferents (Figura 5) (Pronk i cols., 1996).

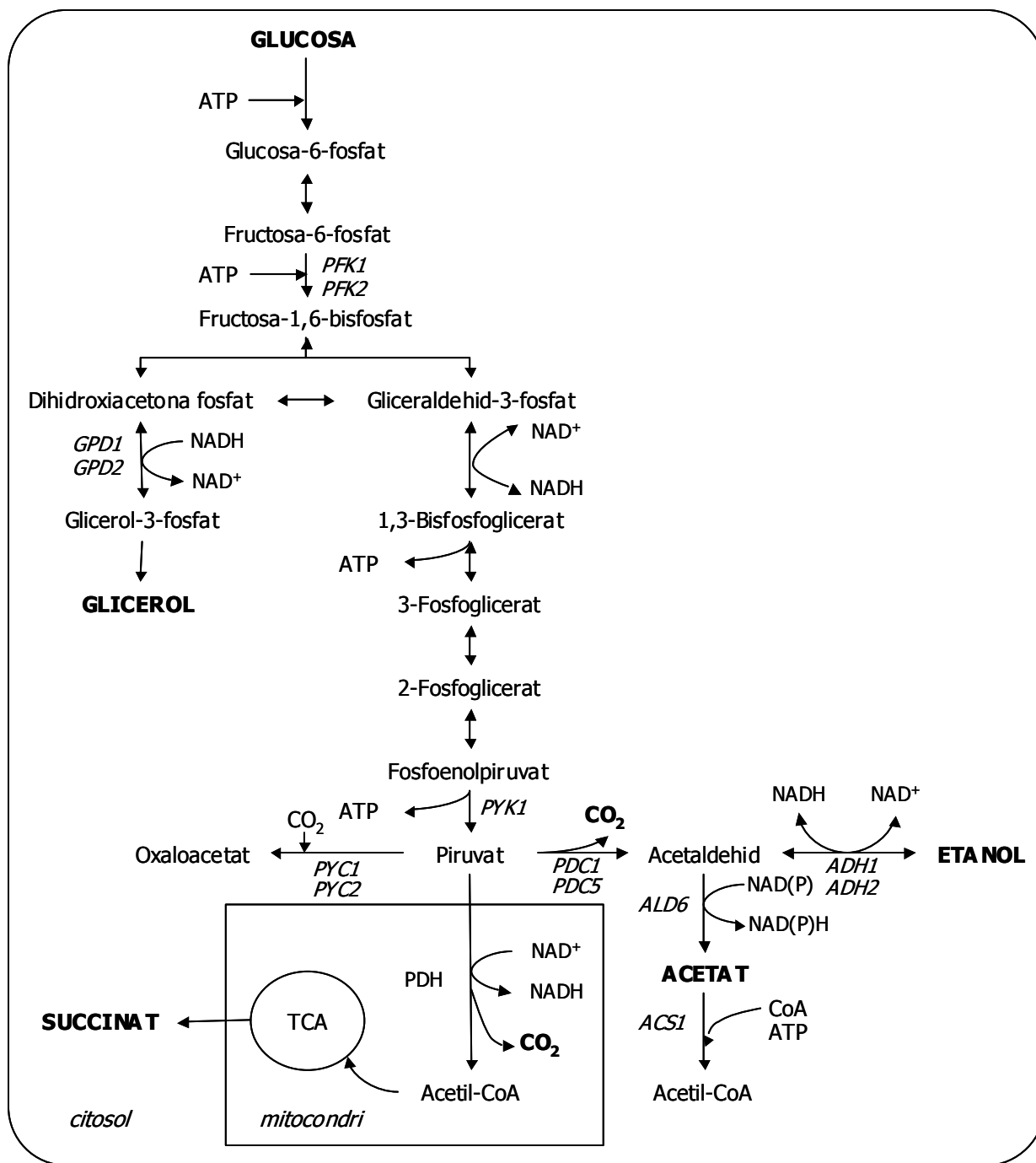


FIGURA 5: Esquema de la fermentació alcohòlica de *Saccharomyces cerevisiae* on es troben representades les diferents vies de producció dels principals productes de la fermentació que són l'etanol i el CO₂, glicerol, succinat i acetat. S'ha volgut presentar, a més, els tres destins del piruvat: la descarboxilació a acetaldehid per la piruvat descarboxilasa (PDC), la descarboxilació oxidativa a acetil-CoA per la piruvat deshidrogenasa (PDH) i la carboxilació a oxaloacetat per la piruvat carboxilasa (PYC). En el cas de la representació dels diferents destins del piruvat l'esquema correspon a Pronk i cols. (1996). Abreviacions: PFK, fosfofructo quinasa, GPD, glicerol-3-fosfat deshidrogenasa, PYK, piruvat quinasa, PYC, piruvat carboxilasa, PDC, piruvat descarboxilasa, ADH, alcohol deshidrogenasa, ALD, aldehid deshidrogenasa, PDH, piruvat deshidrogenasa.

La primera via d'ús del piruvat és la descarboxilació del piruvat per la piruvat descarboxilasa (isoenzim 1 o Pdc1p). Durant el creixement de *S. cerevisiae* en glucosa, la Pdc1p es veu afavorida per les grans quantitats de piruvat formades, doncs és un enzim que s'expressa preferencialment en presència de glucosa i posseeix una gran capacitat de descarboxilació del piruvat, tot i que presenti una Km alta (Hohmann, 1997). Mutants delecionats per aquest enzim, l'isoenzim Pdc1p, (Flikweert i cols., 1997) no permeten el creixement del llevat en glucosa per dues raons: 1) perquè la glucosa reprimeix els enzims respiratoris, entre ells el gen *LPD1* que codifica per la subunitat E3 de la piruvat deshidrogenasa (PDH), i 2) perquè no obté suficients compostos de 2 carbonis pel seu creixement. Així doncs, el segon enzim alternatiu per a la oxidació del piruvat en el metabolisme respiro-fermentatiu de la glucosa, la PDH, es manté en nivells d'expressió baixos perquè es troba sotmesa a repressió per catabolít (Gancedo, 1998). L'acetil-CoA que necessita el llevat per créixer es forma en el *by-pass* citosòlic de la PDH que implica la oxidació de l'acetaldehid a acetat per l'aldehid deshidrogenasa NAD(P)⁺ dependent, seguida de l'acció de l'acetil-CoA sintetasa (Pronk, i cols., 1996). Finalment, cal tenir en compte que l'isoenzim Pdc5p també s'expressa en glucosa, però la seva activitat representa només un 10-20% de l'activitat total.

Flikweert, i col·laboradors (1996) van demostrar en cultius continus amb glucosa limitada (condicions on s'expressen els enzims de la respiració) que la via del *by-pass* era imprescindible per obtenir l'acetil-CoA citosòlic i que la PDH mitocondrial no era capaç de suplir la seva funció. En llevat no hi ha transportadors d'acetil-CoA que exportin aquest compost a citosol des de mitocondri, que és on es necessita per la síntesi dels lípids. Així doncs, la major part de l'acetaldehid provinent de la descarboxilació del piruvat per la PDC es redueix a etanol per l'acció de l'Adh1p per regenerar el NAD⁺ necessari per la glicòlisi (Ciriacy, 1997), però una part s'utilitza per formar acetil-CoA citosòlic.

El tercer enzim, la piruvat carboxilasa, sintetitza oxaloacetat, compost necessari per a la biosíntesi de macromolècules. En condicions d'alta concentració de glucosa els enzims del cicle del glioxilat es troben reprimits (la isocitrat liasa fins i tot es troba inactivada), de manera que la piruvat carboxilasa és necessària per sintetitzar oxaloacetat i permetre el creixement del llevat. S'ha demostrat que en la fermentació

alcohòlica de *S. cerevisiae* el mutant deletat per les dues isoformes de la piruvat carboxilasa no creix en glucosa (Steensma, 1997).

4.3 Regulació del balanç redox durant la fermentació alcohòlica.

Durant el creixement del llevat en sucres hi ha una forta preferència per l'ús del NAD(H) en reaccions del catabolisme i anabolisme, mentre que l'ús del NADP(H) es redueix a la biosíntesi. El manteniment del balanç dels *pools* dels dos cofactors és essencial per bon funcionament del metabolisme cel·lular. Però s'ha de tenir en compte que existeix una compartimentació subcel·lular que no permet la lliure circulació de NAD(P), perquè la membrana mitocondrial interna és impermeable a piridin-dinucleòtids i en conseqüència, els coenzims s'han de reoxidar en el compartiment on es generen (Bakker i cols., 2001).

Taula 3

Concentracions intracel·lulars de NAD(H) i NADP(H) durant la fase de creixement exponencial de *S. cerevisiae* en glucosa en condicions anaeròbiques

Concentracions intracel·lulars ($\mu\text{mol/g pes sec}$)				Ratio	Ratio
NAD ⁺	NADP ⁺	NADH	NADPH	[NADH]/[NAD ⁺]	[NADPH]/[NADP ⁺]
$2,87 \pm 0,09$	$0,23 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,01$	$1,21 \pm 0,07$	$0,15 \pm 0,01$	$5,26 \pm 0,55$

Taula de Nissen i cols. (2001)

La formació de biomassa va acompanyada per un consum net de NADPH i producció de NADH que és necessari reoxidar (Van Dijken i Scheffers, 1986). Durant el creixement en glucosa la relació [NADPH]/[NADP⁺] és aproximadament 35 vegades superior a la relació [NADH]/[NAD⁺] (Taula 3) (Nissen i cols., 2001).

S. cerevisiae manté el balanç entre la forma oxidada i reduïda de NADP(H) de manera que la reducció del NADP⁺ es realitza principalment, en la via de les pentoses fosfat i a través de l'aldehid deshidrogenasa dependent de NADP⁺ (Bakker i cols., 2001). En el cas del NAD(H) el llevat té diferents estratègies per mantenir-ne els nivells intracel·lulars adequats, però es capaç de mantenir la reducció del NAD⁺ perfectament acoblada a una contínua reoxidació del NADH produït durant el creixement en glucosa.

4.3.1 Producció de glicerol.

Durant la fermentació alcohòlica el NADH produït prové principalment de la glicòlisi i aquest es reoxida en les reaccions de formació d'etanol. A part de la producció

d'etanol, també es generen metabolits oxidats de baix pes molecular que s'excreten al medi com el piruvat, l'acetaldehid, l'acetat o el succinat, i que comporten una producció addicional de NADH associada a la seva acumulació. Aquest NADH addicional es reoxida principalment a través de la via de producció de glicerol, el producte de la fermentació més important després de l'etanol (Van Dijken i Scheffers, 1986). A part del seu paper en el balanç redox, el glicerol participa en la osmoregulació i es produeix i es reté dins les cèl·lules si el llevat es troba amb una osmolaritat extracel·lular alta (Nevoigt i Stahl, 1997).

La via de formació de glicerol comença per la reducció de l'intermediari de la glicòlisi dihidroxiacetona fosfat a glicerol-3-fosfat (figura 5) per la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa depenent de NAD(H), reoxidant-se una molècula de NAD⁺ en aquest pas. Es coneixen dos isoenzim: Gpd1p, que és la forma majoritària en condicions aeròbies (i que s'indueix a osmolaritat elevada), i Gpd2p que s'utilitza en condicions anaeròbies (Ansell i cols., 1997). En una segona etapa es realitza la hidròlisi irreversible del grup fosfat mitjançant la glicerol-3-fosfatasa, de la que també es coneixen dos isoenzims Gpp1p i Gpp2p (Norbeck i cols., 1996).

4.3.2 Altres mecanismes de reoxidació del NADH.

Durant la fermentació alcohòlica, la major part de NADH produït es genera al citosol, però no es pot menysprear la quantitat de NADH generat per reaccions anabòliques dutes a terme en el mitocondri en condicions anaeròbies (Visser i cols., 1990). En experiments on es creixia el llevat en cultius continus, es va determinar que la major font de NADH produït en el mitocondri prové de la síntesi de glutamat, on intervenen els enzims piruvat deshidrogenasa i isocitrat deshidrogenasa (Nissen i cols., 1997).

Així doncs, en condicions de fermentació on els enzims de la cadena de transport d'electrons i els enzims del cicle dels àcids tricarboxílics es troben reprimits, hi ha d'haver un sistema de transport d'equivalents redox des del mitocondri al citosol perquè es pugui reoxidar el NADH mitocondrial, i el llevat pugui continuar creixent. El llevat presenta diversos sistemes llançadora, essent les més conegudes la del glicerol-3-fosfat i la llançadora etanol-acetaldehid. La llançadora glicerol-3-fosfat enllaça la oxidació del NADH per l'enzim glicerol-3-fosfat deshidrogenasa depenent de FAD que es troba a la

cara externa de la membrana mitocondrial interna. Aquest enzim es troba codificat per el gen *GUT2*, que com els enzims respiratoris, també es troba subjecte a la repressió per glucosa, de manera que no és activa durant la fermentació alcohòlica (Bakker, 2001).

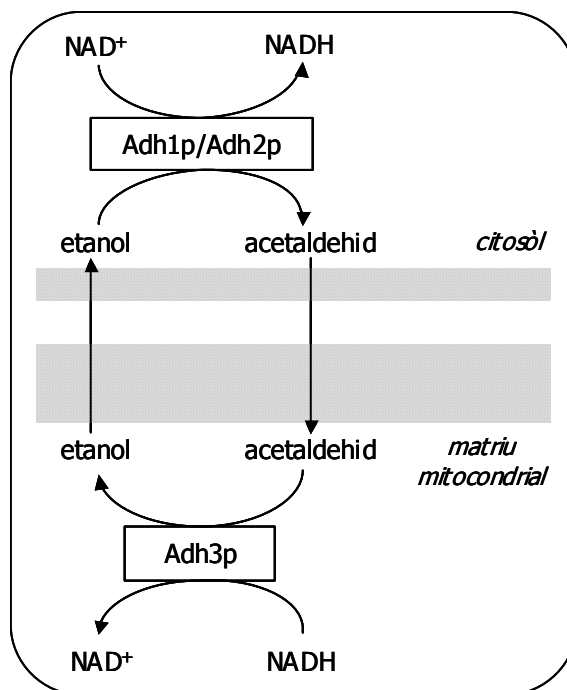


FIGURA 6: Esquema del funcionament de la llançadora etanol-acetaldehid durant la fermentació alcohòlica de *S. cerevisiae* (Bakker i cols., 2000).

La llançadora etanol-acetaldehid és important en condicions anaeròbiques. El llevat conté l'Adh3p mitocondrial a més de les isoformes citosòliques (Ciriacy, 1997) (apartat 3.2). Com que l'etanol i l'acetaldehid no necessiten transportadors perquè poden difondre lliurement a través de les membranes biològiques, l'intercanvi de NADH es realitza a favor de gradient. Així, el NADH generat per la formació de glutamat durant el creixement, junt amb l'acetaldehid que difon fins a la matriu mitocondrial des del citosol, són utilitzats per l'Adh3p mitocondrial que genera etanol i reoxida el NADH a NAD^+ (figura 6). L'etanol difon de nou cap al citosol on serà oxidat a acetaldehid per les alcohol deshidrogenases i es formarà NADH en el citosol. D'aquesta manera s'aconsegueix que el NADH generat en el mitocondri es trobi al citosol, on es podrà reoxidar per la maquinària de producció de glicerol (Bakker i cols., 2000).

4.4 Productes i subproductes de la fermentació alcohòlica.

Els principals productes de la fermentació alcohòlica en condicions de creixement en medi ric amb 4% de glucosa s'indiquen a la Taula 4.

L'**etanol**, junt amb el CO₂, és el principal producte de la fermentació alcohòlica, i representa el 70-80% de la glucosa consumida. Segons el tipus de medi que s'utilitza es poden obtenir concentracions de fins 2 M en el cas de mosts sintètics (Camarasa i cols., 2003). Els llevats més tolerants a l'efecte inhibidor de l'etanol produeixen fins 150 g/l al medi.

La producció i paper del **glicerol** ja s'ha desenvolupat en l'apartat 4.3. És un 4,5% del total de la glucosa consumida i cal destacar que és un subproducte important de la fermentació del vi. La seva producció varia entre 4 i 9 g/l i la seva principal contribució a les característiques del vi és conferir-li dolçor. (Remize i cols., 1999).

Taula 4

Productes obtinguts durant el creixement de *S. cerevisiae* amb glucosa al 4%

Producte o via metabòlica	Glucosa utilitzada (%)
Etanol	70-80
Glicerol	4,5
Succinat	0,5-2
Acetat	1
Productes secundaris*	0,1
Respiració	4
Via de les pentoses fosfat	1

*2,3-butanodiol, acetoïna, acetaldehid, alcohols superiors, piruvat i alanina entre altres. Gancedo i Serrano (1989).

El **succinat** és un producte intermediari del cicle dels àcids tricarboxílics i el tercer producte de la fermentació alcohòlica en quant a quantitat acumulada (0,5-2% de la glucosa consumida). La presència de glucosa al medi reprimeix els gens del cicle dels àcids tricarboxílics, però, tot i que el cicle complert no és funcional, s'accepta que funciona a través de dues branques: una branca oxidativa que comporta síntesi del 2-oxoglutarat (precursor del glutamat), i una branca reductiva que produeix fumarat i d'on prové la major part del succinat excretat al medi per acció de la fumarat reductasa. En el vi les concentracions assolides oscil·len entre 0,2 i 1,5 g/l, i li confereix un tast lleugerament àcid (Camarassa i cols., 2003).

L'**acetat** (1% de la glucosa consumida) es forma en el *by-pass* de la piruvat deshidrogenasa durant la fermentació alcohòlica (apartat 4.2). El seu umbral de gust es troba en 0,4 g/l en cerveses i 0,8 g/l en vins, i nivells superiors confereixen un gust agre i avinagrat a les begudes (Remize i cols., 2000). La producció de glicerol, succinat i acetat, així com el subproducte 2,3-butanodiol, estan relacionats amb el manteniment del balanç redox. Soques on s'ha sobreexpressat o deleccionat la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa responsable de la producció de glicerol, presenten nivells anòmals d'aquests compostos, indicant la seva participació en el manteniment i regulació fina del balanç redox (Michnick i cols., 1997, i Remize i cols., 1999).

De la resta de glucosa utilitzada, un 0,1% proporciona un conjunt de productes secundaris (o subproductes) on s'hi inclouen el 2,3-butanodiol, l'acetoïna, l'acetaldehid, els alcohols superiors, el piruvat i l'alanina entre altres. Aquests compostos són importants en les indústries vinícoles o cerveseres perquè presenten propietats organolèptiques molt característiques que afecten al gust i aroma dels productes, fins i tot trobant-se en quantitats molt baixes. Finalment, es coneix que un 4% de la glucosa s'utilitza en la respiració i un 1% va a parar a la via de les pentoses fosfat, necessària per obtenir compostos carbonats de 4 i 5 carbonis a més del NADPH utilitzat en les reaccions de biosíntesi.

4.5 Producció de 2,3-butanodiol i acetoïna.

El 2,3-butanodiol, així com el diacetil (apartat següent), són dos productes secundaris i minoritaris de la fermentació alcohòlica. La seva importància radica en les seves propietats organolèptiques, i en el cas del 2,3-butanodiol també per el seu paper en el manteniment del balanç redox.

El 2,3-butanodiol apareix, sobretot, durant la fermentació vinícola en quantitats que oscil·len entre 250 i 1350 mg/l i contribueix a donar cos al vi degut a la seva viscositat i relativament alta concentració assolida (Romano i cols., 1996). El seu precursor, l'acetoïna, es troba en concentracions més baixes (2-32 mg/l) i contribueix al *bouquet* del vi (Romano i cols., 1995).

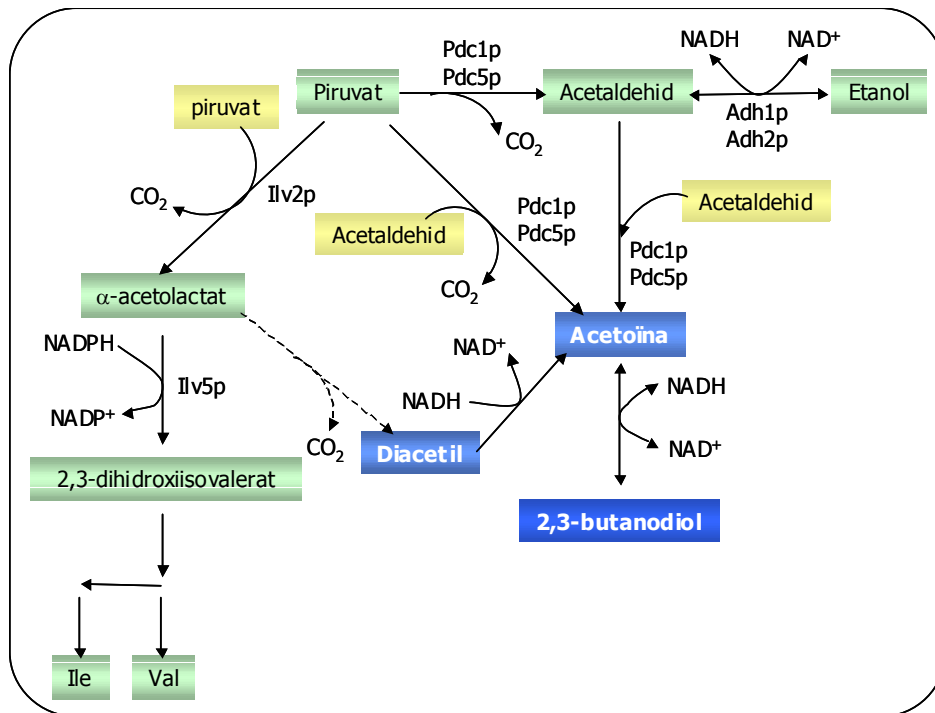


FIGURA 7: Vies de producció de l'acetoïna i el 2,3-butanodiol durant la fermentació alcohòlica. A la figura es mostra que la piruvat descarboxilasa (Pdc1p/Pdc5p) sintetitzen acetoïna a partir de 2 molècules d'acetaldehid o des d'una de piruvat i una d'acetaldehid. El diacetil es forma per descarboxilació espontània (ratlles discontinües) de l'α-acetolactat. Figura modificada de González i cols., 2000.

El 2,3-butanodiol és el producte de la reducció de l'acetoïna, procés en el que es reoxida una molècula de NADH. Hi ha tres possibles vies de producció d'acetoïna (Figura 7): 1) per l'acció de la piruvat descarboxilasa que catalitza una reacció aldòlica entre dues molècules d'acetaldehid, 2) o entre una molècula d'acetaldehid i una de piruvat (Chen i Jordan, 1984), i 3) per descarboxilació espontània de l'α-acetolactat que produeix diacetil i aquest es redueix a acetoïna (Suomalainen i Ronkainen, 1968).

Durant la producció de vi les principals vies de producció del 2,3-butanodiol són les catalitzades per la piruvat descarboxilasa, doncs és l'excés d'acetaldehid que es produeix el que afavoreix que la Pdc1p augmenti la seva activitat secundària de tipus condensació aldòlica (Chen i Jordan, 1984). A més, aquesta reacció és estereoespecífica perquè es troben determinades proporcions de les diferents configuracions del 2,3-butanodiol i de l'acetoïna al medi. *S. cerevisiae* produeix els isòmers de l'acetoïna en una proporció del 80% en configuració *R* i del 20% en *S*, mentre que els isòmers del 2,3-butanodiol es troben en una proporció del 79% en configuració *RR*, del 20% en *meso* i del 0,7% en *SS* (Neish, 1950 i Romano i cols., 2003).

4.6 Producció de cervesa i dels metabolits secundaris diacetil i 2,3-pentanodiona.

El diacetil i la 2,3-pentanodiona contenen grups funcionals coneguts com dicetones vicinals (VDK). Com en els compostos de l'apartat anterior, la seva importància recau en les seves propietats organolèptiques, que contràriament al 2,3-butanodiol, són indesitjables en una beguda. Tant el diacetil com la 2,3-pentanodiona confereixen un gust a mantega molt desagradable i tenen l'umbral de sabor a 0,15 ppm i 0,9 ppm respectivament (Boulton i Quain, 2001).

4.6.1 Procés de fabricació de la cervesa.

Per a la indústria cervesera és de vital importància controlar aquests dos compostos, doncs a part de ser indicadors de possibles contaminacions del producte per bacteris i altres llevats, també són els indicadors per avançar en les diferents etapes de què consta el procés industrial. A la figura 8 hi ha esquematitzat el procés de producció de cervesa que es segueix en les indústries cerveseres (www.damm.es, Boulton i Quain, 2001).

El procés de fabricació consta de diferents etapes i comença amb la obtenció del most o maltejat (Fig. 8.1). Aquesta primera etapa s'inicia amb la humidificació de la civada per induir la germinació del gra. S'utilitzen les espècies *Hordeum distichon* o *H. vulgare*, d'alt contingut en midó i baix en nitrogen. Durant la germinació, que es realitza a 13-16°C, s'activen les amilases i proteases de la llavor i comença la hidròlisi del midó i les proteïnes. El gra de civada conté un 55-65% de midó del qual el 75-80% es troba en forma de polímer ramificat (amilopectina), i el 20-25% restant és amilosa. També conté proteïnes, vitamines, sacarosa, minerals, polifenols, aminoàcids i lípids, elements tots ells que contribueixen a la composició del most. La germinació s'atura aplicant calor (60-70°C) i en aquest punt no tots els compostos s'han hidrolitzat, només el 40% de les proteïnes i el 10% del midó. Seguidament es mol el gra i s'obté una espècie de farina que es barreja amb aigua i es sotmet a un procés de cocció entre 50-70°C (brassatge) durant el qual, el midó del gra es transforma en sucres solubles i fermentables.

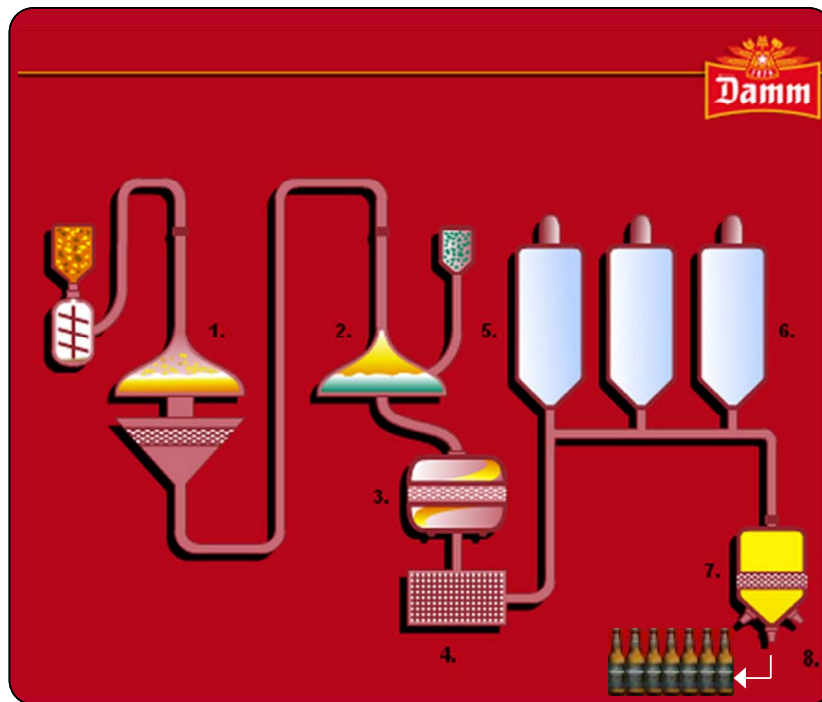


FIGURA 8: Esquema de la producció industrial de la cervesa (extret del protocol de fabricació de S.A. Damm, www.damm.es). 1, Obtenció del most; 2, cocció del most; 3, clarificació del most; 4, refredament del most; 5, fermentació i obtenció de la cervesa jove; 6, maduració de la cervesa jove; 7, filtració i condicionament de la cervesa; i 8, envasat de la cervesa.

Els mosts que donaran lloc a cerveses tipus *lager* acostumen a tenir una concentració de sucres d'entre el 7,5 i el 15°P (°P són graus Plato, o % de sòlids dissolts) i un pH de 5,0-5,3. Dels sòlids dissolts el 90-92% són carbohidrats, el 4-5% són compostos nitrogenats i la resta són diferents compostos orgànics (MacWilliam, 1968). El principal sucre del most és la maltosa seguit de la maltotriosa, però també trobem fructosa, glucosa, sacarosa i maltotetraosa. De la resta de sòlids no dissolts, un 25% són carbohidrats no fermentables que es coneixen amb el nom de dextrines.

El most es sotmet a un procés de filtració i es recull en una caldera on es portarà a ebullició durant una hora per després afegir el llúpul (Fig 8.2). El llúpul consisteix en olis extrets de la inflorescència del *Humulus lupulus L.* i confereix acidesa, intensifiquen el color i aporten substàncies antisèptiques a la cervesa. El procés de filtració esterilitza el most i inactiva els enzims de degradació del midó. Una vegada bullit, se'n determina l'extracte sec primitiu que ens indica la quantitat de sacarosa dissolta. Després es clarifica en un dipòsit (remolí) on s'eliminen les substàncies no solubles (Fig 8.3), i es refreda en un intercanviador de calor fins als 8°C o 10°C que és la temperatura a la qual es realitza la fermentació (Fig 8.4).

El most fred es passa als tancs de fermentació (Fig 8.5) on s'oxigena i s'hi afegeix el llevat que consumeix els sucres fermentables i produeix alcohol i CO₂ mitjançant la fermentació alcohòlica. L'etapa dura entre 7 i 8 dies, i en aquest punt la cervesa s'anomena cervesa jove o verda. La fermentació va seguida d'una etapa de condicionament de manera que roman unes setmanes (de promig 4) en els tancs de maduració (Figura 8.6), i és durant aquest temps que va adquirint el caràcter i propietats definitives.

Finalment, la cervesa madura es filtra per eliminar els pòsits i partícules sòlides que puguin quedar en suspensió (Fig 8.7) per finalment pasteuritzar-la, envasar-la (Fig. 8.8), i deixar-la llesta per al seu consum.

4.6.2 Productes secundaris: diacetil i 2,3-pentanodiona.

Diacetil i 2,3-pentanodiona són productes secundaris del metabolisme dels aminoàcids ramificats valina i isoleucina (Figura 9). Els seus precursors, els α -acetohidroxiàcids, s'excreten al medi durant el creixement del llevat i és allà on es descarboxilen de manera espontània. Durant els 7-8 dies que dura l'etapa de fermentació hi ha una primera fase de creixement que dura 2-3 dies. En aquesta fase de la fermentació el llevat és metabòlicament actiu, creix i degrada una part del sucre que troba al most. Com que la fermentació industrial de cervesa es realitza entre 10°C i 15°C, el llevat creix molt poc, de seguida atura la duplicació i el seu metabolisme, i indueix la floculació precipitant les cèl·lules al fons del tanc de fermentació. Durant el procés de floculació, que dura uns 5 o 6 dies, s'acaben de consumir els sucres fermentables i comença la reducció del diacetil i la 2,3-pentanodiona a 2,3-butanodiol i 2,3-pentanodiol respectivament, compostos que tenen l'umbral de gust molt més alt que els seus precursors. Aquest procés acaba durant l'etapa de condicionament de la cervesa.

De tot el procés, l'etapa limitant és la descarboxilació espontània, doncs s'ha comprovat que la reducció de les VDKs és molt ràpida i depenent de l'activitat enzimàtica del llevat en suspensió. Els nivells de diacetil i 2,3-pentanodiona a la cervesa durant la fermentació dependrà per una part, de la capacitat del llevat de sintetitzar i excretar al medi els precursors α -acetohidroxiàcids. Per altra banda, també dependrà de l'activitat enzimàtica de reducció d'aquests compostos. Els nivells baixos de nitrogen

en forma de grup amí presents al medi, el pH baix i l'excés d'aïrament del most poden fer augmentar l'excreció dels precursors del diacetil i 2,3-pentanodiona al medi (Boulton i Quain, 2001).

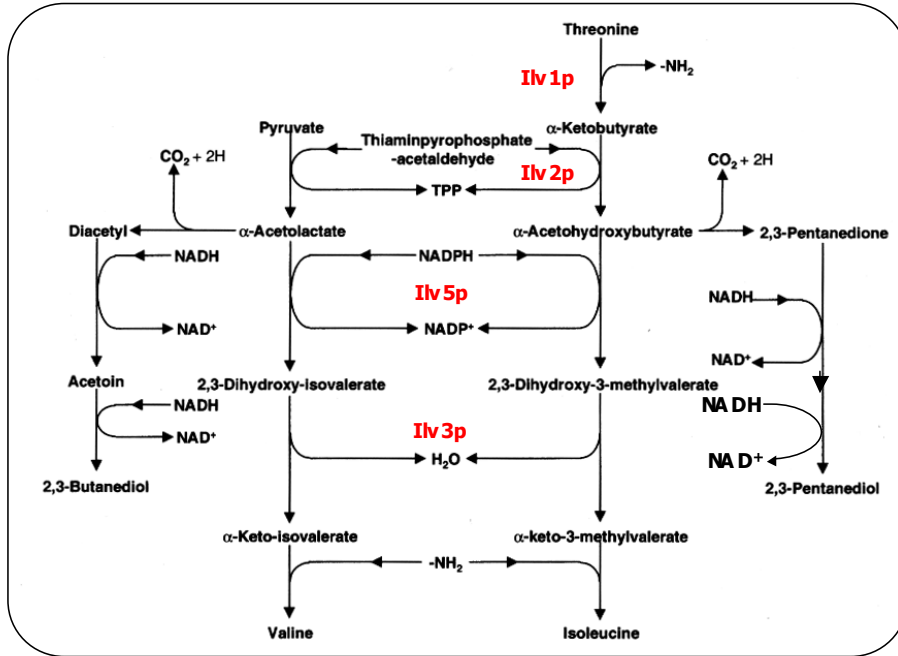


Figura 9: Vies de producció i reducció de les dicetones vicinals (VDKs) diacetil i 2,3-pentanodiona (Boulton i Quain, 2001). A l'esquema s'hi han afegit els enzims de la via de síntesi dels aminoàcids valina i isoleucina (Ilv1p, treonina desaminasa, Ilv2p, acetohidroxiàcid sintasa, Ilv5p, reductoisomerasa, Ilv3p, acetohidroxiàcid deshidratasa).

Però mentre que la producció d'aquests dos compostos és un procés ben entès, la seva reducció no ho és tant. S'ha demostrat que l'Adh1p pot reduir-los (Hardwick i cols., 1976), i també s'han descrit diferents diacetil reductases NADH i NADPH dependents en llevat, totes capaces d'utilitzar les VDKs i l'acetoina. Fins i tot s'ha vist que les activitats diacetil reductases i alcohol deshidrogenases varien segons les soques que s'analitzen (Louis-Eugene i cols., 1988, Legeay i cols., 1989, Heidlas i Tressl, 1990a, Schwarz i Hang, 1994, Murphy i cols., 1996). Però malgrat la informació de que es disposa, la reducció del diacetil i la 2,3-pentanodiona durant la fabricació industrial de la cervesa continua essent un procés poc conegut.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

Amb l'objectiu global de determinar la funció del gen *YAL060W* de *Saccharomyces cerevisiae* i d'explorar possibles aplicacions biotecnològiques, es van plantejar diferents objectius parcials:

1) Clonar el gen *YAL060W* en el vector d'expressió pYes2 i identificar l'activitat enzimàtica del seu producte gènic.

2) Un cop identificat el producte gènic com a 2,3-butanodiol deshidrogenasa (Bdh1p), purificar i caracteritzar l'enzim a nivell cinètic i físico-químic, així com determinar la seva estereoespecificitat envers diferents substrats.

3) Identificar nous enzims amb activitat diacetil reductasa presents en llevat i purificar-los.

4) Caracteritzar la diacetil reductasa purificada (Adh2p) amb els substrats típics de la Bdh1p i analitzar-ne la seva estereoespecificitat.

5) Estudiar l'expressió del gen *BDH1* (*YAL060W*) durant el creixement de *S. cerevisiae* en diferents fonts de carboni.

6) Delecionar els gens *BDH1*, *YAL061W* i *ADH2* per determinar el seu paper en la producció dels diferents isòmers de l'acetoïna i del 2,3-butanodiol durant la fermentació alcohòlica.

7) En col·laboració amb S.A. Damm, sobreexpressar la Bdh1p mitjançant vectors de llevat en soques industrials cerveseres per reduir els nivells en cervesa de substàncies amb propietats organolèptiques desagradables.

8) Posar a punt al nostre laboratori un sistema per modificar genèticament soques industrials cerveseres, i d'aquesta manera sobreexpressar la Bdh1p. Determinació del nivells de diacetil, 2,3-pentanodiona i acetoïna durant la fermentació de most cerveser de 15°P produïts per les soques modificades.

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. Reactius.

1.1 Reactius generals.

Amersham Biosciences AB (Uppsala, Suècia): ampicilina, geneticina (G418), Superdex 200 HR 10/30, columnes PD10 i PhastGel IEF 3-9, PhastGel gradient 8-25, amfolits Pharmalyte 3-10.

Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, EE.UU.): Hidroxilapatit BioGel HT, gels d'isoelectroenfoc pH3-10 (Ready Gel pH 3-10), tampons anòdics i catòdics (Anode i Catode buffers), tampó de càrrega per isoelectroenfoc (Sample buffer), Low Range SDS-PAGE Standards i reactiu de Bradford.

Duchefa Biochemie BV (Haarlem, The Netherlands): pleomicina.

GIBCO™ (Regne Unit): BENCHMARK™ Protein Ladder.

Merk (Darmstadt, Alemanya): etanol de grau biologia molecular, tiosulfat de sodi, acetat d'etil grau HPLC.

Millipore Corporation, Waters Chromatography Division (MA, EE.UU.): concentradors per ultracentrifugació de 200, 50 i 10 ml i membranes de Diaflo PM 10 de 62 i 25 mm de diàmetre, i membranes de cel·lulosa de 44,5 mm de diàmetre, microconcentradors Microcon, membranes per filtració de tampons de 0,22 µm, sistema de filtració estèril al buit Stericup™.

Pronadisa (Madrid, Espanya): acrilamida 30%/bisacrilamida 0,8% (p/v).

Sarsted AG & Co. (Numbrecht, Alemanya): filtres de 0,22 µm de porus, estèrils.

Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.): totes les sals utilitzades, àcid pirúvic, NAD⁺ de grau III i AA1, NADH grau III, NADP⁺, 2,3-butanodiol (tots els isòmers), diacetil, acetoïna, glicerol i la resta de substrats utilitzats. PMS i NBT, nitrat de plata, Cibachron Blue 3GA agarosa i DEAE-sepharose Fast Flow, format deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*, SDS, TEMED, boles de vidre de 0,5 mm de diàmetre per trencar llevat, Gel Filtration Molecular Weight Markers.

Supelco (Bellefonte, EE.UU.): columna quiral β -DEXTM 120 (30 m de llarg, 0,25 mm de diàmetre intern).

S.A. Damm (Barcelona, Espanya): most industrial de 15^oP.

1.2 Reactius de biologia molecular.

Amersham Biosciences AB (Uppsala, Suècia): tots els enzims de restricció, kilobase DNA marker, pel·lícula de revelat de Southern no radioactiu Hyperfilm ECL.

Biotoools (Madrid, Espanya): 1kb Ladder, Biotoools DNA polimerasa.

Difco Laboratories (Detroit, MI, EE.UU.): bacto-peptona, extracte de llevat, bacto-agar, yeast nitrogen base w/o ammonium sulfate and aminoacids.

Genotek (Sabadell, Espanya): DNA de esperma de salmó.

Invitrogen Life Technologies (Regne Unit): vector llançadora bacteri/llevat pYES2.

New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, EE.UU.): DNA polimerasa Vent_RTM.

Pierce (Rockford, IL, EE.UU.): kit de Southern no radioactiu North2South.

Pronadisa (Madrid, Espanya): bacto-triptona, agarosa de baixa EEQ.

Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemanya): T4 DNA polimerasa, T4 DNA lligasa, fosfatasa alcalina, PWO DNA polimerasa, Expand Long Template PCR System, Marcador VII i dNTPs.

Schleicher & Schuell GmbH (Dassel, Alemanya): membrana de nylon per la transferència d'àcids nucleics Nytran N, sistema TurboBlotter per a la transferència d'àcids nucleics.

Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.): GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit, tots els oligonucleòtids utilitzats, glucosa i sulfat d'amoni per cultius.

2. Material biològic i conservació de les diferents soques utilitzades.

2.1 Soques de *Saccharomyces cerevisiae*.

La Dra. Silvia Atrián ens va cedir la soca WV36-405 (*MATa ade-2 ura3-53 trp1 adh1Δ adh2ΔHIII adh3 adh4::TRP1*), delecionada per la majoria de les alcohol deshidrogenases. La soca WV36-405 ens va permetre, en un principi, determinar l'activitat del gen *YAL060W* quan encara no en coneixíem cap substrat (Williamson i Paquin, 1987).

La soca deficient en proteases BJ5459 (*MATa ura3-52 trp1 lys2-801 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL*), cedida pel Dr. Benjamí Piña, es va utilitzar per expressar i purificar la Bdh1p.

Per fer l'estudi estructural i funcional dels enzims Bdh1p i Adh2p es va utilitzar la soca FY834 (*MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ*) (Winston i cols., 1995) i les derivades obtingudes de delecionar-ne diferents gens.

La soca S288C (*MATα mal gal2*) (Mortimer i Johnston, 1986) es va utilitzar per obtenir la primera amplificació per PCR del gen *YAL060W* i també per als diferents estudis de fermentació en els apartats 13 i 14 dels resultats (aplicació biotecnològica de l'enzim Bdh1p).

Finalment, l'empresa S.A. Damm ens va proporcionar la soca SID per poder realitzar els estudis de manipulació genètica i d'aplicació biotecnològica. Aquesta soca pertany l'espècie *S. carlsbergensis* i és una soca industrial cervesera tipus "lager".

2.2 Soques de *Escherichia coli*.

S'ha utilitzat la soca de *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 RelA1 lac[F' proAB lac^fZΔM15Tn10(Tet^r)]*) de Stratagene (La Jolla, CA, EE.UU.) com a hoste per realitzar els diferents clonatges que es presenten a la tesi.

2.3 Conservació de les diferents soques utilitzades.

2.3.1 Conservació de soques de llevat.

Les diferents soques es van conservar en 15% de glicerol i a -80°C . Es van utilitzar microvials de 1,5 ml estèrils als quals afegíem la soca crescuda en medi YPD o el corresponent medi selectiu i glicerol fins a una concentració final de 15% en 1 ml total. Un cop barrejats es conservaven a -80°C . Per l'ús diari primer es revivien els glicerinars en plaques de medi ric o mínim creixent-les a 30°C . Les soques es conservaven en medi sòlid a 4°C durant un mes.

2.3.2 Conservació de soques d'Escherichia coli.

Com en el cas del llevat, la soca d'*E. coli* XL1-Blue amb els diferents vectors utilitzats, es va conservar a -80°C en 15% de glicerol que s'afegia al medi de cultiu utilitzat i es conservaven en microvials estèrils de 1,5 ml. Per l'ús corrent es mantenien en medi sòlid a 4°C durant un mes (màxim).

3. Medis de cultiu.

3.1 Medis de cultiu de llevat.

Tots els medis de cultiu es van preparar en recipients de vidre de 1 litre on s'autoclavaven 500 mililitres (ml) de medi, suficient per 20-25 plaques de Petri. Si no s'especifica a part, tots els medis s'esterilitzaven durant 20 minuts a 121°C i 1 kg/cm^2 . Les plaques es deixaven assecar a temperatura ambient durant una nit o bé durant mitja hora en una campana de flux laminar vertical. Un cop seques es mantenien durant 3 mesos a 4°C segellades en bosses de plàstic. Per la preparació de medi líquid, l'agar no es va afegir a la barreja de components.

A continuació es presenta un llistat de les quantitats necessàries (en grams) per preparar un litre de medi, i entre parèntesi la concentració (en percentatge) de cada component a la barreja final (Rose i cols., 1990; Treco, 1990).

- **Medi ric (YPD):** Aquest és un medi d'ús rutinari que aporta tots els nutrients que necessita el llevat per créixer. Per aquesta raó està considerat un medi ric. La seva composició és la següent:

Extracte de llevat (1%)	10 g
Bacto-peptona (2%)	20 g
Glucosa (2%)	20 g
Bacto-agar (2%)	20 g
Aigua milliQ	fins 1 litre.

- **Altres fonts de carboni:** En els cultius que necessitàvem canviar la font de carboni per estudiar l'expressió de l'enzim Bdh1p es va preparar una variant del medi ric YPD tal i com es veu a continuació:

Extracte de llevat (1%)	10 g
Bacto-peptona (2%)	20 g
Bacto-agar (2%)	20 g
Aigua milliQ	fins 900 ml.

La font de carboni es preparava 10 vegades concentrada (10x) i s'afegia una vegada ja s'havia autoclavat el medi i aquest tenia una temperatura d'entre 45 i 50°C. A continuació es presenta una llista amb els diferents compostos utilitzats com a font de carboni, les quantitats necessàries per preparar 100 ml de solució (en grams o mililitres), la concentració final d'ús (en percentatge) i el mètode d'esterilització utilitzat:

Galactosa (2%)	20 g	Autoclau
Etanol (3%)	30 ml	Filtració
2,3-Butanodiol (3%)	30 ml	Filtració
Acetat (3%)	30 g	Filtració

En cas que s'utilitzés com a font de carboni glucosa al 20%, la solució concentrada es preparava al 50% i la base de peptona i extracte de llevat es dissolia en el volum adequat per obtenir una concentració final d'extracte de llevat del 1% i de bacto-peptona del 2%.

- **Medi ric (YPD) amb antibiòtic:** La soca industrial de llevat i la soca S288C són soques que no contenen cap marcador auxotròfic corrent per el qual seleccionar-les durant les manipulacions genètiques. En aquest cas es van utilitzar dues resistències a antibiòtic, geneticina (G418) i pleomicina. Es preparaven solucions mare concentrades i s'afegien al medi un cop fos a punt de ser plaquejat o un cop fos fred si el medi era líquid:

- *geneticina (G418):* la solució concentrada es preparava a 100 mg/ml i s'esterilitza per filtració mitjançant filtres de 0,22 µm de porus. La solució estèril s'aliquotava en tubs tipus eppendorf estèrils i es guardava a -20°C fins al seu ús. La solució de treball depenia de la soca de llevat, essent de 50 µg/ml per a la SID i 200 µg/ml per la resta de soques de laboratori.

- *pleomicina:* en aquest cas es va preparar la solució mare a 20 mg/ml, i com en el cas de la geneticina, s'aliquotava en tubs tipus eppendorf i es conservava a -20°C fins que se n'hagués de fer ús. Aquest antibiòtic només es va utilitzar per seleccionar transformants de la soca industrial i es va utilitzar a una concentració de treball de 100 µg/ml.

- **Medi mínim suplementari (SMM) o medi Wickerham's:** Aquest medi s'utilitzava per seleccionar llevats per alguna auxotrofia. Es troba compost per un medi mínim sintètic (SD) que conté sals, vitamines, una font de nitrogen i glucosa al quals se li afegeixen diferents suplementes de creixement.

El medi mínim sintètic (SD) està compost per:

Base de nitrogen sense amoni i sense aminoàcids (0,17%)	1,7 g
Sulfat d'amoni (5%)	50 g
Glucosa (2%)	20 g
Bacto-agar (2%)	20 g
Aigua milliQ	fins 1 litre.

El medi mínim suplementat (SMM) es prepara afegint al medi SD estèril un volum adequat de la solució suplementària concentrada (Drop-out Mix) que conté els elements necessaris per al creixement del llevat (Annex, punt 1).

- **Medi especial amb àcid 5-Fluoro-oròtic (5-FOA):** Aquesta selecció es basa en la observació que les soques amb el gen *URA3* funcional no creixen en presència de l'anàleg de pirimidina àcid 5-fluoro-oròtic (5-FOA). D'aquesta manera es realitza una selecció negativa del llevat i només creixen els mutants *ura3* amb el gen no funcional. El medi està compost per:

Base de nitrogen sense amoni i sense aminoàcids (0,17%)	1,7 g
Sulfat d'amoni (5%)	50 g
Galactosa (2%)	20 g
Drop-out – Ura (1x)	100 ml
Uracil (20 mg/l)	20 mg
5-FOA (0,1%)	1 g
Aigua milliQ	fins 500 ml.

Dissolem els components anteriors i esterilitzem per filtració amb filtres de 0,22 µm de diàmetre de porus.

Per separat autoclavem:

Bacto-agar (2%)	20 g
Aigua milliQ	fins 500 ml.

Es barregen les dues solucions quan la solució d'agar no sigui gaire calenta i ja es poden fer les plaques.

Un cop preparats els medis de cultiu, el creixement cel·lular s'aconsegueix incubant el medi líquid a 30°C i 250 r.p.m. en un agitador orbital (Radiber S.A.) i es seguia la densitat òptica a 600 nm utilitzant un espectrofotòmetre Cary 400 Bio (Varian Associates Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.). Les mesures es consideraven correctes si els valors entraven a l'interval 0,3-0,7. Si era necessari, es diluïa el cultiu amb el mateix medi que s'estava utilitzant. En alguns experiments les condicions de temperatura, però sobretot d'agitació variaven, i en aquest cas es troba especificat en l'apartat corresponent. El creixement en medi sòlid es realitzava en una estufa a 30°C (Radiber S.A.) durant el temps necessari perquè apareguessin colònies individuals.

3.2 Medis de cultiu de bacteris.

Com en el cas dels medis de llevat, els medis s'esterilitzaven durant 20 minuts a 121°C i 1 kg/cm². El medi sòlid es mantenia durant 3 mesos a 4°C. Per a la preparació de medi líquid, l'agar no es va afegir a la barreja de components.

-Medi LB (Luria-Bertani): Aquest és el medi ric utilitzat en la preparació de cèl·lules competents i en les transformacions de *E. coli*.

Bacto-triptona (1%)	10 g
Extracte de llevat (0,5%)	5 g
NaCl (1%)	10 g
Bacto-agar (1,5%)	15 g
Aigua milliQ	fins 1 litre.

Ajustem el pH del medi a 7,2 amb NaOH.

- Medi TB (Terrific Broth): Aquest va ser el medi triat per fer les minipreparacions de DNA plasmídic, doncs s'obté un major nombre de cèl·lules/ml que per un mateix volum de medi LB.

Bacto-triptona (1,2%)	12 g
Extracte de llevat (2,4%)	24 g
Glicerol (0,4%)	4 ml
Fosfats de TB 10x	100 ml
Aigua milliQ	fins 1 litre.

- Fosfats TB 10x:

- 0,17 M KH₂PO₄
- 0,72 M K₂HPO₄

- Medis amb antibiòtic: Per seleccionar els vectors que hem manipulat es va utilitzar la resistència a l'antibiòtic *ampicilina*. Aquest es preparava en una solució concentrada de 50 mg/ml que es filtrava amb membranes de 0,22 µm de porus. Es guardava a -20°C en alíquotes de 1 ml en tubs estèrils tipus Eppendorf. La

concentració de treball era, generalment, de 50 $\mu\text{g/ml}$ en cultius líquids i de 75 $\mu\text{g/ml}$ en cultius sòlids.

4. Mètodes espectrofotomètrics.

4.1 Determinació de l'activitat enzimàtica.

L'activitat enzimàtica es va determinar en un espectrofotòmetre Cary 400 Bio (Varian Associates Inc., Palo Alto, CA. EE.UU), amb termostatització. Es va medir la variació d'absorbància a 340 nm, detectant increments o decrements de NADH. En tots els casos l'activitat enzimàtica es va determinar a partir de la velocitat inicial, en cubeta de 1 ml amb 1 cm de pas òptic i a 25°C, excepte per determinar la K_m per al NADH que es van utilitzar cubetes de 0,2 cm de pas òptic i 0,6 ml de volum. L'activitat s'ha expressat en Unitats Internacionals. Una unitat (U) correspon a la quantitat d'enzim que produeix o consumeix 1 μmol de NADH per minut. La quantitat de NADH s'ha calculat tenint en compte el coeficient d'extinció molar de 6220 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ per el NADH a 340 nm.

4.1.1 Activitats amb la *Bdh1p*. Activitat estàndard.

Per identificar algun dels substrats de la *Bdh1p*, es va treballar amb extractes crus de la soca WV36-405 transformada amb el constructe pYES2-*BDH1* i amb el vector pYES2, crescudes en galactosa 2% per tal d'induir l'expressió del gen *BDH1*. L'activitat es va assajar amb quatre alcohols: sorbitol, 2,3-butanodiol (mescla d'isòmers), etanol i xilitol, a diferents concentracions: 3 mM i 10 mM. La concentració de NAD^+ era 2 mM en tampó de glicina 0,1 M/NaOH, pH 9. L'assaig començava en afegir el substrat.

Per la determinació del perfil d'activitat en funció del pH es va utilitzar 10 μl d'enzim parcialment purificat per cromatografia en hidroxilapatit (121,2 U/mg, $K_{m_{\text{aprox}}} = 12 \text{ mM}$), NAD^+ 1,25 mM i (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol 10 mM per determinar el perfil d'oxidació, i NADH 0,2 mM i acetoïna 10 mM per determinar el perfil de reducció. Els tampons utilitzats pels diferents pH van ser:

- acetat sòdic 0,1 M/àcid acètic, pH 4,0 i 5,0
- fosfat sòdic 33 mM/NaOH, pH 6,0 i 7,0
- pirofosfat sòdic 33 mM/àcid ortofosfòric, pH 8,0

- glicina 0,1 M/NaOH, pH 9,0 i 10,0.

L'activitat estàndard es va determinar amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol 120 mM, NAD⁺ 5 mM en tampó pirofosfat de sodi 33 mM /àcid ortofosfòric pH 8,0. Per estimar l'especificitat de substrat de la Bdh1p, es van determinar les activitats amb altres alcohols a una concentració de 100 mM, en el mateix tampó i a una concentració saturant de NAD⁺ (5 mM). L'activitat estàndard per a la reducció es va determinar amb acetoïna 50 mM i NADH 0,2 mM en tampó fosfat de sodi 33 mM /NaOH pH 7,0. Les activitats amb les dicetones i compostos amb grups alcohol-cetona contigus es van determinar també a 50 mM, en el mateix tampó i amb NADH a 0,2 mM. Tots els compostos assajats es van preparar dissolent-los en els tampons d'activitat. Els aldehids i cetones es preparaven de nou cada cop que s'havien de fer mesures espectrofotomètriques.

Per a la determinació de les constants de Michaelis (Km) es van usar concentracions saturants de coenzim i 5 concentracions diferents de substrat assajades per duplicat. La Km es va determinar un mínim de 3 vegades, de manera que la Km definitiva és el resultat de la mitja dels valors obtinguts. Les dades cinètiques es van analitzar mitjançant el programa de regressió no lineal Grafit versió 5.0.0 (Erithacus Software Ltd., 1989-2001).

Per determinar l'especificitat de coenzim de la Bdh1p es van utilitzar diferents concentracions de NADP⁺ i NADPH en les activitats. Per a la oxidació es va utilitzar (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol 120 mM en tampó pirofosfat de sodi 33 mM /àcid ortofosfòric pH 8,0 i es va afegir NADP⁺ a diferents concentracions: 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4 i 5 mM. Per a la reducció, es va assajar l'activitat amb acetoïna 50 mM en tampó fosfat de sodi 33 mM /NaOH pH 7,0 i NADPH a les concentracions: 0,072, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 i 1 mM. Els resultats es van comparar amb l'activitat de l'enzim en les condicions estàndard per la oxidació (NAD⁺) i per la reducció (NADH).

4.1.2 Activitats amb l'Adh2p. Activitat estàndard.

En el cas de l'Adh2p l'activitat estàndard es va mesurar amb etanol 33 mM, NAD⁺ 2,4 mM en tampó glicina 0,1 M/NaOH pH 10,0, essent la concentració d'etanol i NAD⁺ saturants per l'enzim (Ebisuzaki i Guzman Barros, 1957, i Ganzhorn i cols., 1987).

Les activitats amb els compostos que són substrats de la Bdh1p (diols, grups alcohol-cetona i dicetones contigus) es van mesurar en les mateixes condicions que en l'apartat 4.1.1. Només variava el tampó per la oxidació de substrats, que per la Adh2p es va utilitzar el mateix de la reducció (pH 7,0) o bé tampó glicina 0,1 M/NaOH pH 10,0.

La Km per l'etanol es va determinar com en l'apartat 4.1.1 en tampó glicina 0,1 M/NaOH pH 10,0. Les dades cinètiques es van analitzar mitjançant el programa de regressió no lineal Grafit versió 5.0.0 (Erithacus Software Ltd., 1989-2001).

4.2 Quantificació de glucosa en el medi.

Per quantificar la glucosa present en medi de llevat es va utilitzar el kit "Glucose (GO) assay kit" (Sigma) que es basa en diferents reaccions enzimàtiques acoblades finalitzant el procediment amb una acidificació per addició d'àcid sulfúric (figura 10).

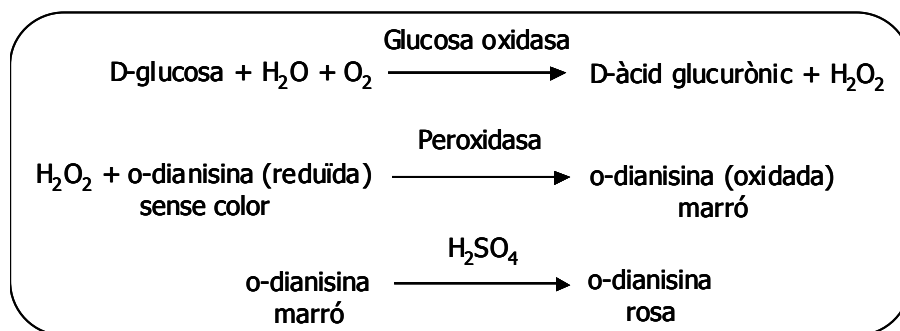


FIGURA 10: Reaccions acoblades a la detecció de glucosa en el medi de llevat.

La glucosa present a la mostra s'oxida a àcid glucorònic i peròxid d'hidrogen per acció de l'enzim glucosa oxidasa. Aquest peròxid d'hidrogen reacciona amb el compost o-dianisina (kit) que en presència de peroxidasa s'oxida i el compost canvia a color marró. Finalment s'afegeix àcid sulfúric per obtenir un compost final més estable de color rosa. L'absorbància del color rosa es mesura a 540 nm i és proporcional a la quantitat original de glucosa a la mostra.

Procediment: Es va fer créixer la soca FY834 en medi YPD i YP glucosa 20% i es van recollir 10 ml de medi a diferents etapes de creixement (seguint el creixement per la O.D.₆₀₀). Les mostres es centrifugaven en tubs de polipropilè estèrils de 15 ml en una centrífuga de sobretaula (Heraeus Megafuge 1.0R) a 4.000 r.p.m. (3.000 xg), 10 min a 4°C, i es filtraven amb filtres de 0,22 µm de porus per eliminar partícules en suspensió

que poguessin quedar en el medi. En aquest punt es guardaven duplicats (1 ml) de les mostres a -20°C fins el moment de la quantificació.

Es preparaven, per duplicat, diferents quantitats de glucosa (1 a 20 μg , corba patró) i dues dilucions diferents de les mostres en un volum de 500 μl en aigua milliQ, se'ls afegia 1 ml de reactiu enzimàtic (Sigma), es mesclava vigorosament i es deixava reaccionar 30 min a 37°C en un bany d'aigua termostatitzat. Passat aquest temps es parava la reacció amb 1 ml de H_2SO_4 12 N, agitant de nou vigorosament. Finalment es llegia l'absorbància de les mostres a 540 nm i s'extrapolava la quantitat de glucosa de les mostres a partir de la recta patró.

5. Mètodes electroforètics.

5.1 Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS.

L'electroforesi de poliacrilamida amb SDS es va realitzar segons el procediment descrit per Laemmli (1970) en un sistema minigel vertical (Bio-Rad, Miniprotean II). El gel separador es preparava al 11% d'acrilamida i el tampó utilitzat era Tris 25 mM, glicina 0,2 M, pH 8,4 i SDS 0,1%.

Es van utilitzar patrons de pes molecular BENCHMARKTM Protein Lader (GIBCOTM) i patrons de baix pes molecular de Bio-Rad (Low Range SDS-PAGE Standards).

5.2 Electroforesi en gels de poliacrilamida no desnaturalitzants.

La separació de proteïnes mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions no desnaturalitzants es va realitzar en l'equip electroforètic *PhastSystem*TM (Pharmacia LKB Technologies, Uppsala, Suècia). Es van utilitzar gels en gradient de poliacrilamida del 8 al 25% (PhastGel gradient 8-25, Amersham Biosciences) optimitzat per separar proteïnes globulars de 70 fins a 750 kDa.

El programa utilitzat en la separació fou el descrit en el manual de l'usuari com *Separation technique file n° 120* que consta de tres etapes: 1) 10 Vh a 400 V, 2) 2 Vh a 400 V (aplicació de la mostra), i 3) 268 Vh a 400 V. L'electroforesi es va realitzar a 15°C i es va deixar més temps de separació que el programat (fins 500 Vh) per obtenir una bona separació de les proteïnes, doncs en el gel de gradient d'acrilamida la relació entre

el logaritme del pes molecular i la distància correguda al gel és lineal, i se'n pot determinar el pes molecular de la proteïna problema (Bdh1p) a partir de la recta de calibració amb els marcadors. Es van fer servir 3 marcadors: catalasa (220 kDa), formaldehid deshidrogenasa (FALDH) de *S.cerevisiae* (80 kDa) i ovoalbúmina (43 kDa).

5.3 Electrofocalització analítica.

L'electrofocalització analítica consisteix en separar diferents proteïnes segons el seu punt isoelèctric. En el nostre cas es va realitzar en condicions no desnaturalitzants en gels de poliacrilamida, i es va utilitzar per trobar el punt isoelèctric de la Bdh1p. Al llarg del temps es va veure que aquesta també era una eina molt útil per seguir l'expressió de la proteïna en diferents condicions de creixement, i ens va permetre detectar l'enzim sense que aquest perdés la seva activitat durant el procés, cosa que no es va aconseguir amb cap altra tècnica.

5.3.1 Electrofocació analítica mitjançant l'equip electroforètic PhastSystem™.

Aquest tipus d'electrofocació es va fer servir per determinar el punt isoelèctric de la Bdh1p. En aquest cas es van utilitzar gels amb un rang de pH de 3,0 a 9,0 (PhastGel IEF 3-9) que inclouen els amfolits (Pharmalyte™). El programa que es va utilitzar és el que el manual de l'usuari defineix com *Separation technique file n°100* que també consta de tres etapes: 1) 75 Vh a 2000 V, 2) 15 Vh a 200 V (aplicació de la mostra), i 3) 410 Vh a 2000 V. L'isoelectroenfoc es va realitzar a 15°C.

Un cop finalitzat l'isoelectroenfoc, el gel es tallava en dos i es tenyia la part amb la mostra de la Bdh1p per activitat butanodiol deshidrogenasa, i el carril dels marcadors (kit de calibració d'isoelectroenfoc, Amersham Biosciences) per tinció amb blau de Coomassie.

5.3.2 Electrofocació analítica en el sistema minigel vertical (Bio-Rad, Miniprotean II).

Robertson i cols. (1987) van descriure un mètode per crear els gels d'isoelectrofocació analítica en el sistema de minigels verticals (Miniprotean II, Bio-Rad). Aquest mètode consisteix en crear un gradient de pH afegint amfolits del rang de pH desitjat a la barreja de polimerització dels gels d'acrilamida. En el nostre cas es van utilitzar amfolits d'interval de pH 3,0-10,0 (Pharmalyte™, Amersham Biosciences AB).

Degut a la inestabilitat de la Bdh1p, els tampons catòdics i anòdics contenien un 10% de glicerol. El camp elèctric que s'aplicava era el següent:

- 200 V, 1h 30 min
- 400 V, 1h 30 min

Es va utilitzar aquest tipus d'electroenfoc per detectar l'activitat Bdh1p en homogenats perquè permetia carregar més quantitat de mostra que en el sistema del *PhastSystem*TM.

5.3.3 Electrofocació analítica amb gels prefets d'interval de pH 3,0-10,0 (Bio-Rad).

L'últim dels tres sistemes d'isoelectroenfoc utilitzats en aquesta tesi és un sistema reproduïble que permet carregar fins 50 µl de mostra. S'adquirien els gels ja polimeritzats d'interval de pH 3,0-10,0 (Ready Gel IEF pH 3-10, Bio-Rad), així com els tampons d'electroforesi. D'aquesta manera asseguràvem que la separació de les proteïnes fos repetitiva en diferents experiments. El protocol es va seguir tal i com indicava la casa comercial (<http://www.bio-rad.com>) amb el següent programa d'electrofocalització:

- 100 V, 1h
- 250 V, 1h
- 500 V, 30 min

En aquest tipus d'isoelectroenfoc l'enzim Bdh1p conservava la seva activitat. Al final de les electroforesis els gels es tenyien per activitat.

6. Tincions de proteïnes en gels de poliacrilamida.

6.1 Tinció de proteïnes per blau de Coomassie i per sals de plata.

Per la tinció amb blau de Coomassie (Sambrook i Russel, 2001) i amb sals de plata (Blum i col·laboradors (1987), modificat per Blázquez (1988)) es varen seguir els protocols estàndards establerts.

6.2 Tinció per activitat.

Aquest tipus de tinció és una eina molt útil per detectar la Bdh1p i l'Adh2p en homogenats sense haver de tenir-les aïllades ni sense haver de disposar d'anticossos específics contra elles. Vam fer dos tipus de tincions: oxidació d'alcohols i reducció de cetones.

6.2.1 Tinció d'activitat per oxidació d'alcohols.

Aquesta tinció es basa en aprofitar l'activitat de les deshidrogenases actives amb NAD^+ o NADP^+ . Allà on ha quedat l'enzim un cop acaba l'electroforesi es produeix la reducció del coenzim (i oxidació del grup alcohol) que transfereix els electrons a una substància (NBT) que en acceptar-los precipita formant un compost lilós.

El substrat utilitzat per detectar la Bdh1p va ser el 2,3-butanodiol (mescla d'isòmers) a 500 mM (tinció BDH).

Es preparaven 250 ml de la solució protegida de la llum:

Tris-HCl 50 mM pH 8,6

240 mg d'àcid pirúvic

100 mg NAD^+ grade AA1

50 mg NBT ("nitroblue" tetrazolium)

5 mg PMS (metasulfat de N-metilfenazoni)

A la mescla s'afegia la quantitat necessària de 2,3-butanodiol per obtenir la concentració final de 500 mM. Era important que el pH no fos superior a 8,6 per evitar que el NBT precipités de manera no específica i ens augmentés el soroll de fons.

La barreja final amb el 2,3-butanodiol s'afegia a les cubetes de tinció que contenen els isoelectroenfocs i s'incubaven a 40°C en un bany metabòlic per accelerar la reacció, sempre protegides de la llum, fins que apareixien les bandes d'activitat. La tinció s'aturava fent diferents rentats amb aigua de l'aixeta.

Els gels es digitalitzaven amb un densitòmetre (GS-700 Imaging densitometer, Bio-Rad) en el servei de tractament d'imatges del Laboratori de Fotodocumentació d'Electroforesi, Autoradiografies i Luminiscència (LAFEAL) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

6.2.2 Tinció d'activitat per reducció de cetones.

Aquesta és l'adaptació d'un protocol descrit per Van Iersel i cols. (2000) en que s'aprofita la propietat del coenzim NADH (o NADPH) d'emetre fluorescència quan s'il·lumina amb llum ultraviolada. La tinció es realitza en dues etapes: primer es submergeix el gel en una solució que conté el coenzim reduït i després de treure'n l'excés, el gel es posa en contacte amb un paper impregnat de la solució de substrat. Al lloc on tenim l'enzim desapareix fluorescència perquè hi ha oxidació del coenzim a NAD^+ , que ja no n'emet.

Es va seguir el protocol:

- 1.** Es realitza un isoelectroenfoc amb les mostres per analitzar i es submergeix el gel en 25 ml d'una solució de BisTris-HCl 20 mM pH 7,0 que contingui NADH 1 mM.
- 2.** Es sumergeix el gel d'isoelectroenfoc en aquesta solució, protegit de la llum, durant 15 min en gel.
- 3.** S'elimina el tampó que conté el coenzim i n'assequem l'excés.
- 4.** Es cobreix el gel amb un paper de filtre que està impregnat en una solució de substrat dissolt en BisTris-HCl 20 mM pH 7,0.
- 5.** Es deixa 5 min a temperatura ambient i s'observa al transil·luminador de llum ultraviolat. Si encara no ha aparegut cap banda d'activitat es deixa el gel en contacte amb la solució de substrat el temps necessari fins que apareguin, controlant l'evolució del procés al transil·luminador.

En el nostre cas es van utilitzar dos substrats, acetoïna (tinció AR) i diacetil (tinció DR), a una concentració de 50 mM, tant per detectar la Bdh1p com l'Adh2p. Les imatges dels gels es van capturar il·luminant el gel en un transil·luminador de llum ultraviolada acoblat a una cambra de vídeo (GelDoc 1000, Bio-Rad) al servei de tractament d'imatges LAFEAL (UAB).

7. Separació de proteïnes per cromatografia.

7.1 Cromatografia en DEAE-Sepharose Fast Flow.

Aquest tipus de cromatografia es va aplicar al primer pas de la purificació de l'Adh2p. El grup funcional és el dietilaminoetà, que al pH de treball de 7,5 es troba protonat i funcional.

L'equilibrat de la resina es va fer en "batch" afegint:

- 2 volums de Tris-HCl 100 mM pH 7,5, DTT 0,5 mM.
- 10 volums de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, DTT 0,5 mM.

Un cop la resina estava equilibrada s'empaquetava dins la columna sota la força de gravetat. Un protocol general de la preparació, equilibrat, empaquetament i regeneració de la DEAE-Sepharose es troba descrit per Julià (1987).

7.2 Cromatografia en Hidroxilapatit Bio-Gel HT.

L'hidroxilapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}_2$) és una forma cristal·lina de fosfat de calci. La resina hidroxilapatit Bio-Gel HT es va empaquetar i equilibrar seguint el protocol establert per la Dra. Fernández (1998).

Degut al fort empaquetament que pateix aquesta resina en les condicions d'alta concentració de glicerol i flux elevat, la resina ja no es reutilitza.

7.3 Cromatografia d'afinitat Cibacron Blue 3GA Agarosa.

Aquesta resina d'afinitat porta unida grups Cibacron Blue 3GA, que presenten alta afinitat per diferents classes de proteïnes, entre elles les que utilitzen NAD^+ com coenzim. Es va utilitzar com a segon pas del protocol de purificació de la Bdh1p. L'equilibrat de la columna es va fer en "batch" i amb bomba de succió amb 10 volums de tampó fosfat potàssic 20 mM, DTT 0,5 mM i glicerol 30% a pH 6,8. L'empaquetament de la resina es va realitzar dins la columna sota la força de gravetat.

Per la purificació de l'Adh2p el protocol d'equilibrat va diferir en el tampó utilitzat. Com en el cas anterior es va equilibrar la resina en "batch" i amb bomba de succió però amb 10 volums de tampó Tris-HCl 10 mM pH 7,5, DTT 0,5 mM. Un cop la resina va ser

equilibrada es va empaquetar dins la columna per gravetat. Per a l'Adh2p, la columna d'afinitat amb la resina Cibacron Blue 3GA Agarosa va ser el tercer pas de purificació.

La regeneració de la resina es va fer seguint les instruccions de la casa comercial (Sigma, St. Louis).

7.4 Cromatografia de gel filtració amb la columna Superdex 200 HR 10/30 per HPLC.

La cromatografia d'exclusió molecular es va realitzar a l'última etapa de la purificació de la Bdh1p per dues raons; per extreure l'excés de NADH que podria haver retingut la preparació enzimàtica després del gradient de NADH que es va aplicar en l'etapa de la cromatografia per afinitat en la Blue 3GA Agarosa, i per estimar-ne el pes molecular per comparació amb altres proteïnes de pes conegut.

Es va utilitzar la columna Superdex™ 200 HR 10/30 d'Amersham, columna pre-empaquetada de filtració en gel d'alta resolució, que es va connectar a un sistema HPLC (Waters). La columna té un diàmetre intern de 1 cm i una llargada de 30 cm, amb un volum de 24 ml. Separa proteïnes d'un interval de pes molecular entre 10.000 i 600.000 Dalton.

L'equilibrat es va realitzar fent passar a través de la columna 2 volums de tampó d'elució (NaH₂PO₄ 50 mM pH 7,0, NaCl 0,15 M, glicerol 30% i DTT 0,5 mM) a 0,2 ml/min i la màxima pressió permesa van ser 217 psi. El tampó es va preparar amb aigua milliQ i es va filtrar a través d'un filtre de 0,22 µm de porus. La mostra fou centrifugada en una centrífuga Eppendorf a 14.000 r.p.m. durant 10 min per eliminar partícules en suspensió.

Els patrons de pes molecular que es varen utilitzar foren: β-amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (150 kDa), albúmina de sèrum boví (66 kDa), anhidrasa carbònica (29 kDa) i citocrom c (12,4 kDa) (Sigma).

8. Purificació de la Bdh1p de *Saccharomyces cerevisiae*.

8.1 Estudis d'estabilitat de la Bdh1p en homogenats.

Previament a la purificació es va determinar l'estabilitat de la Bdh1p en l'homogenat. Es va preparar un cultiu de 20 ml de la soca WV-36-405[pYES2-*BDH1*] que es va deixar créixer fins arribar a la saturació, es va recollir el sediment de cèl·lules centrifugant-lo a 3.000 xg durant 10 min a 4°C, i es va trencar amb boles de vidre de 0,5 mm de diàmetre vortejant en 0,5 ml de tampó Tris-HCl 10 mM pH 8,0 i DTT 0,5 mM. Alíquotes de 30 µl d'extracte es van incubar a 4°C en diferents condicions, afegint 270 µl de les solucions:

- DTT 0,5 mM o 2,5 mM en Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 7,0.
- Glicerol 10% o 30% en Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 7,0.
- Diferents pH (Na₂HPO₄ 0,1 M a pH 6,0, Na₂HPO₄ 0,1 M a pH 7,0 i Na₂HPO₄ 0,1 M a pH 8,0).

Es van determinar les activitats a temps 0 i 24 h. Un cop es van trobar les condicions més adequades per mantenir l'estabilitat de l'enzim es va procedir a obtenir un mètode de purificació per la Bdh1p.

8.2 Etapes de la purificació de la Bdh1p.

L'enzim (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol deshidrogenasa es va purificar a partir de 34 g de cèl·lules de la soca BJ5459[pYES2-*BDH1*] crescudes en medi mínim sense uracil i utilitzant galactosa al 2% com a font de carboni i com inductora de l'expressió. Totes les etapes de la purificació es van dur a terme a 4°C.

Es van ressuspèndre les cèl·lules en 34 ml de tampó KH₂PO₄ 20 mM pH 6,8, glicerol 30%, DTT 0,5 mM (tampó d'homogeneïtzació o tampó A) i es van homogeneïtzar en un "Bead-Beater" (Biospec Products) amb boles de vidre de 0,5 mm de diàmetre, fent 4 cicles d'1 min de trencament separats per 2 min de repòs en fred (aigua/gel).

L'homogenat obtingut es va centrifugar en una centrífuga Beckman J2-HS (rotor JA-20) a 29.000 xg durant 1 h a 4°C. El sobrenedant es va filtrar a través de llana de vidre per tal d'eliminar petites partícules sòlides i restes lipídiques. Aquest sobrenedant

(81 ml) es va aplicar a una columna (2 x 10,5 cm) d'Hidoxilapatit Bio-Gel HT equilibrada prèviament amb tampó A i es van recollir fraccions de 10 ml a un flux de 12 ml/h. Es va fer un rentat amb 250 ml del mateix tampó A i l'elució de l'enzim es va realitzar amb un gradient lineal de KH_2PO_4 20-600 mM (200:200 ml) que contenia glicerol 30% i DTT 0,5 mM. Es va mesurar l'activitat Bdh1p estàndard, la A_{280} i la conductivitat (mS) de les fraccions obtingudes. El pic d'activitat es va concentrar en un concentrador Amicon de 200 ml, que a l'hora ens va servir per canviar el tampó de nou a tampó A. Es va obtenir un volum final de 52 ml.

El concentrat es va aplicar a una columna d'afinitat Cibacron Blue 3GA Agarosa (2,4 x 11,5 cm) a un flux de 13,8 ml/h. Es va aplicar un rentat de 330 ml de tampó A seguit d'un gradient lineal de NADH de 0-250 μM (100:100 ml) dissolt en tampó A. Després de rentar una altra vegada amb 185 ml de tampó A, es va aplicar un gradient lineal de NaCl 0-2 M (350:350 ml) en tampó A. Es van recollir fraccions de 5 ml, i les fraccions actives es van concentrar amb un concentrador Amicon. La concentració es va aprofitar per canviar el tampó, i la proteïna va quedar en 6,2 ml de tampó KH_2PO_4 20 mM pH 6,8, glicerol 30%, DTT 0,5 mM. La mostra es va concentrar amb un microconcentrador Amicon (Microcon) fins a 400 μl .

La proteïna concentrada es va aplicar a una columna de gel filtració SuperdexTM 200 HR 10/30 (1x30 cm) prèviament equilibrada amb el tampó NaH_2PO_4 50 mM pH 7,0, NaCl 0,15 M, glicerol 30% i DTT 0,5 mM (tampó B). L'elució de la proteïna es va realitzar amb el mateix tampó a un flux de 0,2/ml min, es van recollir fraccions de 0,3 ml i se'n va analitzar l'activitat Bdh1p. L'enzim purificat es va concentrar i guardar a -80°C fins el seu anàlisi cinètic i estructural.

Al final de la purificació es va quantificar la proteïna present a cadascuna de les fraccions recollides al llarg del procés mitjançant el mètode de Bradford (1970).

9. Purificació de l'Adh2p.

Per a la purificació de l'Adh2p es va partir de 4,8 g de cèl·lules de la soca EG2 (delecionada per al gen *BDHI*) crescudes en medi ric amb 2,3-butanodiol 3% com a font de carboni. Totes les etapes de la purificació es van dur a terme a 4°C.

Es van ressuspèndre les cèl·lules en 30 ml de tampó Tris-HCl 10 mM pH 7,5, DTT 0,5 mM (tampó C) i es van homogeneïtzar seguint el procediment descrit a l'apartat 8.2. L'homogenat es va centrifugar en una centrífuga Beckman J2-HS (rotor JA-20) a 29.000 xg durant 1 h a 4°C. El sobrenedant es va filtrar a través de llana de vidre, i es va dialitzar en 2 l de tampó C durant 6 h, renovant-se el tampó cada 2 h. Al final de la diàlisi es va obtenir un volum de 44 ml.

La mostra dialitzada es va aplicar a una columna de DEAE-Sepharose Fast Flow (2,5 x 17,5 cm), prèviament equilibrada en tampó C. La cromatografia es va realitzar a un flux de 22,2 ml/h i es van recollir fraccions de 10 ml de les quals es va mesurar la A_{280} , la conductivitat (mS), l'activitat estàndard per l'Adh2p, i també l'activitat diacetil reductasa (diacetil 50 mM i NADH 0,2 mM en tampó fosfat de sodi 33 mM pH 7,0). Es va aplicar un rentat de 300 ml de tampó C, seguit d'un gradient de NaCl 0-0,2 M (180:180 ml) en tampó C recollint-se fraccions de 5 ml. Les fraccions que presentaven un pic màxim d'activitat diacetil reductasa (DR) es van concentrar en un concentrador Amicon i es van dialitzar en 2 l de tampó KH_2PO_4 10 mM pH 6,8, 0,5 mM DTT (tampó D) durant 6 h, renovant-se el tampó cada 2 h. El volum de la mostra dialitzada va ser de 2,2 ml.

El concentrat es va aplicar a una columna d'Hidroxilapatit Bio-Gel HT (1,5 x 14,1 cm) prèviament equilibrada en tampó D. La cromatografia es va realitzar a un flux de 18 ml/h i es van recollir fraccions de 5 ml. Es va realitzar un rentat de 150 ml amb tampó D i a continuació es va aplicar un gradient lineal de KH_2PO_4 de 10-600 mM (250:250 ml) a pH 6,8 amb DTT 0,5 mM. Les fraccions actives amb diacetil, que també van resultar ser-ho amb etanol, es van concentrar en un concentrador Amicon i es van dialitzar en tampó C durant 6 h.

El volum final de la diàlisi, 5,4 ml, es va introduir en una columna d'afinitat Cibacron Blue 3GA Agarosa (1,5 x 12,2 cm) equilibrada amb el mateix tampó C. El flux va ser de 22,2 ml/h i es van recollir fraccions de 2 ml. Es va aplicar un rentat de 60 ml amb tampó Tris-HCl 10 mM pH 7,5, DTT 0,5 mM, seguit d'un gradient de NADH de 0-750 μM (60:60 ml) en tampó C. Les fraccions actives amb diacetil es van concentrar per ultrafiltració (concentrador Amicon) i es van passar a través d'una columna de gel filtració PD10 per eliminar l'excés de NADH residual i per canviar el tampó a KH_2PO_4

100 mM pH 7,5, 0,5 mM DTT. Després de determinar-ne l'activitat específica es va afegir glicerol fins un 10% i es van guardar a -80°C fins el seu estudi cinètic.

Al final de la purificació es va quantificar la proteïna present a cadascuna de les fraccions recollides al llarg del procés mitjançant el mètode de Bradford (1970).

10. Espectrometria de masses, i cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses.

10.1 Identificació de l'Adh2p utilitzant espectrometria de masses Maldi-Tof.

La identificació de l'Adh2p purificada es va fer al servei de Proteòmica i Bioinformàtica de la Universitat Autònoma de Barcelona. Es va determinar la identitat de l'enzim mitjançant una digestió amb tripsina i per comparació del mapa de pèptids generat contra els mapes de pèptids teòrics de les proteïnes de llevat que es troben al banc de dades NCBI nr 20010501.

10.2 Cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses (CG-EM) per a l'estudi de l'estereoespecificitat dels enzims Bdh1p i Adh2p.

Per estudiar l'estereoespecificitat dels enzims Bdh1p i Adh2p es van analitzar diferents reaccions enzimàtiques mitjançant CG-EM en el Servei d'Anàlisi Química (SAQ) de la Universitat Autònoma de Barcelona. Es va utilitzar un cromatògraf de gasos 6890 Series II, acoblat a un cromatògraf de masses 5973 (Agilent). L'aparell es trobava connectat a dues biblioteques (Wiley275 - 275.000 espectres, i NiST98 - 130.000 espectres) que recullen els espectres de masses de diferents compostos i així es podia identificar compostos dels cromatogrames dels quals no en teníem l'estàndard.

10.2.1 Estudi de l'estereoespecificitat de la Bdh1p. Reaccions d'oxidació i reducció.

Es van preparar les barreges de reacció (1 ml) en tampó fosfat sòdic 0,1 M pH 7,5. Per a la oxidació es van utilitzar (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol i *meso*-butanodiol a 40 mM cadascun, i NAD^+ 40 mM, i per la reducció es va utilitzar acetoïna a 40 mM i NADH 40 mM. Les mesclades es realitzaven en tubs eppendorf, i la reacció s'iniciava en afegir 2 unitats de l'enzim Bdh1p, deixant-se incubar tota la nit. Els controls es van tractar de la mateixa manera però sense afegir enzim.

En totes les separacions es va utilitzar la columna quiral β -DEXTM 120 (30 m de llarg, 0,25 mm de diàmetre intern) (Supelco). Les mostres no es van poder injectar en medi aquós, per tant es va realitzar una extracció en acetat d'etil de la següent manera:

1. Afegim 0,5 ml d'acetat d'etil a 1 ml de barreja de reacció.
2. Vortegem vigorosament durant 1 min.
3. Centrifuguem a 12.000 xg en una microcentrífuga durant 30 seg.
4. Transferim uns 200 μ l de la solució orgànica (fase superior), recuperats amb una pipeta Pasteur de vidre, a un microvial d'injecció de 100 μ l, i el tanquem.
5. Les mostres es guarden a -20°C fins el moment de la seva injecció.

Els estàndards, que eren una barreja de mescla de (R/S)-acetoïna 40 mM, (2R,3R)-2,3-butanodiol, (2S,3S)-2,3-butanodiol i *meso*-butanodiol 20 mM, es van tractar de la mateixa manera que les mostres i es van injectar tots junts. Es van injectar 2 μ l de mostra amb una relació de split 1:15 i flux constant d'heli en columna a 1,8 ml/min. La temperatura de l'injector era de 250°C i la temperatura d'interfase de 280°C . El programa de temperatura del forn utilitzat va ser:

1. Temperatura inicial de 75°C .
2. Isotherma a 75°C durant 6 min.
3. Increment de temperatura a $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fins a 85°C .
4. Isotherma a 85°C durant 8 min.
5. Increment de temperatura a $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fins a 200°C .
6. Isotherma a 200°C durant 5 min.

L'espectròmetre de masses era de tipus quadrupolar i es determinaven els registres per impacte electrònic a 70 eV en modus scan (m/z 25-100) per fer la identificació dels diferents compostos.

10.2.2 Estudi de l'estereoespecificitat de la Bdh1p i de l'Adh2p. Reaccions de reducció amb sistema de regeneració del NADH.

En un segon grup de reaccions es va introduir un sistema de regeneració del NADH (Hummel, 1997) disminuint així la concentració inicial del coenzim en la barreja de reacció i evitant que inhibís l'enzim. Com a enzim regenerador es va afegir format

deshidrogenasa (FDH) de *S. cerevisiae* que oxida àcid fòrmic a CO₂ reduint el NAD⁺ a NADH. D'aquesta manera les reaccions del enzims problema (en aquest cas Bdh1p i Adh2p) tenen NADH reduït a la barreja de reacció en baixa concentració de manera que no inhibeix els enzims i no constitueix un substrat limitant per la reacció (Figura 11).

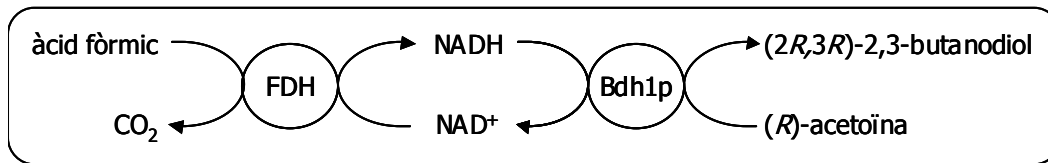


FIGURA 11: Esquema de la regeneració del NADH durant la reacció de reducció de la (R)-acetoïna catalitzada per la Bdh1p de *S. cerevisiae*, acoblada a la reacció d'oxidació de l'àcid fòrmic per la FDH.

Es van preparar les mesclades de reacció (1 ml) en tampó fosfat de sodi 33 mM pH 7,0. Es va utilitzar acetoïna, diacetil i 2,3-pentanodiona a 50 mM cadascun, NADH 1 mM, àcid fòrmic 100 mM i 8 unitats de format deshidrogenasa (FDH) de *S. cerevisiae* comercial (Sigma). Les mesclades es realitzaven en tubs eppendorf i les reaccions començaven en afegir 3,75 unitats de Bdh1p o 1,62 unitats d'Adh2p, incubant-se tota la nit. Es va afegir un blanc de reacció amb acetoïna però sense enzim.

Per a la injecció de les mostres al cromatògraf de gasos el tractament que es va seguir fou el mateix que en l'apartat anterior (10.2.1). Es va injectar 1 µl de mostra amb una relació split 1:15 i flux constant d'heli en columna a 1,8 ml/min. La temperatura de l'injector era de 250°C i la temperatura d'interfase de 280°C..

El programa utilitzat en aquest cas va ser:

1. Temperatura inicial de 75°C.
2. Isotherma a 75°C durant 6 min.
3. Increment de temperatura a 2°C/min fins a 100°C.
4. Increment de temperatura a 20°C/min fins a 220°C.
6. Isotherma a 220°C durant 15 min.

L'espectròmetre de masses és de tipus quadrupolar i es determinaven els registres per impacte electrònic a 70 eV en modus scan (m/z 35-100) per fer la identificació dels diferents compostos.

10.3 Cromatografia CG-EM per a l'estudi de la producció d'estereoisòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoïna durant el creixement de *S. cerevisiae* en medi ric amb glucosa al 20%.

Es va utilitzar un cromatògraf de gasos HP 6890 Series II, acoblat a un cromatògraf de masses 5973 (Agilent) al SAQ de la UAB. L'aparell es trobava connectat a dues biblioteques (Wiley275 - 275.000 espectres, i NiST98 - 130.000 espectres) que recullen espectres de masses de diferents compostos i així podíem identificar compostos dels cromatogrames dels quals no en teníem l'estàndard. Es va utilitzar la columna quiral β -DEXTM 120 (30 m de llarg, 0,25 mm de diàmetre intern) (Supelco).

Es van fer créixer les soques FY834, EG2, FY61, FY6160, FYA2 i EGA2 en 150 ml de medi ric amb glucosa al 20% i es van recollir 10 ml de mostra (per duplicat) als temps 10, 12, 24 i 48 h. Com que les mostres no es poden injectar en medi aquós, es va realitzar una extracció en acetat d'etil de la següent manera:

- 1.** Afegim 2 ml d'acetat d'etil a 6 ml de medi de cultiu centrifugat prèviament a 3.000 xg durant 10 min a 4°C.
- 2.** Vortegem vigorosament durant 1 min.
- 3.** Transferim la barreja a un tub de 15 ml i el centrifuguem a 3.000 xg (Heraeus Biofuge 1.0) durant 15 min a 4°C.
- 4.** Transferim uns 500 μ l de la solució orgànica (fase superior), recuperats amb una pipeta Pasteur de vidre, a un vial d'injecció de 2 ml, i el tanquem.
- 5.** Les mostres es guarden a -20°C fins el moment de la seva injecció.

Els estàndards es van tractar de la mateixa manera que les mostres i es van injectar tots junts. Es va injectar 1 μ l de mostra amb una relació split 1:15 i flux constant d'heli en columna a 1,8 ml/min. La temperatura de l'injector era de 250°C i la temperatura d'interfase de 280°C. El programa de temperatura del forn utilitzat va ser:

1. Temperatura inicial de 75°C.
2. Isotherma a 75°C durant 6 min.
3. Increment de temperatura a 2°C/min fins a 100°C.
4. Increment de temperatura a 2°C/min fins a 220°C.
5. Isotherma a 220°C durant 15 min.

L'espectròmetre de masses és de tipus quadrupolar i es determinaven els registres per impacte electrònic a 70 eV en modus scan (m/z 35-100) per fer la identificació dels compostos.

La quantificació de l'acetoïna i el (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol es va realitzar per calibració externa. Aquesta quantificació és només aproximada perquè les recuperacions en les extraccions dels metabolits del medi són molt baixes (10% per l'acetoïna i inferior al 5% en el cas dels diferents isòmers del 2,3-butanodiol). Tot i així, les extraccions són molt reproduïbles, el que va permetre fer una estimació de la concentració dels dos compostos.

11. Mètodes generals de DNA recombinant.

Els mètodes generals de DNA recombinant que inclouen els diferents passos que cal realitzar en un clonatge es van fer seguint els protocols estandarditzats que es troben a Sambrook i Russel (2001). L'aigua utilitzada per treballar amb DNA va ser de qualitat milliQ (Millipore). Tant l'aigua com els tampons i el material que havien d'estar en contacte amb DNA, *E. coli* o *S. cerevisiae* varen ser autoclavats a 121°C durant 20 min. Els tampons que no podien ésser autoclavats es van filtrar a través d'un filtre de 0,22 µm de porus.

11.1 Vectors.

11.1.1 Vectors bacterians.

- **pFA6-kanMX4:** és un vector dissenyat per disrompre gens de *S. cerevisiae* sense haver-los de clonar prèviament. Conté el gen de resistència a la kanamicina del transposó *Tn903* d'*E. coli* sota el control de les seqüències reguladores del gen *TEF* del fong filamentós *Ashbya gossypii*. Quan aquest gen es troba en llevat li confereix resistència a l'antibiòtic genèticina enlloc de la kanamicina (Webster i Dickson, 1983). Té aproximadament 4,0 kb i conté dos marcadors de selecció (Kan^r i Amp^r) (Wach i cols., 1994).

- **pUG6:** aquest vector deriva del pFA6-kanMX4 on s'hi han clonat les seqüències *loxP* (34 pb) del sistema de recombinació del bacteriòfag P1 flanquejant el mòdul

d'expressió del gen de la kanamicina. Aquest sistema de recombinació escindeix el DNA que hi ha entre dues seqüències *loxP* orientades en la mateixa direcció ("direct repeats"). Ens va servir per fer disruptions gèniques a *S. cerevisiae* de manera que es pogués recuperar el marcador que s'havia utilitzat. Consta de 4009 pb i dos marcadors de selecció (Kan^r i Amp^r) (Güldener i cols., 1996).

11.1.2 Vectors llançadora bacteri-llevat.

Els vectors que es llisten a continuació s'han utilitzat per expressar la Bdh1p i també per obtenir plasmidis derivats amb marcadors diferents als que portaven.

- **pYES2:** vector comercial (Invitrogen Life Technologies, U.K.) derivat del grup dels pUC que porta uns 1.400 pb de la regió 2μ de *S. cerevisiae* i 455 pb de l'ori f1 que el permet replicar-se en els dos microorganismes. Aquest és un vector d'expressió de proteïnes en *S. cerevisiae* sota el control del promotor *GAL1* i amb la seqüència terminadora del gen *CYC1*. Té 5,9 kb i dos marcadors de selecció: Amp^r per la selecció en bacteri i el gen *URA3* per a la selecció en llevat.

- **pAAH5:** modificació del vector 2μ Yep13. Porta clonat 1500 pb del promotor i 450 pb del terminador del gen *ADH1*, que es poden escindir per digestió amb *Bam*HI. L'únic lloc de restricció, i per tant de clonatge, és el lloc *Hind*III. És un vector molt gran (12,5 kb) i l'inconvenient de treballar amb ell és que no està seqüenciat, només es coneix la seqüència exacta de promotor i terminador. Té gran capacitat d'expressió doncs el promotor *ADH1* està considerat un promotor fort. Com en el cas anterior, conté dos marcadors de selecció: Amp^r per a la selecció en bacteri i el gen *LEU2* per a la selecció en llevat (Ammerer, 1983).

- **pRS316:** aquest vector d'expressió en *S. cerevisiae* es diferencia dels dos anteriors en què l'origen de replicació és la seqüència *CEN6/ARSH4*. La peculiaritat d'aquesta seqüència és que en ser centromèrica, determina que només hi hagi una còpia del vector a la cèl·lula. Com abans, conté el marcador de selecció per bacteri mitjançant Amp^r i el marcador de selecció en llevat mitjançant el gen *URA3*. Té 4895 pb (Sikorski i Hieter, 1989).

- **YDpW i YDpH:** aquests dos vectors llançadora són derivats del vector pUC9 i només difereixen en el marcador que tenen per seleccionar en llevat. YDpW conté el

marcador *TRP1*, mentre que el YDpH té el *HIS3*, i ambdós marcadors es poden obtenir per digestió del vector amb *Bam*HI. Tots dos tenen el gen de resistència a l'ampicilina (Amp^r) per seleccionar-los en bacteri, i origen de replicació bacterià. La mida és relativament petita per ser un vector llançadora bacteri-llevat: 3865 pb el YDpH i 3538 pb el YDpW (Berben i cols., 1991).

- **pSH47**: el vector derivat del vector pRS416 de llevat que conté la seqüència de la Cre recombinasa del bacteriòfag P1 sota el control del promotor *GAL1*. Conté l'origen de replicació *CEN/ARS* per replicar-se en llevat i un origen de replicació bacterià. Es selecciona per Amp^r en bacteri i mitjançant el *locus URA3* en llevat i és de 6979 pb (Guldener i cols., 1996).

- **pSH47-ZEO**: vector construït en el laboratori de la Dra. Sylvie Dequin (grup de Microbiologia, I.P.V., I.N.R.A., Montpellier) mitjançant el clonatge del gen bacterià *Tn5 ble* (controlat pel promotor *TEF1* i el terminador *CYC1* de *S. cerevisiae*) que confereix resistència a la pleomicina als llevats que el porten, i resistència a la zeomicina en bacteris. Té els mateixos marcadors que el vector pSH47 a més de les dues noves resistències a antibiòtics. La mida del vector és d'aproximadament 8,1 kb.

11.2 Extracció de DNA plasmídic de bacteri.

L'extracció de DNA plasmídic de la majoria dels vectors utilitzats es va realitzar mitjançant el kit GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma) seguint les instruccions del proveïdor i a partir de 3 ml de medi TB.

En el cas del vector pAAH5 i els seus derivats pAAY0, pAAY0R, pAAMX i pAAY0RMX es va realitzar el mètode clàssic de la lisi alcalina (Sambrook i cols., 1989) amb lleugeres modificacions. Es creixia cada colònia fins a saturació en 6 ml de medi TB i s'ajustaven els volums de cada solució al volum de cultiu usat.

11.3 Extracció de DNA genòmic de llevat.

Es va utilitzar el protocol d'extracció ràpida de DNA genòmic descrit per Hoffman i Winston (1987), modificat posteriorment per Hoffman (1997).

11.4 Electroforesi de DNA en gel d'agarosa.

La preparació de gels d'agarosa i l'electroforesi horitzontal es va dur a terme tal i com descrigueren Sambrook i Russel (2001).

Per norma general es va realitzar l'electroforesi amb agarosa de baixa EEQ al 0,7% o 0,8% si teníem algun fragment superior a 3 kb o al 1% si es volien separar fragments menors de 1 kb. En tots els casos es va utilitzar el tampó TBE 0,5x (Tris-àcid bòric 45 mM, EDTA 1 mM pH 8,0).

Les imatges del DNA en els gels d'agarosa tenyits amb bromur d'etidi es van digitalitzar en un transil·luminador de llum ultraviolada acoblat a una cambra de vídeo (GelDoc 1000, Bio-Rad) al servei de tractament d'imatges LAFEAL (UAB).

11.5 Preparació i transformació de cèl·lules competents de *S. cerevisiae*.

S'utilitzà el mètode de l'acetat de liti descrit per Becker i Lundblad (1994). És un mètode mitjanament ràpid que té una eficiència de transformació de 10^5 a 10^6 transformants/ μ g de DNA.

És un mètode basat en l'observació que els cations alcalins fan la cèl·lula de llevat competent per incorporar DNA. Després d'una incubació breu de les cèl·lules en acetat de liti tamponat, el DNA transformant s'introdueix amb l'ajut de DNA monocadena d'alt pes molecular, de polietilenglicol (PEG), i d'un xoc tèrmic.

En el cas de les seleccions del llevat per antibiòtic la part final del protocol canvia. Les cèl·lules ja transformades i a punt de plaquejar en el medi selectiu es deixen incubar una nit en medi YPD per permetre l'expressió del gen de la resistència a geneticina o pleomicina. Aquest pas és necessari per l'aparició de transformants.

11.6 Anàlisi informàtic de seqüències de DNA i proteïna.

El càlcul de la T_m dels diferents oligonucleòtids, així com la T_a (temperatura d'*annealing*) de les reaccions de PCR es van realitzar amb el programa PrimerSelect per PC, versió 5.05 (2002) del paquet de software DNASTAR, Inc. (1993-2002). L'anàlisi de seqüències de nucleòtids obtingudes dels serveis de seqüenciació Oswell (Universitat de Southampton, U.K.) i Servicios Genómicos (València, Espanya) es van realitzar amb el

programa MegAlign per PC, versió 5.05 (2002) del paquet de software DNASTAR, Inc. (1993-2002).

Les comparacions de les diferents seqüències de DNA i proteïnes amb les dels bancs de dades es van realitzar amb el programa SDSC Biology Workbench versió 3.2 (<http://workbench.sds.edu>, San Diego Supercomputer Center, A National Laboratory for Computational Science and Engineering, Universitat de Califòrnia, San Diego). Aquest és un programa d'accés públic des de la xarxa d'Internet amb accés a diferents bases de dades. Les seqüències de nucleòtids i de les corresponents seqüències proteiques es van comparar amb les existents als bancs de dades EMBL, GenBank, SwissProt i SGD (<http://www.yeastgenome.org/>, Saccharomyces Genome Database) amb el programa FASTA (Pearson i Lipman, 1988) en el cas de les seqüències de nucleòtids, i amb el BLASTP (Altschul i cols., 1997) per les seqüències proteiques. Els alineaments de seqüències i els arbres filogenètics es van realitzar amb els programes ClustalW versió 1.81 (Thompson, 1994), PHYLIP (Felsenstein, 1989) i TreeView versió 1.6.1 (Page, 1996).

12. Clonatge del gen *YAL060W* (*BDH1*) al vector pYES2.

En el moment de realitzar el clonatge del gen *BDH1*, el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* ja estava seqüenciat (Goffeau i cols., 1996, i Clayton i cols., 1997) i la informació de tots els gens i ORFs es trobaven en la base de dades d'accés públic Saccharomyces Genome Database (SGD, <http://www.yeastgenome.org>). Així doncs, les seqüències de llevat i l'anàlisi dels mapes de restricció que s'han necessitat al llarg de tota la tesi doctoral es van obtenir d'aquesta base de dades, el que va facilitar el disseny de l'amplificació per PCR i el posterior clonatge en diferents vectors.

Per clonar el gen *BDH1* en el vector pYES2 es van dissenyar dos encebadors localitzats als extrems 5' i 3' de l'ORF que incorporaven les dianes de restricció presents al vector. L'encebador YAG0-A, homòleg a l'extrem 5' del gen, incloïa el codó d'iniciació, la diana de restricció per l'enzim *KpnI* i hibridava des de la posició -4 fins la +21 de l'ORF. L'encebador YAG0-B, homòleg a l'extrem 3', incloïa el codó stop, la diana de restricció per l'enzim *EcoRI* i hibrida en les posicions +1124 fins la +1149. Els

oligonucleòtids foren: **YAGO-A**. 5'-GGG GGT ACC AAT TAT GAG AGC TTT GGC ATA TTT C-3', i **YAGO-B**. 5'-GCG GAA TTC TTA CTT CAT TTC ACC GTG ATT GTT AG-3'.

Es va utilitzar 1 μ l (0,54 μ g) de DNA genòmic de la soca S288C per amplificar mitjançant PCR el gen *BDH1*. Es va preparar una mescla de reacció de 100 μ l amb tampó Tris-HCl 20 mM pH 8,8, KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, MgSO_4 2 mM i Triton X-100 0,1%, dNTPs a 200 μ M cadascun, els dos encebadors a 1 μ M i 1 unitat de VentTM_R DNA polimerasa (polimerasa amb capacitat correctora 3'→5'). Es va afegir un control negatiu sense DNA motlle.

La barreja es va sotmetre a 30 cicles de reacció en un termociclador (PTC-150 MiniCyclerTM, MJ Research) organitzats de la següent manera: un pas de 5 min a 95°C, 5 cicles de 1 min a 95°C, 1 min a 57°C i 1 min 20 seg a 72°C, 25 cicles de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C i 1 min 20 seg a 72°C, seguit d'una extensió final a 72°C durant 2 min 40 seg.

El producte de PCR obtingut (1167 pb) es va separar i purificar en un gel d'agarosa per electroelució en sacs de diàlisi. Després de digerir-lo amb els enzims de restricció adequats es va clonar en el vector pYES2 tractat amb els mateixos enzims i posteriorment defosforilat. Es va obtenir el vector pYES2-*BDH1*.

13. Clonatge del gen *ADH2* al vector pYES2.

En aquest cas el procés de clonatge va ser una mica especial doncs els gens *ADH2* i *ADH1* són 88% idèntics en la seqüència de DNA i els oligonucleòtids que es van utilitzar eren idèntics excepte per un sol nucleòtid. Com en el cas del gen *BDH1* també es van dissenyar els encebadors amb dianes de restricció als extrems 5' i 3' de l'ORF per facilitar el posterior clonatge al vector. L'encebador homòleg a l'extrem 5' era el **ADH2-B**: 5'-GGC GGA TCC ATG TCT ATT CCA GAA ACT C-3', homòleg a la regió +1 fins la +19 que incloïa la diana per l'enzim de restricció *Bam*HI i el codó d'inici. L'encebador de l'extrem 3' va ser el **ADH2-E**: 5'-GGC GAA TTC TTA TTT AGA AGT GTC AAC AAC-3', homòleg a la regió +1027 a +1047, contenia la diana per l'enzim *Eco*RI i el codó stop. La regió homòloga del gen *ADH2* dels encebadors era idèntica a la mateixa

regió del gen *ADH1*, excepte per un canvi, ressaltat en negre en l'oligonucleòtid de l'extrem 5', per tant calia esperar l'amplificació dels dos gens a l'hora.

La mescla de reacció es va preparar en un volum final de 100 µl amb 1 µl (0,5-1 µg) de DNA genòmic de la soca S288C, dNTPs a 200 µM cadascun, els dos encebadors a 0,3 µM, i 2,5 unitats de PWO DNA polimerasa (polimerasa amb capacitat correctora 3'→5') en tampó Tris-HCl 10 mM pH8,85, KCl 25 mM, (NH₄)₂SO₄ 5 mM i MgSO₄ 2 mM. El control positiu va ser l'amplificació del gen *BDH1* amb els oligonucleòtids de l'apartat 12, i el control negatiu es va realitzar sense afegir DNA motlle en una de les reaccions.

La reacció es va organitzar en 30 cicles: un pas de 2 min a 95°C, 10 cicles de 15 seg a 95°C, 30 seg a 51,5°C i 1 min a 72°C, 20 cicles de 15 seg a 95°C, 30 seg a 56,1°C i 1 min a 72°C, seguit d'una extensió final a 72°C durant 3 min.

El producte de PCR obtingut (1065 pb) es va separar en un gel d'agarosa i es va purificar i electroeluir amb sacs de diàlisi. Per enriquir el producte en fragments corresponents al gen *ADH2* es va fer una digestió enzimàtica amb l'enzim *KpnI* que digeria de manera específica el gen *ADH1* (presenta una diana de restricció que no es troba en el gen *ADH2*). Els passos posteriors van ser fer la doble digestió *BamHI/EcoRI* per clonar-lo en el vector pYES2, al qual prèviament se li havia eliminat la diana *HindIII* del MCS, s'havia tractat amb els mateixos enzims i defosforilat. La construcció obtinguda es va anomenar pYES-*ADH2*.

14. Deleció dels gens *BDH1*, *ADH2I* *YAL061W*.

14.1 Construcció de les diferents soques delecionades pel gen que codifica per la *Bdh1p*.

*14.1.1 Estratègia per delecionar el gen *BDH1*.*

La deleció es va realitzar per substitució de part de la zona codificant del gen *BDH1* per el gen *TRP1* (figura 12).

Es van extreure 361 pb de la zona codificant del gen *BDH1* mitjançant digestió del vector pYES2-*BDH1* amb l'enzim *MluNI*. Al seu lloc es va subclonar el gen *TRP1* obtingut per digestió del vector YDpW (Berben i cols., 1991) amb *BamHI* i

posteriorment tractat amb T4 DNA polimerasa per fer-ne extrems roms. Aquesta nova construcció es va digerir amb *KpnI*/*EcoRI* per alliberar un fragment d'aproximadament 1,8 kb que contenia el gen *TRP1* flanquejat de dues regions homòlogues als extrems 5' i 3' de la zona codificant del gen *BDH1*. Amb aquest fragment es van transformar les soques FY834 i FY61 i es van seleccionar en medi SMM sense triptòfan. Les colònies que apareixien després de 3-4 dies varen ser aquelles que per recombinació homòloga van substituir el gen original *BDH1* pel fragment anterior que contenia el gen *TRP1*, permetent el creixement de les cèl·lules en el medi sense triptòfan. Els clons apareguts es van replaquejar de nou en medi mínim sense triptòfan per purificar les diferents colònies.

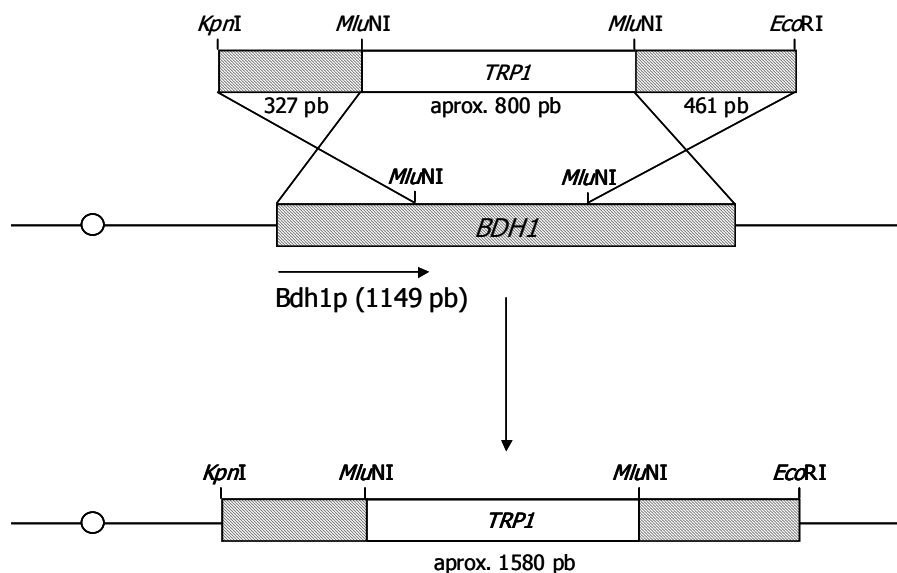


FIGURA 12: Esquema que representa l'estratègia seguida per deletar el gen *BDH1*. Es va digerir el gen *BDH1* amb l'enzim de restricció *MluNI*, de manera que s'alliberava un fragment de 361 pb de la zona codificant, i al seu lloc es va subclonar el gen *TRP1*. Per digestió amb *KpnI* i *EcoRI* es va alliberar el fragment amb què es va transformar la soca de llevat FY834. Els fragments que flanquegen el gen *TRP1*, idèntics al gen *BDH1*, dirigeixen la recombinació al cromosoma correcte de manera que es substitueix la zona codificant del gen *BDH1* del genoma per el gen *TRP1*.

14.1.2 Anàlisi de les noves soques de llevat.

Un cop es van tenir les colònies purificades es van créixer en 10 ml YPD a 30°C i 250 r.p.m. durant tota la nit per fer-ne una extracció de DNA genòmic. L'anàlisi de la integració es va fer per PCR i en les mateixes condicions que a l'apartat 12 dels Materials i Mètodes. Es va realitzar un control positiu amb DNA genòmic de la soca original FY834.

Adicionalment, els clons obtinguts de la transformació de la soca FY834 es van créixer en 10 ml YPD a 30°C i 250 r.p.m. durant tota la nit, es van centrifugar a 3.000 xg durant 10 min i el sediment cel·lular es va llisar amb boles de vidre de 0,5 mm de diàmetre en tampó KH₂PO₄ 20 mM pH 6,8, glicerol 30%, DTT 0,5 mM. Els homogenats es va analitzar per isoelectroenfoc en sistema de minigel vertical i revelat per activitat BDH. Com a control es va utilitzar la mateixa quantitat de proteïna de la soca WV36-405[pYES2-*BDH1*] crescuda en medi mínim en presència de galactosa com font de carboni per induir l'expressió de la Bdh1p.

Les noves soques es van anomenar EG2 (delecionada per el gen *BDH1*) i FY6160 (delecionada per els gens *BDH1* i *YAL061W*).

14.2 Construcció de les diferents soques delecionades pel gen que codifica per l'Adh2p.

14.2.1. Estratègia per delecionar el gen *ADH2*.

La delecio es va realitzar per substitució de part de la zona codificant del gen *ADH2* per el gen *HIS3* de manera anàloga a la delecio del gen *BDH1* (figura 13).

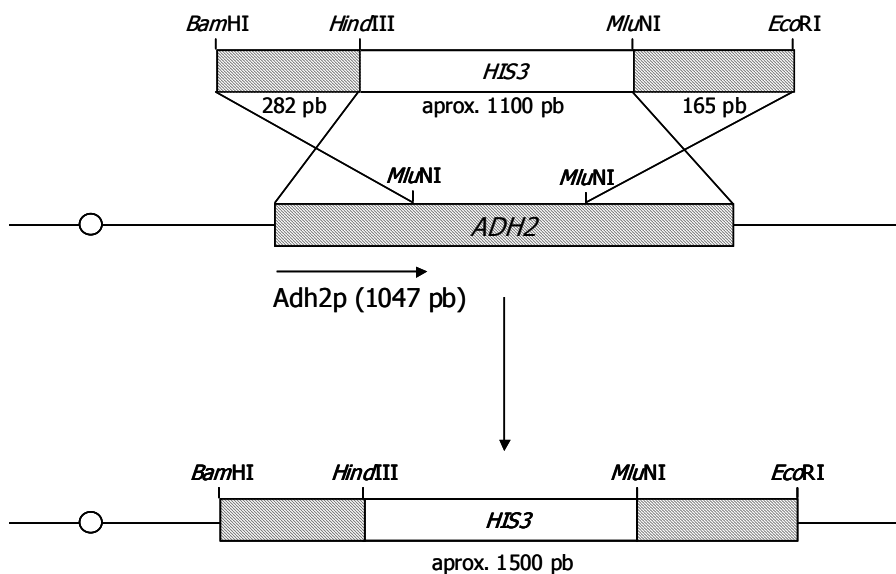


FIGURA 13: Esquema de l'estratègia seguida per delecionar el gen *ADH2*. Es va digerir el gen *ADH2* amb els enzims de restricció *HindIII* i *MluNI*, de manera que s'alliberava un fragment de 600 pb de la zona codificant, i al seu lloc es va subclonar el gen *HIS3*. Per amplificació per PCR es va obtenir un fragment de 1,5 kb amb que es van transformar les soques de llevat FY834 i EG2. Els fragments que flanquegen el gen *HIS3*, idèntics al gen *ADH2*, dirigeixen la recombinació al cromosoma correcte de llevat de manera que es substitueix la zona codificant del gen *ADH2* del genoma per el gen *HIS3*.

Es van treure 600 pb de la zona codificant del gen *ADH2* mitjançant la doble digestió del vector pYES2-*ADH2* amb *Mlu*NI/*Hind*III. Al seu lloc es va subclonar el gen *HIS3* obtingut per digestió del vector YDpH (Berben i cols., 1991) amb *Bam*HI i posteriorment tractat amb T4 DNA polimerasa per fer-ne extrems roms. En aquest cas per obtenir el fragment lineal d'aproximadament 1,5 kb que contenia el gen *HIS3* flanquejat de dues regions homòlogues als extrems 5' i 3' de la zona codificant del gen *ADH2*, es va fer una reacció de PCR.

L'enzim utilitzat en aquest cas va ser la *Taq* DNA polimerasa (Biotools), enzim sense capacitat correctora i utilitzat per fer reaccions de comprovació en les que no era necessari obtenir una fiabilitat al 100% a l'hora d'amplificar el producte.

La mescla de reacció es va preparar en un volum final de 100 µl en el tampó Tris-HCl 75 mM, pH 9,0, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, MgSO₄ 2 mM i 1 µl (aproximadament 10 ng) del vector pYES2-*adh2::HIS3* obtingut anteriorment, dNTPs a 200 µM cadascun, els dos encebadors utilitzats per amplificar el gen *ADH2* en l'apartat 13 a 1 µM, i 2,5 unitats de *Taq* DNA polimerasa. Es va realitzar un control negatiu sense afegir DNA motlle en una de les reaccions. Les condicions d'amplificació són les mateixes que en l'apartat 13, canviant el temps de polimerització a 1 min 45 seg.

El producte de PCR obtingut (~1,5 kb) es va separar en un gel d'agarosa i es va purificar i electroeluir en sacs de diàlisi. Amb aquest fragment es van transformar les soques FY834 i EG2 i es van seleccionar en medi SMM sense histidina. Les colònies que apareixien després de 3-4 dies varen ser aquelles que per recombinació homòloga van substituir el gen original *ADH2* pel fragment anterior que contenia el gen *HIS3*, permetent el creixement de les cèl·lules en el medi sense histidina. Els clons apareguts es van replaquejar de nou en medi mínim sense histidina per purificar les diferents colònies.

14.2.2 Anàlisi de les noves soques de llevat.

Un cop es van tenir les colònies purificades es van créixer en 10 ml YPD a 30°C i 250 r.p.m. durant tota la nit per fer-ne una extracció de DNA genòmic. L'anàlisi de la integració es va fer per PCR en les mateixes condicions que a l'apartat anterior. Es van

afegir dos controls positius, amb DNA genòmic de les dues soques originals FY834 i EG2.

Les soques de llevat obtingudes es van anomenar FYA2 (deleccionades per el gen *ADH2*) i EGA2 (deleccionades pels gens *BDH1* i *ADH2*).

14.3 Construcció de les diferents soques deleccionades per el gen *YAL061W*.

14.3.1. Estratègia per deleccionar el gen *YAL061W*.

L'estratègia per deleccionar el gen *YAL061W* va ser diferent a les utilitzades anteriorment. En aquest cas es va aprofitar la resistència a la geneticina que li confereix al llevat el gen *kanMX4* i es va seguir el protocol establert per Wach i cols. (1998).

Els oligonucleòtids dissenyats foren:

S1. 5'-AAG AAT AAC AAT AAA TTC ATT GAA CAT ATT TCA GAA TGA GAG CGT ACG CTG CAG GTC GAC-3', i

S2. 5'-GGG ATT AAC ACG AGA ACG TGA GTA CTC AAT CAC AAT CAT GTA TCG ATG AAT TCG AGC TCG-3'.

L'oligonucleòtid S1 hibrida a la regió -35 fins la +8 del gen *YAL061W* (regió subratllada), mentre que la resta ho fa al MCS del vector pFA6-*kanMX4* en la regió descrita a Wach i cols. (1998). En l'oligonucleòtid S2 la regió homòloga al gen *YAL061W* és la +1251 fins la + 35 de la regió 3' no codificant (3' UTR) (regió subratllada). L'amplificació es va fer amb l'enzim PWO DNA polimerasa en les condicions descrites per Wach i cols. (1998).

El producte de PCR obtingut (~1,5 kb) es va separar en un gel d'agarosa i es va purificar i electroeluir en sacs de diàlisi. Amb aquest fragment es va transformar la soca FY834 i es va seleccionar en medi YPD + geneticina 200 µg/ml. Les colònies que apareixien després de 3-4 dies varen ser aquelles que per recombinació homòloga van substituir el gen original *YAL061W* per el fragment anterior que contenia el gen *kanMX4*, permetent el creixement de les cèl·lules en el medi amb geneticina. Els clons apareguts es van replaquejar de nou en medi YPD amb geneticina per purificar les colònies i eliminar els falsos positius, més nombrosos degut al propi mètode de selecció.

14.3.2 Anàlisi de les noves soques de llevat.

Un cop es van tenir les colònies purificades es van créixer en 10 ml YPD a 30°C i 250 r.p.m. durant tota la nit per fer-ne una extracció de DNA genòmic. L'anàlisi de la integració es va fer per PCR en les mateixes condicions que descriuen Wach i cols. (1998).

Per l'amplificació es van construir nous encebadors, homòlegs a la zona no codificant del gen *YAL061W* i que disten del codó d'inici i del codó stop uns 100 pb. Els nous oligonucleòtids foren: **SEQ1.** 5'-TTC TTG AAC CTT GTC ATT GG-3' (-128 a -98 de la regió 5' UTR) i **SEQ2.** 5'-CGA TTG GCT CGA TAA ATG-3' (+110 a +128 de la zona 3' UTR). Com que eren reaccions de comprovació es va utilitzar la *Taq* DNA polimerasa en les condicions descrites per Wach i cols. (1998). Es van realitzar un control positiu amb DNA genòmic de la soca original FY834.

El llistat de totes les soques modificades obtingudes es troba a l'annex, punt 2.1.

15. Construcció de vectors seleccionables per genètica per l'expressió de la *Bdh1p* en la soca de llevat industrial SID.

15.1 Construcció del vector pRSMX.

Es va digerir el vector pFA6-*kanMX4* amb *NotI* per alliberar el fragment de ~1,5 kb que contenia el mòdul d'expressió de la kanamicina. Aquest DNA es va clonar al vector pRS316 (Sikorski, 1989) per el mateix lloc de restricció *NotI* després de ser defosforilat, obtenint-se el vector pRSMX.

15.2 Construcció del vector pRSMXY0.

Es necessitava obtenir el gen *BDH1* controlat pel promotor *ADH1*. Per això es va digerir el vector pYES2-*BDH1* amb *EcoRI*. Després de defosforilar el vector es van lligar linkers *HindIII* (en relació molar vector:insert 1:100) i els transformants es van analitzar mitjançant la digestió amb el mateix enzim que alliberava el fragment del gen *BDH1*. El vector resultant es va digerir amb *HindIII* per alliberar el gen *BDH1* flanquejat per les dianes *HindIII* d'aproximadament 1150 pb i es va subclonar en el vector pAAH5 (Ammerer, 1983) digerit amb el mateix enzim i posteriorment defosforilat. El nou vector

es va anomenar pAAY0. El vector pRSMX va servir per clonar el fragment de ~3,0 kb que s'allibera mitjançant la digestió amb *Bam*HI del vector pAAY0.

15.3 Construcció del vector pAAMX.

L'estratègia per construir el vector pAAMX va ser la següent:

Es va escindir el marcador *LEU2* (~2,3 kb) del vector pAAH5 mitjançant una digestió amb *Eco*RI, se'n van fer extrems roms i es va defosforilar. Al seu lloc es va subclonar el fragment lineal de ~1,5 kb digerit amb *Not*I d'extrems roms que contenia el mòdul d'expressió del gen de la kanamicina (*kanMX4*) del vector pFA6-*kanMX4* (Wach i cols., 1994).

15.4 Construcció del vector pAAYORMX.

La construcció d'aquest vector va ser en dues fases. La primera etapa va consistir en clonar el gen *BDH1* al vector pAAH5 (Ammerer, 1983) per extrems roms. Aquest pas era necessari per eliminar la diana *Eco*RI utilitzada en el clonatge del gen *BDH1* en el vector pYES2 (apartat 12), i poder subclonar el marcador de selecció *a posteriori*. Es va obtenir el gen *BDH1* (1149 pb) amb una doble digestió *Kpn*I/ *Eco*RI del vector pYES2-*BDH1* i se'n van fer els extrems roms. En paral·lel es va digerir el vector pAAH5 amb l'enzim de restricció *Hind*III, es van fer extrems roms i es va defosforilar. Es van lligar els dos fragments per obtenir el vector pAAYOR.

En aquest nou vector es va subclonar el mòdul d'expressió del gen de la kanamicina del vector pFA6-*kanMX4* de la mateixa manera que en la construcció del vector pAAMX (apartat anterior).

Els quatre vectors construïts en aquest apartat es van utilitzar per transformar la soca de llevat industrial SID i la de laboratori S288C (annex, punt 2.2).

16. Construcció de soques de llevat modificades genèticament per sobreexpressar la *Bdh1p*.

Part d'aquests experiments es van realitzar en col·laboració amb el grup de Microbiologia del *Laboratoire des Produits de la Vigne* pertanyent al *Institut National de*

la *Recherche Agronomique* de Montpellier (França) sota la direcció de la Dra. Sylvie Dequin i amb l'ajut de la Dra. Florence Saint-Prix.

16.1 Modificació de la soca de laboratori S288C.

16.1.1 Construcció del vector pUGY0 i amplificació per PCR del mòdul d'expressió de la *Bdh1p* i de la *kanamicina* flanquejada per les seqüències *loxP*.

Per modificar genèticament soques de llevat per sobreexpressar una proteïna es va utilitzar una modificació del sistema del Cre-*loxP* descrit per Güldener i cols. (1996). En aquest sistema, de la mateixa manera que es va deletar el gen *YAL061W*, els oligonucleòtids que es dissenyaven eren de 60 bases, on 20 eren homòlogues al vector i 40 ho eren pel lloc de recombinació, en aquest cas, el *locus URA3*.

En aquest protocol de modificació genètica de soques de llevat es va necessitar amplificar fragments grans (3-5,5 kb), per això es va decidir fer servir el sistema d'amplificació Expand Long Template PCR System (Roche). Aquest sistema combina enzims amb i sense capacitat correctora 3'→5' exonucleasa, de manera que s'aconsegueixen amplificacions molt llargues, fins 27 kb a partir de DNA genòmic humà i 40 kb a partir de DNA λ .

Primer es va digerir el vector pAAY0 amb *Bam*HI i es va recuperar el fragment de 3,0 kb que conté el gen *BDH1* sota el control del promotor i terminador del gen *ADH1*. Després d'obtenir els extrems roms per tractament amb la T4 DNA polimerasa es va clonar al vector pUG6 (Güldener i cols., 1996) digerit amb *Eco*RV i defosforilat (vector pUGY0).

Seguidament es va realitzar l'amplificació de tot el fragment per PCR amb els oligonucleòtids:

URA-UG-5. 5'-GAG GGC ACA GTT AAG CCG CTA AAG CAT TAT CCG CCA AGT
GCT TCG TAC GCT GCA GGT CGA C-3' (homòleg al *locus URA3* a la regió +211 fins +250 (part subratllada) i homòleg al MCS del vector pUG6 des del nucleòtid +21 fins al +42, al costat de la regió *loxP*).

URA-UG-3. 5'-GAC CCA ATG CGT CTC CCT TGT CAT CTA AAC CCA CAC CGG GAT
TCA TCA ACT CAT TGC TGG-3' (homòleg a l'extrem 3' del *locus URA3* a la regió +604

fins +643 (part subratllada) i homòleg al terminador *ADH1* en la zona +299 fins la +318 3' UTR).

Es va utilitzar 1 μ l (aproximadament 10 ng) de vector pUGY0 en una reacció de 50 μ l en tampó 1 del kit, dNTPs a 350 μ M cadascun, els dos encebadors a 0,3 μ M i 2,6 unitats de polimerasa. Es va afegir un control negatiu sense DNA motlle. La reacció començava amb una etapa de 5 min a 95°C seguida de 20 cicles de 30 seg a 95°C, 30 seg a 54°C i 9 min a 68°C.

El producte de PCR (~5,0 kb) es va separar en un gel d'agarosa al 0,7% i es va purificar i electroeluir en sacs de diàlisi. Amb aquest fragment es va transformar la soca S288C i es van seleccionar els transformants en medi YPD + geneticina 200 μ g/ml. Les colònies que apareixien després de 3-4 dies varen ser aquelles que per recombinació homòloga van substituir el gen original *URA3* pel fragment anterior que contenia el gen *kanMX4* flanquejat de les seqüències *loxP* i seguit del mòdul d'expressió de la *Bdh1p*, permetent el creixement de les cèl·lules en el medi amb geneticina. Els clons apareguts es van replaquejar de nou en medi mínim amb geneticina per purificar les diferents colònies transformades.

16.1.2 Anàlisi de les noves soques de llevat.

Els clons purificats es van créixer en 10 ml YPD a 30°C i 250 r.p.m. durant tota la nit per fer-ne una extracció de DNA genòmic. L'anàlisi de la integració es va fer per PCR amb uns encebadors homòlegs al *locus URA3* (zona codificant) i més externs a la regió on es va dirigir la integració.

Els encebadors utilitzats foren:

URA3-5. 5'-ATG TCG AAA GCT ACA TAT AAG GAA C-3', (regió +1 fins +25) i

URA3-3. 5'-TTA GTT TTG CTG GCC GCA TCT TCT C-3' (regió +779 fins +804).

Es va preparar una barreja de reacció de 50 μ l de volum en tampó 1, i es va afegir 1 μ l (0,5–1 μ g) de DNA genòmic dels diferents clons obtinguts, dNTPs a 350 μ M cadascun, els dos encebadors a 0,3 μ M i 2,6 unitats de polimerasa. La reacció es va dur a terme amb el mateix programa que en l'apartat anterior.

Adicionalment es van créixer els diferents clons en medi SMM sense uracil per verificar que el gen *URA3* s'havia disromput per la integració del fragment amb què es va transformar la soca S288C.

Vam seleccionar un clon de la nova soca SCU60 i se'n va analitzar l'activitat específica Bdh1p en l'homogenat del cultiu en fase exponencial en medi YPD.

16.1.3 Escissió del marcador de selecció kanMX4 per expressió de la Cre recombinasa del bacteriòfag P1 en la soca SCU60.

Es va transformar la soca SCU60 amb el vector pSH47 i es va seleccionar en medi SMM sense uracil i amb galactosa 2% per induir l'expressió de la Cre recombinasa. Es va fer una rèplica en placa en medi YP amb galactosa 2% i YP amb galactosa 2% i geneticina 200 µg/ml de 40 clons.

Aquells que no van créixer en presència de geneticina es van créixer en 10 ml de YPD a 30°C i 250 r.p.m. durant tota la nit per fer-ne una extracció de DNA genòmic. La pèrdua del marcador *kanMX4* (~1,5 kb) fou analitzada fent la mateixa PCR que en l'apartat anterior (16.1.2).

Es va créixer en estria un dels clons que havien escindit el marcador en una placa de medi SMM + galactosa 2% + uracil + 5-FOA per forçar a perdre el vector pSH47. Les colònies individuals es van créixer per rèplica en placa en medi SMM amb galactosa 2% i uracil, i en medi SMM amb galactosa 2%, uracil i 5-FOA, de manera que els que creixien als dos medis havien perdut el vector.

D'aquesta manera es va obtenir la soca SCU60. Es va analitzar en gels d'isoelectroenfoq l'homogenat del cultiu crescut fins a fase exponencial en medi YPD i trencant les cèl·lules amb boles de vidre de 0,5 mm de diàmetre.

16.2 Modificació de la soca de llevat industrial SID.

16.2.1 Amplificació per PCR del mòdul d'expressió de la Bdh1p i de la kanamicina flanquejada per les seqüències loxP.

Es partia de DNA genòmic de la soca SCU60 obtinguda en l'apartat 16.1.2, per tal d'amplificar el mòdul d'expressió de la Bdh1p i la kanamicina flanquejada per les

seqüències *loxP* que es troba integrat en el *locus URA3*. Per fer això es va realitzar la mateixa PCR que en l'apartat 16.1.2.

El fragment amplificat es va separar en un gel d'agarosa al 0,7% i es va purificar i electroeluir en sacs de diàlisi. Aquest DNA es va utilitzar per transformar la soca de llevat industrial SID, que es va seleccionar en medi YPD amb geneticina 100 µg/ml. Les colònies que apareixien després de 3-4 dies varen ser aquelles que per recombinació homòloga van substituir una còpia del gen original *URA3* per el fragment anterior que contenia el gen *kanMX4* flanquejat de les seqüències *loxP* i seguit del mòdul d'expressió de la *Bdh1p*, permetent el creixement de les cèl·lules en el medi amb geneticina. Els clons apareguts es van replaquejar de nou en medi YPD amb geneticina per purificar les diferents colònies transformades.

16.2.2 Anàlisi de les noves soques de llevat.

Els clons purificats es van créixer en 10 ml YPD a 30°C i 250 r.p.m. durant tota la nit per fer-ne una extracció de DNA genòmic. L'anàlisi de la integració es va fer per PCR amb els encebadors homòlegs al *locus URA3*. El procediment està descrit a l'apartat 16.1.2.

D'aquí se'n van obtenir diferents clons SIDUK60 i se'n va analitzar l'activitat específica *Bdh1p* a fase exponencial en medi YPD.

Es van triar, finalment, els clons SIDUK60.1 i SIDUK60.4.

16.2.3 Escissió del marcador de selecció *kanMX4* per expressió de la *Cre* recombinasa del bacteriòfag P1 en les soques SIDUK60.1 i SIDUK60.4.

Es van transformar les soques SIDUK60.1 i SIDUK60.4 amb el vector pSH47-ZEO i es varen seleccionar en medi YP amb galactosa 2% i pleomicina 100 µg/ml per induir l'expressió de la *Cre* recombinasa. Es va fer una rèplica en placa en medi YP amb galactosa 2% i YP amb galactosa 2% i geneticina 100 µg/ml de 40 clons.

Aquells que no creixien en presència de geneticina es van fer créixer en 10 ml de YPD a 30°C i 250 r.p.m. durant tota la nit per fer-ne una extracció de DNA genòmic. Es va analitzar la pèrdua del marcador *kanMX4* (~1,5 kb) per PCR (17.1.2).

També es va fer créixer en estria un dels clons que havia escindit el marcador en una placa de medi YP amb galactosa 2% de manera que desapareixia la pressió selectiva sobre el vector i el llevat el podia perdre. Les colònies individuals es van créixer per rèplica en placa en medi ric amb galactosa 2%, i amb galactosa 2% i pleomicina 100 µg/ml, de manera que els clons que havien perdut el vector, no creixen en pleomicina .

D'aquesta manera es van obtenir les soques SIDU60.1 i SIDU60.4. Es va determinar l'activitat específica Bdh1p en homogenats de cultiu crescut fins a fase exponencial en medi YPD, i també es varen analitzar per gels d'isoelectroenfoc i tinció del gel per activitat.

Finalment, es va seqüenciar el fragment integrat en el genoma del llevat industrial (Servicios Genómicos, València, Espanya) per confirmar que la seqüència era correcta.

16.2.4 Southern blot no radioactiu de les diferents soques industrials modificades genèticament.

A part de la comprovació per PCR de la modificació genètica, de la seqüenciació i dels gels d'isoelectroenfoc, també es van analitzar les soques de llevat industrial modificades genèticament mitjançant un Southern Blot no radioactiu.

Es van digerir 15 µg de DNA genòmic de les soques SIDUK60.1, SIDU60.1, SIDUK60.4 i SIDU60.4 amb els enzims de restricció *HindIII/EcoRI* i les digestions es van separar en un gel d'agarosa al 0,7% durant tota la nit a 20 Volts. El gel es va digitalitzar amb un regle fluorescent (Bio-Rad) per el posterior anàlisi de les bandes obtingudes en un transil·luminador de llum ultraviolada acoblat a una cambra de vídeo (GelDoc 1000, Bio-Rad) al servei de tractament d'imatges LAFEAL (UAB).

El gel es va preparar per a la hibridació amb la sonda seguint el protocol de Becker i Lundblad (1994). La transferència es va realitzar amb 20x SSC durant 4 hores en el sistema TurboBlotter (Schleicher & Schuell) seguint les instruccions del fabricant. Es va utilitzar una membrana de nylon per la transferència d'àcids nucleics Nytran N (Schleicher & Schuell). Un cop finalitzada es va procedir a hibridar la membrana amb la sonda del gen *BDH1*. La sonda es va obtenir per PCR amplificant una regió interna del gen amb els oligonucleòtids:

SBDH1-5. 5'-ATA TCC CTA GGC CAG AAA TCC-3' (+50 fins +70)

SBDH1-3. 5'-TGT TAG GCG TCA ATA GAA TC-3' (+1108 fins +1127)

La mescla de reacció es va preparar en un volum final de 100 µl en el tampó Tris-HCl 75 mM, pH 9,0, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, MgSO₄ 2 mM i 1 µl de DNA genòmic de la soca S288C, dNTPs a 200 µM cadascun, els dos encebadors a 1 µM, i 2,5 unitats de *Taq* DNA polimerasa. Es va realitzar un control negatiu sense afegir DNA motlle en una de les reaccions. La reacció començava amb un pas de incubació 2 min a 95°C seguit de 30 cicles de 30 seg a 95°C, 30 seg a 53°C i 1 min 30 seg a 72°C. La reacció finalitzava amb una última extensió a 72°C durant 3 min.

El producte de PCR (1077 pb) es va purificar en un gel al 0,8% i es va purificar i electroeluir en sacs de diàlisi. El fragment es va quantificar per densitometria i es va utilitzar per hibridar amb el DNA genòmic de les diferents soques industrials modificades genèticament transferit a la membrana.

La hibridació i revelat del Southern Blot es va realitzar seguint les instruccions del fabricant (<http://www.piercenet.com>, Pierce, EE.UU.) utilitzant films de revelat per quimioluminiscència Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences AB, Suècia).

17. Fermentacions amb most industrial.

Les fermentacions es van realitzar en el departament de Control de Qualitat de l'empresa S.A. Damm (El Prat de Llobregat) i sota la supervisió de la Sra. Remedios Mancebo (Microbiologia) i del Sr. Marçal Vera (Química Analítica), a part de la col·laboració de l'equip del departament quan va ser necessari.

Es van realitzar fermentacions imitant les condicions de fermentació de cervesa en tancs industrials en columnes EBC estàndard (Dixon, 1967) i amb most de 15°P de grau Balling (normativa 4.5.1 i 8.3 de la European Brewing Convention (EBC), 1998).

Es creixia un saturat de les soques desitjades (industrials o de laboratori) en 10 ml de most o YPD amb geneticina 100 µg/ml (segons la soca) que s'utilitzava per inocular 300 ml del mateix medi. El creixement es feia en erlenmeyer i agitació mecànica amb un iman. Es deixaven créixer el cultius 1-2 dies fins que s'arribés gairebé a saturació (80-100 x 10⁶ cèl·lules/ml).

S'inoculaven 3 litres de most de 15^oP (S.A. Damm) amb els 300 ml de cultiu anterior i es deixava fermentar a 12°C durant 10-12 dies. A diferents temps de la fermentació es recollien 80 ml de mostra que ens servien per quantificar diferents paràmetres. Es va determinar:

- el nombre de cèl·lules/ml i la viabilitat cel·lular (cambra de Thoma).
 - l'índex de refracció (Automatic Refractometer, Index Instruments)
 - la densitat 20/24 (Densitymeter DMA58, AP PAAR)
 - els paràmetres de l'alcohol en volum, la densitat 20/20, l'extracte aparent, l'extracte real i l'extracte primitiu es calculaven a partir dels dos paràmetres anteriors segons les normatives EBC 4.5.1, 8.3 i 9.4 (EBC, 1998). L'extracte aparent s'expressa en % segons els g de sucres presents en 100 g de cervesa.
 - el diacetil, l'acetoïna i la 2,3-pentanodiona es van quantificar per cromatografia de gasos amb Head-Space segons els procediments en vigor utilitzats en el departament del Control de Qualitat de l'empresa S.A. Damm (protocol 9.24.2 EBC, 1998).
- Es va realitzar un *t*-test amb el programa informàtic SigmaPlot 8.0 (1986-2001 SPSS Inc.) entre els metabolits obtinguts per les diferents soques per tal de trobar si hi havia una diferència significativa o no entre ells.

RESULTATS

RESULTATS

1. Clonatge del gen *BDH1* de *S. cerevisiae* al vector pYES2.

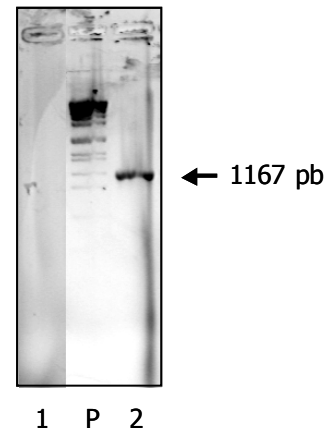
Per amplificar el gen *BDH1* es va obtenir la seqüència del banc de dades del SGD i es van dissenyar els oligonucleòtids YAG0-A i YAG0-B. Amplificant mitjançant PCR en les condicions descrites en els Materials i Mètodes (apartat 12), i utilitzant DNA genòmic de la soca S288C (utilitzada en el projecte de seqüenciació del genoma de *S. cerevisiae*) es va obtenir un fragment de 1167 pb (Figura 14) que contenia tota la seqüència codificant del gen flanquejada per les dianes de restricció *KpnI/EcoRI*.

FIGURA 14: Electroforesi en gel d'agarosa al 1% del producte d'amplificació per PCR del gen *YAL060W* (*BDH1*) amb els oligonucleòtids YAG0-A i YAG0-B.

Carril 1: Control negatiu de l'amplificació: amplificació sense DNA motlle.

Carril P: Patrons de pes molecular de DNA VII (Roche).

Carril 2: Producte d'amplificació del gen *BDH1* a partir de DNA genòmic de la soca S288C.

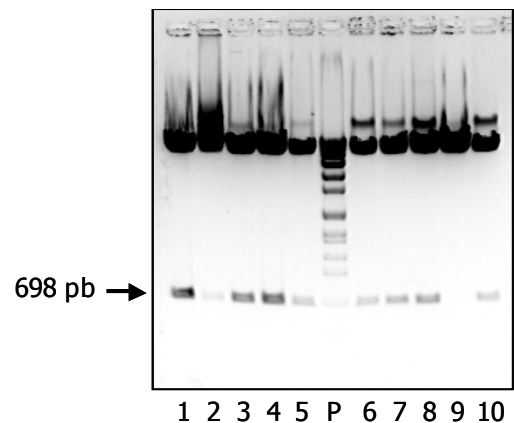


El fragment de PCR es va subclonar en el vector d'expressió en llevat pYES2. Dels 10 clons analitzats mitjançant la digestió amb *XbaI*, 9 presentaven el fragment de 698 pb que apareixia si el gen *BDH1* estava clonat (Figura 15).

FIGURA 15: Electroforesi en gel d'agarosa al 1% de les digestions enzimàtiques amb *XbaI* dels clons pYES2-*BDH1*.

Carril 1-10: Digestions dels clons 1-10.

Carril P: Patrons de pes molecular de DNA VII (Roche).



La construcció es va anomenar pYES2-*BDH1* i es va seqüenciar la zona codificant del gen al servei de seqüenciació de Oswell (Southampton, U.K.). La seqüència clonada es va comparar amb la del banc de dades del SGD i no es va trobar cap nucleòtid diferent a la original (Figura 16).

```

atgagagctttggcatatthcaagaagggtgatattcacttcactaatgatatccctagg 60
1  M R A L A Y F K K G D I H F T N D I P R
ccagaaatccaaaccgacgatgaggttattatcgacgtctcttgggtgtgggatttgtggc 120
21  P E I Q T D D E V I I D V S W C G I C G
tcggatcttcacgagtacttggatggtccaatcttcacgcctaaagatggagagtgcct 180
41  S D L H E Y L D G P I F M P K D G E C H
aaattatccaacgctgtttacctctggcaatggccatgagatgtcaggaattgtttcc 240
61  K L S N A A L P L A M G H E M S G I V S
aagggttggtcctaaagtgacaaagggtgaagggttggcgaccacgtggctcgttgatgctgcc 300
81  K V G P K V T K V K V G D H V V V D A A
agcagttgtgctggacctgcattgctggccacactccaaatthtacaattccaaaccatgt 360
101 S S C A D L H C W P H S K F Y N S K P C
gatgcttgtcagaggggcagtgaaaatctatgtaccacgcccgtttttagtagtaggt 420
121 D A C Q R G S E N L C T H A G F V G L G
gtgatcagtggtggctttgtgaacaagtcgtagtctctcaacatcacattatcccggtt 480
141 V I S G G F A E Q V V V S Q H H I I P V
ccaaaggaaattcctctagatgtggctgcttttagttgagcctctttctgtcacctggcat 540
161 P K E I P L D V A A L V E P L S V T W H
gctgttaagatttctggtttcaaaaaaggcagttcagccttggttcttgggtgcaggtccc 600
181 A V K I S G F K K G S S A L V L G A G P
attgggttgtgtaccattttggtacttaagggatgggggctagtaaaattgtagtgtct 660
201 I G L C T I L V L K G M G A S K I V V S
gaaattgcagagagaagaatagaaaatggccaagaactgggcgttgaggtgttcaatccc 720
221 E I A E R R I E M A K K L G V E V F N P
tccaagcacgggtcataaatctatagagatactacgtggtttgaccaagagccatgatggg 780
241 S K H G H K S I E I L R G L T K S H D G
tttgattacagttatgattgttctggtattcaagttactttcgaaacctctttgaaggca 840
261 F D Y S Y D C S G I Q V T F E T S L K A
ttaacattcaaggggacagccaccaacattgcagtttgggtccaaaacctgtcccattc 900
281 L T F K G T A T N I A V W G P K P V P F
caaccaatggatgtgactctccaagagaaagttatgactgggttcgatcggctatgttgtc 960
301 Q P M D V T L Q E K V M T G S I G Y V V
gaagccttcgaagaagttgttcgtgccatccacaacggagacatcgccatggaagattgt 1020
321 E A F E E V V R A I H N G D I A M E D C
aagcaactaatcactggtaagcaaaggattgaggacggttgggaaaagggttccaagag 1080
341 K Q L I T G K Q R I E D G W E K G F Q E
ttgatggatcacaaggaatccaacgtaagattctattgacgcctaacaatcacgggtgaa 1140
361 L M D H K E S N V K I L L T P N N H G E
atgaagtaa 1149
382 M K *

```

FIGURA 16: Seqüència de la Bdh1p de *Saccharomyces cerevisiae*. Hi ha presentades les seqüències de DNA (numeració de la dreta) i de la proteïna (numeració de l'esquerra).

2. Anàlisi de la seqüència de la Bdh1p. La Bdh1p és una MDR.

Es va analitzar la seqüència de la Bdh1p clonada mitjançant un alineament amb altres membres de la superfamília de les MDR per tal de comprovar si hi pertanyia. Es va incloure en l'alineament la SDH de rata i de *S. cerevisiae*, la Xyl2p i Yal061p també de llevat, la cetosa reductasa de *B. argentifolii*, la BDH de *P. putida*, l'Adh1p de llevat i l'ADH E de cavall.

La Bdh1p (producte gènic de *YAL060W*) presenta els residus característics de la superfamília de les MDR (Figura 17). En l'alineament es pot comprovar que presenta una longitud de la cadena polipeptídica de 382 aminoàcids, similar a la resta d'enzims MDR. També presenta diferents residus conservats al llarg de la superfamília com les glicines 66, 71, 77 i 86 i la valina 80 del domini catalític (segons la numeració de l'ADH-E de fetge de cavall), i les glicines 192, 201, 204 i 236 del domini d'unió a coenzim (Sun i Plapp, 1992). Altres glicines es troben conservades en els membres presentats en l'alineament (44, 55, 126, 121, 199, 225, 287), indicant que es troben en posicions crucials pel manteniment de l'estructura tridimensional dels enzims i de la funcionalitat de la proteïna. També es troben conservats residus apolars com la valina, leucina o isoleucina.

A la seqüència de la Bdh1p es poden identificar els tres residus d'unió del zinc catalític: cisteïna 46, histidina 67 i glutàmic a la posició 174, com la SDH de rata, enlloc de la cisteïna que presenta l'ADHE de cavall. A diferència d'altres PDHs, la Bdh1p presenta 4 cisteïnes que podrien unir un segon àtom de zinc. Excepcionalment, tant la Bdh1p com la Yal061p presenten 14 residus entre la primera i segona cisteïna, segment que no presenten cap dels altres membres MDR presentats en aquest alineament.

Cal recalcar que a la posició 221 la Bdh1p presenta un glutàmic, que s'alinea amb l'aspàrtic 223 de l'ADHE de cavall. S'ha descrit que l'Asp223 dóna especificitat a l'enzim envers el NAD(H) (Eklund i Brändén, 1987).

Així, la Bdh1p presenta en la seva seqüència els principals residus característics dels enzims MDR i, per tant, es pot considerar com un membre de la superfamília enzimàtica de les MDR.

*

```

ScBdh1p      1 : -----MRALAYFKKGDTHFTNDIPRPEIQTDDEVIIDVSWCGICGSD : 42
ScYal061p    1 : -----MRALAYFGKGNIRFTNHLKEPHIVAPDELVIDIEWCGICGTD : 42
PpBDH        1 : -----MNDLSHTHMRAAVVHGRNDIR-VEQVPLPADPAPGWVQIKVDWCGICGSD : 49
ScXdh2p      1 : --MTDLTT-----QEATVLERPGKITLT-NVSIPIKISDPNEVIIQIKATGICGSD : 47
ScSor1p      1 : ---MSQNS-----NPAVVLEKVGDI AIE-QRPIPTIKDPHYVKLAIKATGICGSD : 46
RnSDH        1 : -----MAAPAKGENLSLVVHGPDIRLE-NYPIPELG-PNDVLLKMHSVGICGSD : 48
BaKR         1 : -----MAS-----DNLSAVLYKQNDIRLE-QRPIPEPK-EDEVLLQMayVGICGSD : 44
ScAdh1p      1 : -----MSIPETQKGVTFYESHGKLEYK-DIPVPKP-KANELLINVKYSGVCHTD : 47
EcADHE       1 : ----STAGKVIKCKAAVLWEEKKPFSEIEVEVAP--PKAHEVRIKVMATGICRS : 49
    
```

*

```

ScBdh1p      43 : LHEYLDGPIFMPKDGECCHKLSNAALPLAMGHEMSGIVSKVGPVKVTKVKVGDHVVV : 97
ScYal061p    43 : LHEYTDGPIFFPEDGHTHEISHNPLPQAMGHEMAGTVLEVGPVKNLKVGDKVVV : 97
PpBDH        50 : LHEYVAGPVFIPVEAP-HPLTGIQGQCILGHEFCGQIAKLGEVGEFVAVGDPVAA : 103
ScXdh2p      48 : IHYYTHGRIAN-----YVVESPMVLGHESSGIVALIGENVKTLKVGDRVAL : 93
ScSor1p      47 : IHYRSCGIGK-----YILKAPMVLGHESSGQVVEVGDAVTRVKVGDRAI : 92
RnSDH        49 : VHYWEHCRIGD-----FVVKKPMVLGHEAAGTVTKVGPVKHLKPGDRVAI : 94
BaKR         45 : VHYWEHCRID-----FIVKDPMVLGHEASGTVVKVGNVKKHLKKGDRVAV : 90
ScAdh1p      48 : LFAWHGDWPLP-----VKLPLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGI : 91
EcADHE       50 : DHVVS-----TLVTPLPVIAGHEAAGIVESIGEGVTTVRPGDKVIP : 91
    
```

```

ScBdh1p      98 : DAASSCADLHCWPHSKFYNSKPCDACQR--GSENLCTHAGFVGLGVISGG----- : 145
ScYal061p    98 : EPTGTCRDRYRWPLSPNVDKEWCAACKK--GYNICSYLGLCGAGVQSGG----- : 145
PpBDH        104 : DACQHCG-----TCYCYTH--GLYNICERIAFTGLMN-NGA----- : 136
ScXdh2p      94 : EPGIPDR-----FSPEMKE--GRYNLDPNLKFAATPPFDGT----- : 127
ScSor1p      93 : EPGVPSR-----YSDETKE--GRYNLCPHMAFAATPPIDGT----- : 126
RnSDH        95 : EPGVPRE-----IDEFCIKI--GRYNLTPSIFFCATPPDDGN----- : 128
BaKR         91 : EPGVPCR-----RCQFCKE--GKYNLCPDLTFCATPPDDGN----- : 124
ScAdh1p      92 : KWLNGSC-----MACEYCEL--GNESNCPHADLSGYTH-DGS----- : 125
EcADHE       92 : LFTPQCG-----KCRVCKHPEGNFCIKNDLSMPRGTMDGTSRFTC : 132
    
```

*

```

ScBdh1p      146 : -----FAEQVVVSQHIIIPVPKEIPLDVAALV-EPLSVTW-HAVKIS : 185
ScYal061p    146 : -----FAERVVMNESHQYKVPDFVPLDVAALI-QPLAVCW-HAIRVC : 185
PpBDH        137 : -----FAELVNVPANLLYRLPQGFPEAGALI-EPLAVGM-HAVKKA : 176
ScXdh2p      128 : -----LTKYYKTMKDFVYKLPDDVSFEEGALI-EPLSVAI-HANKLA : 167
ScSor1p      127 : -----LVKYYLSPEDFLVKLPEGVSYEAGACV-EPLSVGV-HSNKLA : 166
RnSDH        129 : -----LCRFYKHSADFCYKLPDSVTFEEGALI-EPLSVGI-YACRRG : 168
BaKR         125 : -----LARYYVHAADFCHKLPDVSLEEGALI-EPLSVGV-HACRRA : 164
ScAdh1p      126 : -----FQYATADAVQAAHIPPQGTDLAQVAPILC-AGITVYKALKSA : 166
EcADHE       133 : RGKPIHHFLGTSTFSQYTVVDEISVAKIDAASPLEKVCLIGCGFSTGYGSVAVKA : 187
    
```

^

```

ScBdh1p      186 : GFKKGSALVLCAG-PIGLCTILVLKGMGASKIVVSEIAERRIEMAKKLGVEVFN : 239
ScYal061p    186 : EFKAGSTALIICAG-PIGLGTILALNAAGCKDIVVSEPAKVRRELAEKMGARVYD : 239
PpBDH        177 : GSLLGQTVVVGAG-TIGLCTIMCAKAAGAAQVIALEMSSARKAKAKEVGATVVL : 230
ScXdh2p      168 : KIKFGARC VVFGAG-PIGLLAGKVASVFGAADVVFVDLLENKLETARQFGATHIV : 221
ScSor1p      167 : GVRFGTKVVVFGAG-PVGLLTGAVARAFGATDVIFVDVFDNKLQRAKDFGATNTF : 220
RnSDH        169 : SVSLGNKVLVCGAG-PIGIVTLLVAKAMGASQVVVIDLSASRLAKAKEVGADFTI : 222
BaKR         165 : GVQLGTTVLVIGAG-PIGLVSVLAAKAYGA-FVVCTARSPRRLEVAKNCGADVTL : 217
ScAdh1p      167 : NLMACHWVAISGAAGGLGSLAVQYAKAMGY-RVLGIDGGEGKEELFRSIGGEVFI : 220
EcADHE       188 : KVTQGSTCAVFLG-GVGLSVIMGCKAAGAARIIGVDINKDKFAKAKEVGATECV : 241
    
```

```

ScBdh1p      240 : PSKHG-HKSIEIIRGLTKSHDG---FDYSYDCSGIQVTFETSIKALTFK-GIATN : 289
ScYal061p    240 : PTAHAAKESIDYLRSIADGGDG---FDYTFDCSGLEVTLNAATQCLTFR-GIAYN : 290
PpBDH        231 : DPSQ--CDALAQIRALTFFG-LG---ADVSEFCIENKHTAKLAIDTIRKA-GKCVL : 278
ScXdh2p      222 : NSGDLP--HGVTVDSVIKKAIGKKGADVVFECSCAEPCVRAGIEVCKAG-GTIVQ : 273
ScSor1p      221 : NSSQFSTDKAQDLADGVQKLLGGNHADVVFECSGADVCI DAAVKTTKVG-GTMVQ : 274
RnSDH        223 : QV---AKETPHDI AKKVESVLGSK-PEVTIECTGAESSVQDGIYATHSG-GTIVV : 272
BaKR         218 : VVD-PAKEEESIIERIRSAIGDL-PNVTIDCSGNEKCTTIGINIRTRG-GTLM L : 269
ScAdh1p      221 : DFTKEKDIVGAVLKATDGGAHG-----VINVSVSEAAIEASTRYVRAN-GTIVL : 268
EcADHE       242 : NPQDYKKPIQEVLT EMSNGG-----VDFSFEVIGRLDTMVTATSCCQEAYVSVI : 291

```

```

ScBdh1p      290 : IAVWGPKPVPFPQMDVTLQEKVMTCSIGYVVEAEFEEVVRATHNGDIAMEDCKQLI : 344
ScYal061p    291 : LAMWGHHKIQFSPMDITLHERKYTGSMCYTHHDEAVTEAPEEGRIDIDRARHMI : 345
PpBDH        279 : VGIFE-EPSEFNFFELVSTEQVLCALAYN-GEFADVIAFTADGRIDIR---PLV : 328
ScXdh2p      274 : VGMG-QEEIQFPISIIPTKELTFQCCFRYCOGDYSDSTELVSSRKLISK---PFI : 324
ScSor1p      275 : VGMG-KNYTNFPIAEVSGKEMKLI GCFRYSFGDYRDAVNLVATGKVNK---PLI : 325
RnSDH        273 : VGMG-PEMINLPLVHAAREVDIKGVFRYCN-TWPMAVSMASKTINVK---PLV : 322
BaKR         270 : VGMG-SQMVTVPLVNACAREIDIKSVFRYCN-DYPIATEMVASGRCNVK---QLV : 319
ScAdh1p      269 : VGMPPAGAKCCSDVFNQVVKSIIVG SYVGNRADTREALDFFARGLVKSP---IKV : 320
EcADHE       292 : VGVPPDSQNL SMNPM LLLSGRTWKC AIFGGFKSKDSVPKLVADFM AKKFDLPLI : 346

```

```

ScBdh1p      345 : T GKQRIEDGWEKGFQELMDHKESNVKII LTPNNHGEMK----- : 382
ScYal061p    346 : TGRVNIEDGLDGAIMKLINEKESTIKI I LTPNNHGELNREADNEKKEISELSSRK : 400
PpBDH        329 : TGRIGLEQIVELGFEELVNNKEENVKII VSPGVR----- : 362
ScXdh2p      325 : THRYSFKDAVEAFEETSHHPLNNIKTI IEGPE----- : 356
ScSor1p      326 : THKFKFEDA AKAYDYNIAHGGEVVKTI IFGPE----- : 357
RnSDH        323 : THRFPLEKAVEAFETAKKGLG--LKVMIKCDPNDQNP----- : 357
BaKR         320 : THSFKLEQTVD AFEAARKKADNTIKVMI SCRQG----- : 352
ScAdh1p      321 : VGLSTLPEIYEKMEKGQIVGRYVVDTSK----- : 348
EcADHE       347 : THVLPFEKINEG--FDLLRSGESIRTIITF----- : 374

```

```

ScBdh1p      - : ----- : -
ScYal061p    401 : DQERLRESINEAKLRHT--- : 417
PpBDH        - : ----- : -
ScXdh2p      - : ----- : -
ScSor1p      - : ----- : -
RnSDH        - : ----- : -
BaKR         - : ----- : -
ScAdh1p      - : ----- : -
EcADHE       - : ----- : -

```

FIGURA 17: Alineament de la Bdh1p de *Saccharomyces cerevisiae* amb diferents membres de la superfamília de les MDR. L'alineament es va realitzar amb el programa ClustalW i es van identificar els diferents grups de residus amb el programa d'edició d'alineaments d'accés lliure per xarxa GeneDoc 2.6.002 (www.psc.edu/biomed/genedoc). Els residus marcats en blau corresponen a aquells amb propietats físico-químiques similars i que es troben en totes les seqüències, els verds estan presents com a mínim en 7 de les 9 seqüències i els grisos en un mínim de 5 seqüències. Es troben marcats amb (*) els lligands del zinc catalític, amb (:) els residus d'unió del zinc estructural i amb (^) el residu que dona especificitat pel NAD(H). ScBdh1p, butanodiol deshidrogenasa de *S. cerevisiae*; ScYal061p, Yal061p de *S. cerevisiae*; PpBDH, butanodiol deshidrogenasa de *Pseudomonas putida*; ScXDH; xilitol deshidrogenasa de *S. cerevisiae*; ScSor1p, sorbitol deshidrogenasa de *S. cerevisiae*; RnSDH, sorbitol deshidrogenasa de *Rattus norvegicus*; BaKR, cetosa reductasa de *Bemisia argentifolii*; ScAdh1p, alcohol deshidrogenasa I de *S. cerevisiae*; EcADHE, alcohol deshidrogenasa E de cavall (*Equus caballus*).

3. Expressió del gen *BDH1* i detecció de l'activitat de la proteïna codificada.

Una vegada es va clonar el gen *YAL060W* al vector d'expressió es va voler determinar quina funció tenia la proteïna codificada en el gen. Es va fer una búsqueda als bancs de dades amb el programa BLAST (Altschul i cols. 1997) per trobar les seqüències proteïques més similars al producte gènic de *YAL060W* i que ens poguessin indicar sobre possibles substrats de la proteïna. La seqüència més similar va ser el producte gènic de *YAL061W* (51,3% d'identitat) de *S. cerevisiae*, seguit de la 2,3-butanodiol deshidrogenasa de *Pseudomonas putida* (33,9%), de la D-xilulosa reductada de *Picchia stipitis* (29,8%), de la treonina deshidrogenasa d'*Escherichia coli* (26,9%), de la sorbitol deshidrogenasa de *S. cerevisiae* (26,8%) i de l'alcohol deshidrogenasa d'*Alcaligenes eutrophus* (25,4%).

El constructe pYES2-*BDH1* i el vector buit pYES2 es van utilitzar per transformar la soca delecionada per la majoria d'alcohol deshidrogenases WV36-405. Es van créixer els clons WV36-405[pYES2] i WV36-405[pYES2-*BDH1*] en medi mínim SMM sense uracil i amb galactosa al 2% com a font de carboni, i també inductora de l'expressió, fins a la seva saturació. Se'n van obtenir homogenats proteics per disruptió de les cèl·lules amb boles de vidre de 0,5 mm de diàmetre. Es va assajar l'activitat amb etanol, sorbitol, xilitol i 2,3-butanodiol (mescla d'isòmers), i només amb el 2,3-butanodiol es van trobar valors d'activitat específica més elevats en la soca que sobreexpressava l'enzim que en la que portava el vector buit (10,9 U/mg vs. 0,08 U/mg amb l'isòmer (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol).

Finalment, es va determinar l'activitat amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol (activitat Bdh1p) en dues fases del creixement de la soca WV36-405[pYES2-*BDH1*] en medi SMM sense uracil i amb galactosa al 2% (Taula 5). L'activitat Bdh1p augmenta a la fase de saturació.

Taula 5

Activitat específica de la Bdh1p en homogenats de la soca WV36-405[pYES2-*BDH1*]

	O.D. ₆₀₀	WV36-405[pYES2- <i>BDH1</i>] (U/mg)
Fase exponencial	1,68	5,51
Fase de saturació	5,34	27,22

Valors determinats amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol 120 mM, NAD⁺ 5 mM en pirofosfat de sodi 33 mM, pH 8,0.

4. Purificació de la Bdh1p.**4.1 Estudis d'estabilitat de la Bdh1p en homogenats.**

Els anàlisis d'estabilitat de la Bdh1p en homogenats van mostrar que en tampó fosfat potàssic 20 mM, pH 6,8 la proteïna perdia un 25% d'activitat a les 24 hores, a 4°C. Per tal de determinar les millors condicions per mantenir l'activitat de l'enzim es va fer un anàlisi de l'estabilitat de la Bdh1p en extracte cru de la soca WV36-405[pYES2-*BDH1*], incubat a diferents condicions. Es va poder concloure el següent:

- La presència de 0,5 o 2,5 mM de DTT en el tampó no reduïa la pèrdua d'activitat.
- A pH 6,0 i 7,0 la pèrdua d'activitat era del 25% a les 24 hores, mentre que a pH 8,0 la pèrdua augmentava fins un 40%.
- En presència de 10% i 30% de glicerol es conservava un 94% i un 100% de l'activitat, respectivament, després de 24 hores d'incubació a 4°C.

Es va decidir realitzar la purificació en presència de 30% de glicerol en tots els tampons que es fessin servir.

4.2 Expressió en de la Bdh1p en la soca de *S. cerevisiae* BJ5459.

L'últim pas abans de la purificació va ser transformar la soca de llevat BJ5459, deficient en proteases, amb el vector pYES2 i el constructe pYES2-*BDH1*, per minimitzar d'aquesta manera la possible degradació de la proteïna a l'hora de la purificació. En aquest cas es va determinar l'activitat estàndard en fase exponencial i en fase de

saturació del cultiu obtenint-se, com en el cas de l'expressió en la soca WV36-405, una major activitat específica en la fase de saturació del cultiu (Taula 6).

Taula 6

Activitat específica (U/mg proteïna) de la Bdh1p en homogenats de la soca BJ5459

	BJ5459[pYES2]	BJ5459[pYES2- <i>BDH1</i>]
Fase exponencial	0,01	4,4
Fase de saturació	0,076	18,6

Valors determinats amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol 120 mM, NAD⁺ 5 mM en pirofosfat de sodi 33 mM, pH 8,0.

4.3 Purificació de la Bdh1p.

La soca BJ5459 que contenia el gen *BDH1* en el vector multicòpia pYES2 es va créixer fins a saturació en medi SMM sense uracil i amb galactosa. Després de sedimentar les cèl·lules per centrifugació es van obtenir 34 g de material.

4.3.1 Cromatografia d'hidroxilapatit.

L'activitat Bdh1p va quedar totalment retinguda en la resina i es va eluir mitjançant un gradient de fosfat potàssic (20 a 600 mM) (Figura 18A). Aquesta és una etapa important perquè la major part d'alcohol deshidrogenasa de llevat s'elimina durant el rentat de la cromatografia.

Les fraccions actives es van concentrar i aplicar a una columna de Cibacron Blue 3GA Agarosa.

4.3.2 Cromatografia d'afinitat Cibacron Blue 3GA Agarosa.

En aquesta etapa l'enzim queda retingut a la resina i després d'aplicar un gradient de NADH (0-250 μ m) i un nou rentat amb tampó d'homogeneïtzació, es va eluir la Bdh1p amb un gradient de sal (NaCl 0 a 2 M) (Figura 18B). En aquest pas la preparació de proteïna resultant era ja homogènia.

Les fraccions actives es van concentrar i es van aplicar a una cromatografia en gel filtració.

4.3.3 Cromatografia en gel filtració.

La cromatografia en gel filtració per HPLC es va utilitzar per eliminar la major part del NADH que havia quedat retingut durant el primer gradient aplicat en l'etapa de purificació anterior i per treure l'excés de sal.

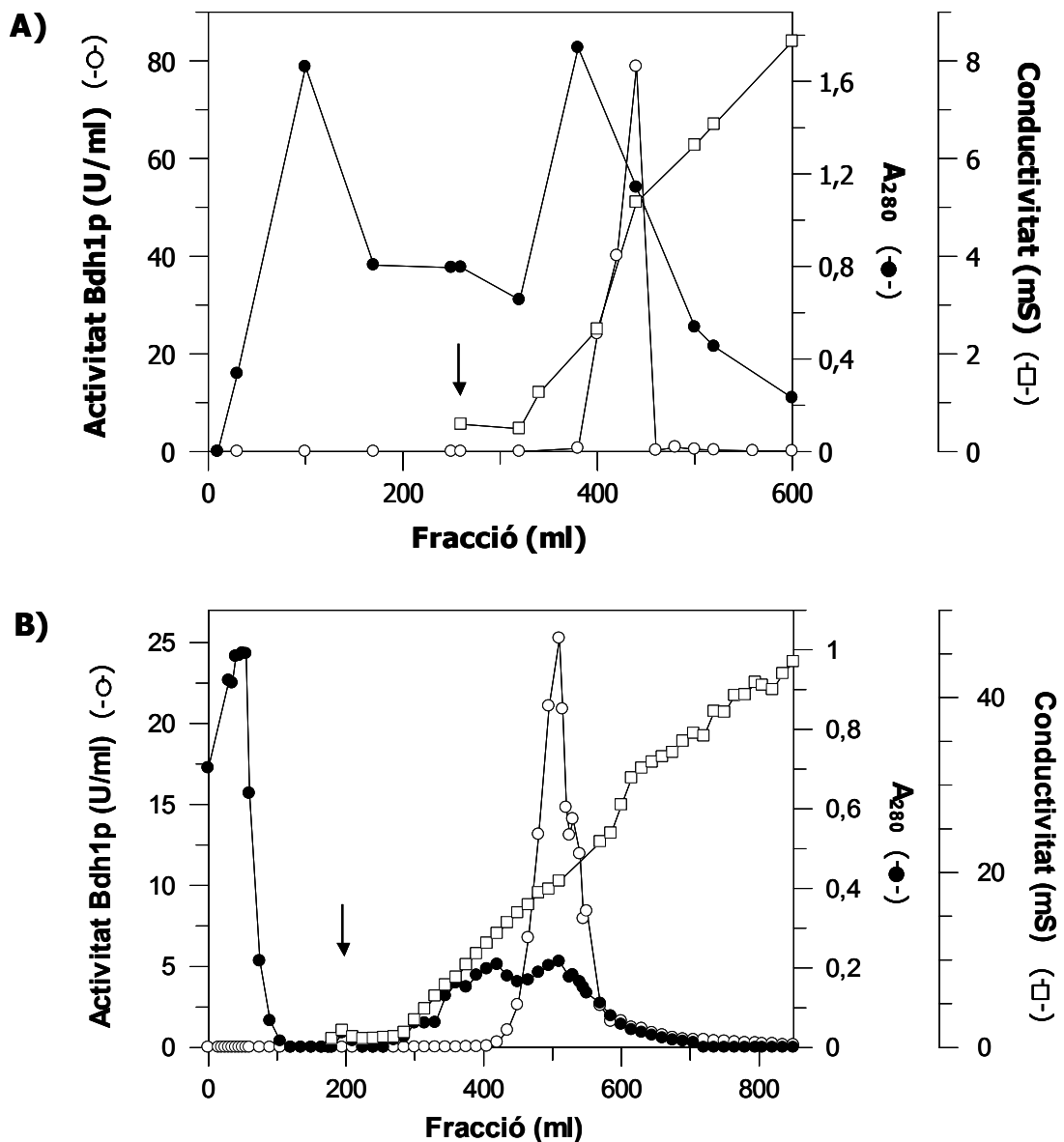


FIGURA 18: Purificació de la Bdh1p de *Saccharomyces cerevisiae*.

A) Cromatografia en hidroxilapatit BioGel-HT. La fletxa indica l'inici del gradient de fosfat de potassi.

B) Cromatografia d'afinitat en Cibacron Blue 3GA-Agarosa. La fletxa indica l'inici del gradient de NaCl.

4.4 Anàlisi del grau de puresa de l'enzim.

Es va analitzar la puresa de l'enzim mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS tenyit amb sals de plata. Només es va detectar una banda de pes molecular d'aproximadament 41.000 Da (Figura 19).

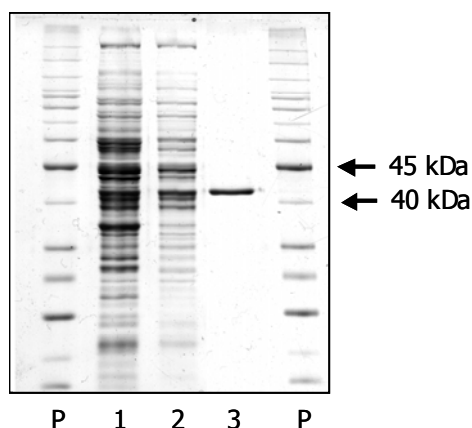


FIGURA 19: Determinació del grau de puresa i del pes molecular de la subunitat de la Bdh1p de *S. cerevisiae* després de diferents etapes de purificació, mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS.
Carrils P: Patrons de pes molecular (GIBCO™).
Carril 1: Homogenat inicial (10 µg).
Carril 2: Cromatografia d'hidroxilapatit (5 µg).
Carril 3: Cromatografia d'afinitat Cibacron Blue 3GA-Agarosa (1 µg).

També es va determinar la concentració de proteïnes pel mètode de Bradford (Bradford, 1976) i es va medir l'activitat Bdh1p al final de cada etapa de purificació. Els resultats es troben agrupats a la Taula 7.

Taula 7

Purificació de la Bdh1p de *Saccharomyces cerevisiae*.

	Proteïna (mg)	Activitat total (U)	Activitat específica (U/mg)	Factor de purificació	Rendiment (%)
Homogenat	218	5427	25	1	100
Hidroxilapatit	15	3799	253	10	70
Cibacron Blue 3GA-Agarosa	0,76	493,3	647	26	9
Gel filtració	0,15	148	968	39	2,7

Valors determinats amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol 120 mM, NAD⁺ 5 mM en pirofosfat de sodi 33 mM, pH 8,0.

5. Caracterització físico-química de l'enzim Bdh1p de *S. cerevisiae*.

Tal com s'ha indicat (apartat 3.4, Figura 19) es va estimar un pes molecular de la subunitat de la Bdh1p de 41.000 Da.

5.1 Determinació del punt isoelèctric de la Bdh1p.

El punt isoelèctric de l'enzim Bdh1p es va determinar per electrofocalització analítica en un gel d'interval de pH 3,0-9,0 del sistema *FastSystem*TM. Es va utilitzar un extracte cru de *S. cerevisiae* on es sobreexpressava la Bdh1p, i marcadors de punt isoelèctric coneguts. El gel tenyit per activitat amb 2,3-butanodiol dóna una banda principal de pI 6,95, amb presència de bandes minoritàries de pI inferiors (Figura 20). Aquest resultat és una mica superior al pI teòric del banc de dades que és de 6,64.

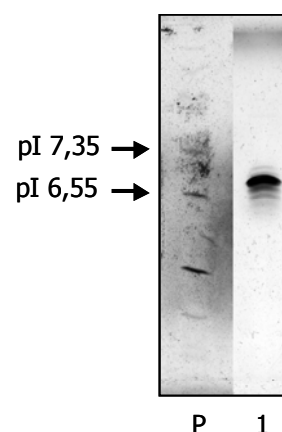


FIGURA 20: Determinació del punt isoelèctric de la Bdh1p de *S. cerevisiae* mitjançant electrofocalització analítica i tinció per activitat BDH.
Carril P: Patrons de punt isoelèctric.
Carril 1: Homogenat de la soca WV36-405[pYES2-*BDH1*] que sobreexpressa la Bdh1p.

5.2 Determinació del pes molecular natiu de la Bdh1p.

Per conèixer el pes molecular de la forma nativa de l'enzim Bdh1p es realitzaren dos tipus d'experiments. El primer fou una electroforesi en condicions no desnaturalitzants amb gradient de poliacrilamida (8-25%) amb proteïnes de pes molecular conegut i una preparació parcialment pura de la Bdh1p. Per comparació amb l'enzim formaldehid deshidrogenasa depenent de glutatió de *S. cerevisiae* de 80 kDa (Fernández, 1998) amb pI 6,7, podem estimar un pes molecular d'aproximadament 80 kDa per la Bdh1p (Figura 21).

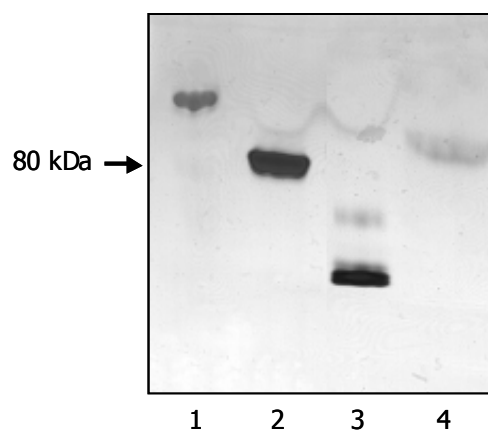


FIGURA 21: Determinació del pes molecular natiu de la Bdh1p de *S. cerevisiae* mitjançant una electroforesi en condicions no desnaturalitzants amb gradient de poliacrilamida de 8-25%.
Carril 1: Catalasa (220 kDa).
Carril 2: FALDH (80 kDa).
Carril 3: Ovoalbúmina (43 kDa).
Carril 4: Bdh1p.

Per una altra banda es van injectar diferents proteïnes amb pes molecular conegut en la columna de gel filtració Superdex 200 HR 10/30 (utilitzada en la purificació de la Bdh1p). Amb els diferents temps de retenció es va representar una regressió lineal entre el logaritme del pes molecular i el volum d'elució de manera que es va determinar el pes molecular de la Bdh1p en 81.800 Da (Figura 22).

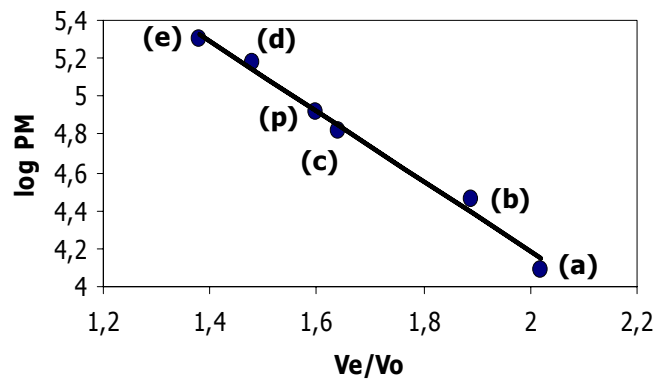


FIGURA 22: Estimació del pes molecular de la forma nativa de la Bdh1p per cromatografia en d'exclusió molecular. a) citocrom c (12,4 kDa), b) anhidrasa carbònica (29 kDa), c) albúmina de sèrum boví (66 kDa), d) alcohol deshidrogenasa de llevat (150 kDa), e) β-amilasa (200 kDa) i p) Bdh1p.

Tenint en compte els resultats obtinguts fins aquest moment podem dir que la Bdh1p és un homodímer d'aproximadament 82.000 Da compost de dues subunitats de 41.000 Da, i amb un pI de 6,95.

6. Caracterització cinètica de la Bdh1p de *Saccharomyces cerevisiae*.

6.1 Constants cinètiques i especificitat de substrat de l'enzim Bdh1p.

Amb l'enzim purificat es van determinar les constants cinètiques per diferents substrats (taula 8) i també l'activitat relativa per diferents compostos (taula 9). D'aquest anàlisi podem destacar que:

- El millor substrat per l'enzim és l'acetoïna (3-hidroxi-2-butanona), doncs presenta una eficiència catalítica més alta ($21.700 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Taula 8
Constants cinètiques de la 2,3-butanodiol deshidrogenasa

Substrat	Km (mM)	kcat (min ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ min ⁻¹)
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-butanodiol	14 ± 5	78.000 ± 1.300	5.600 ± 2000
<i>meso</i> -butanodiol	65 ± 9	46.000 ± 2.000	700 ± 100
1,2-butanodiol	57 ± 7	36.400 ± 800	640 ± 80
NAD ⁺	0,55 ± 0,03		
Acetoïna	4,5 ± 0,5	98.000 ± 4.000	21.700 ± 2.600
Diacetil	N.S.		
2,3-pentanodiona	N.S.		
NADH	0,055 ± 0,005		

Les constants s'expressen com la mitja ± desviació estàndard de 3 determinacions diferents. Les activitats amb alcohols es determinaren en tampó pirofosfat de sodi 33 mM, pH 8,0, i NAD⁺ 5 mM. Les activitats amb les cetones es varen determinar en tampó fosfat de sodi 33 mM, pH 7,0, i NADH 0,2 mM. N.S. No es va assolir la saturació de l'enzim amb diacetil 100 mM ni amb 2,3-pentanodiona 20 mM.

Taula 9
Especificitat de substrat de la butanodiol deshidrogenasa

Substrat	Activitat (%)	Substrat	Activitat (%)
Oxidació		Reducció	
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-butanodiol	100	Acetoïna	100
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2,3-butanodiol	N.D.	Gliceraldehid	0,43
<i>meso</i> -butanodiol	42,8	Glioxal	N.D.
1,2-butanodiol	31,7	Metilglioxal	23,5
1,3-butanodiol	N.D.	1-hidroxi-2-propanona	20,2
1,4-butanodiol	N.D.	1,3-dihidroxiacetona	9,4
1,2-pentanodiol	2,7	Diacetil	51,4
1,2-propanodiol	16,9	2,3-pentanodiona	8,7
(2 <i>R</i>)-butanol	N.D.		
Etanol	N.D.		
Glicerol	N.D.		
Acetoïna	N.D.		
Sorbitol	N.D.		
Xilitol	N.D.		

Les activitats d'oxidació es van determinar a 100 mM de cada substrat i NAD⁺ 5 mM en tampó pirofosfat de sodi 33 mM pH 8,0. L'activitat amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol es va prendre com a 100%. Les activitats de reducció es van determinar a 50 mM de cada substrat i NADH 0,2 mM en tampó fosfat de sodi 33 mM pH 7,0. L'activitat amb acetoïna es va considerar el 100%. N.D. representa una activitat inferior al 0,2% de l'activitat de referència.

- En el cas del 2,3-butanodiol, l'enzim és més eficient per la forma (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol (kcat/Km de 5.600 mM⁻¹.min⁻¹) que per la forma *meso*-2,3-butanodiol (kcat/Km de 700 mM⁻¹ min⁻¹). No és actiu amb la forma (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol.

- La Bdh1p catalitza les reaccions d'oxidació de substrats amb grups diol en posició 1,2 o 2,3, mostrant més activitat envers els alcohols secundaris (per ex. 2,3-butanodiol) que els primaris (1,2-butanodiol). Per les reaccions d'oxidació la Bdh1p prefereix compostos de 4 carbonis. Així, només s'obté un 16,9% de l'activitat de referència amb el 1,2-propanodiol i el valor és menor si el compost té 5 carbonis (2,7% d'activitat amb 1,2-pentanodiol).

- Són substrats per la reducció aquells que contenen grups dicetones o hidroxicetones contigus. També en el cas de la reducció la Bdh1p té més activitat envers els compostos de 4 carbonis (acetoïna 100% i diacetil 51,4% d'activitat) que els de 3 o 5 carbonis, amb activitats per sota del 24% de l'activitat de referència.

- En condicions d'activitat estàndard la Bdh1p va demostrar ser extremadament específica pel cofactor NAD(H). Tant per a l'oxidació com per la reducció, l'activitat amb NADP(H) va resultar ser menys del 0,7% de la mateixa activitat mesurada amb NAD(H) a la concentració estàndard.

- L'enzim és dependent de NAD⁺ i el seu millor substrat d'oxidació és el (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol. És apropiat anomenar-lo butanodiol deshidrogenasa (Bdh1p).

6.2 Estereoespecificitat de la Bdh1p.

Es va estudiar la interconversió entre els diferents isòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoïna (3-hidroxi-2-butanona), analitzant-ne la seva formació mitjançant cromatografia de gasos acoblada a un espectòmetre de masses (CG-EM). A la figura 23 es presenta el cromatograma dels estàndards utilitzats en les reaccions (23B) amb els temps de retenció (en minuts) i l'estructura de cadascun d'ells (23A).

A la figura 24 es presenten els cromatogrames corresponents a diferents reaccions enzimàtiques i els respectius controls sense enzim. La oxidació del (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol en presència de NAD⁺ i Bdh1p forma l'estereoisòmer *R* de l'acetoïna (Figura 24A), mentre que la oxidació del *meso*-2,3-butanodiol forma la *S*-acetoïna (Figura 24C). En el cromatograma corresponent a la reducció de la (*R/S*)-acetoïna en presència de NADH i Bdh1p s'observa la producció dels isòmers (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol i *meso*-2,3-butanodiol (Figura 24E).

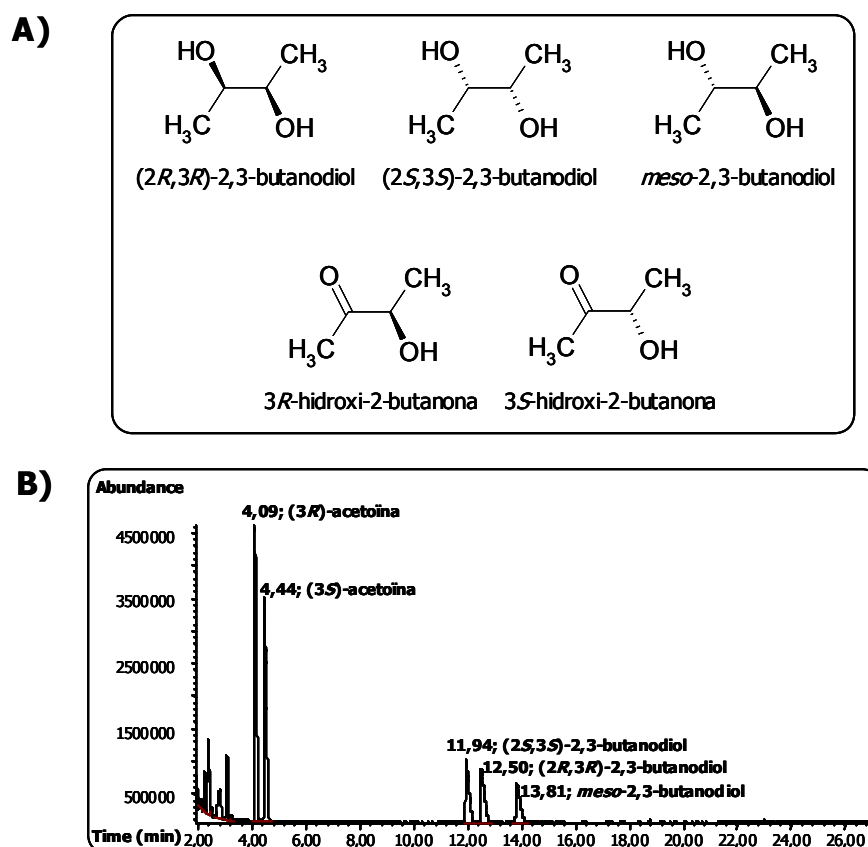


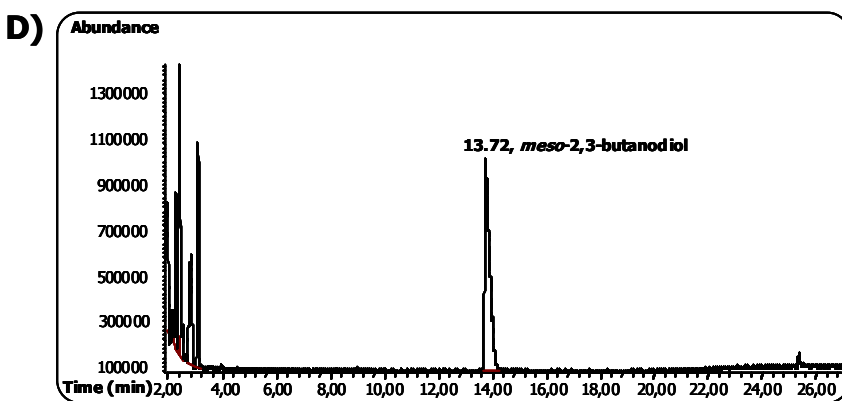
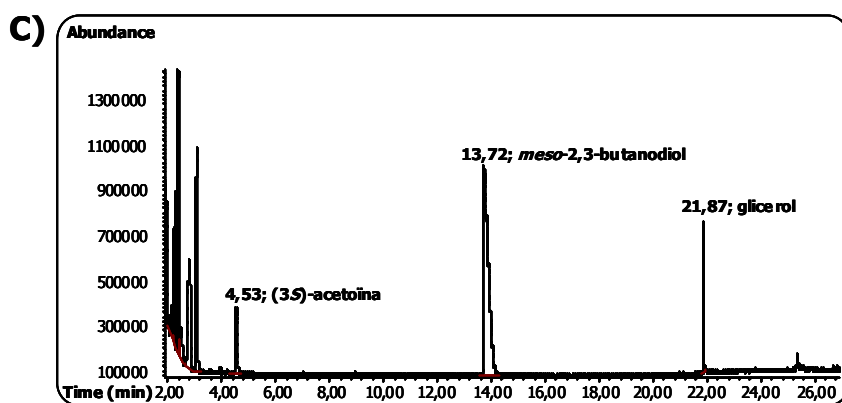
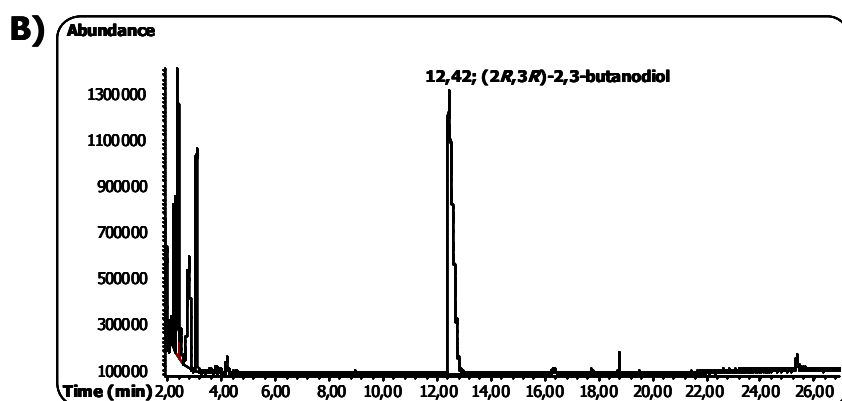
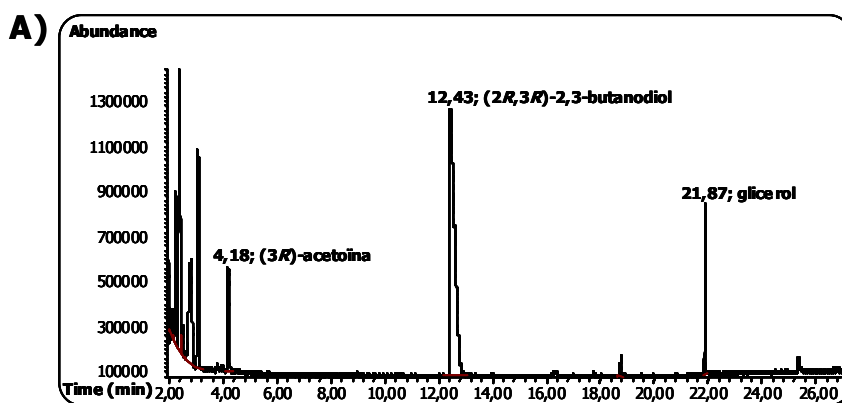
FIGURA 23: Estàndards dels diferents isòmers de l'acetoïna i el 2,3-butanodiol.

A) Estructura dels diferents isòmers del 2,3-butanodiol i de la 3-hidroxi-2-butanona (o acetoïna).

B) Estàndards separats en la columna quiral β -DEXTM en un cromatògraf de gasos acoblat a un espectròmetre de masses (CG-EM). Els estàndards són una barreja de (*R/S*)-acetoïna 40 mM, (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol 20 mM; (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol 20 mM i *meso*-2,3-butanodiol 20 mM. Els temps de retenció s'indiquen en minuts.

Podem dir que la Bdh1p oxida de manera específica els grups alcohol en configuració *R*, doncs la oxidació del *meso*-2,3-butanodiol només produeix *S*-acetoïna. Si podés reaccionar amb els grups alcohol en configuració *S*, ens apareixeria també la *R*-acetoïna. La Bdh1p també redueix els grups funcionals cetona a grups hidroxil en configuració *R* de manera específica, doncs no s'observa la formació de l'isòmer (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol, ni és capaç d'oxidar-lo a acetoïna (taula 9).

Finalment, cal destacar que la configuració del carboni adjacent al que és reduït és important, essent menor la reacció si es troba en configuració *S*. Així, els resultats obtinguts per a la reducció de l'acetoïna (figura 24E) demostren que la síntesi de *meso*-2,3-butanodiol és menor que la del (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol, on l'única diferència entre els dos compostos és la configuració del grup hidroxil de l'acetoïna.



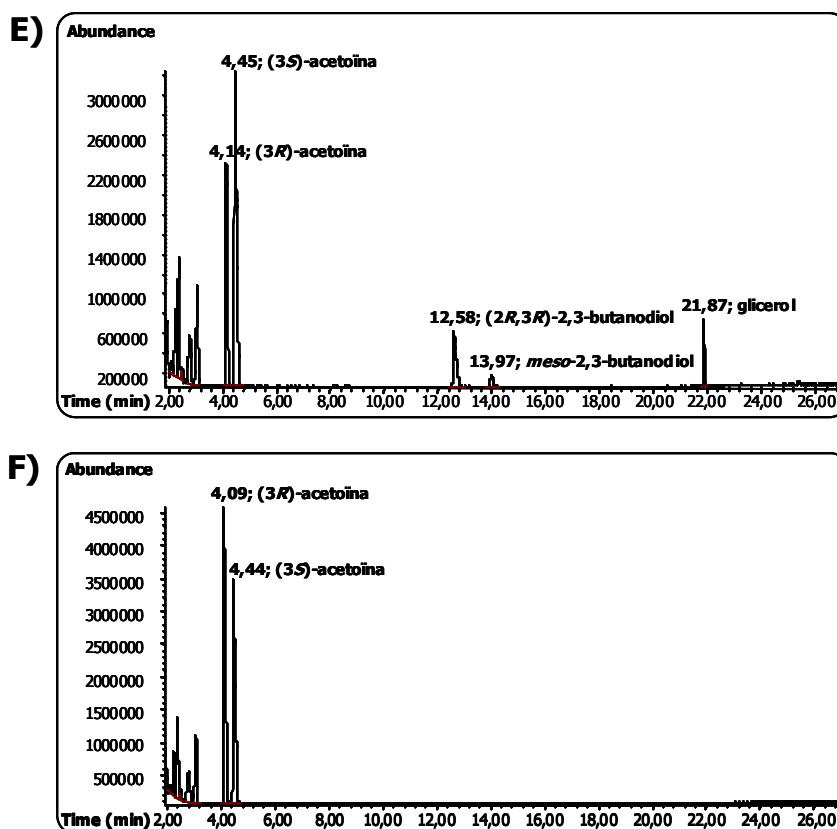


FIGURA 24 (pàgines 98 i 99): Anàlisi de l'estereoespecificitat de la Bdh1p mitjançant diferents reaccions d'oxidació i reducció dels isòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoina per CG-EM. Les reaccions es van realitzar en tampó fosfat sòdic 0,1 M pH 7,5 en presència de NAD^+ 40 mM o NADH 40 mM, els substrats a 40 mM i 2 unitats d'enzim pur. Les reaccions s'incubaven tota la nit a temperatura ambient. El glicerol present a les reaccions A, C i E correspon al glicerol utilitzat per a la conservació de l'enzim a -80°C .

- A)** Reacció d'oxidació del (2R,3R)-2,3-butanodiol per la Bdh1p.
- B)** Control de la reacció A: (2R,3R)-2,3-butanodiol, sense enzim.
- C)** Reacció d'oxidació del meso-2,3-butanodiol per la Bdh1p.
- D)** Control de la reacció C: meso-2,3-butanodiol, sense enzim.
- E)** Reacció de reducció de la (R/S)-acetoina per la Bdh1p.
- F)** Control de la reacció E: (R/S)-acetoina, sense enzim.

7. Deleció del gen *BDH1* en la soca de *S. cerevisiae* FY834.

Es va procedir a deleccionar el gen *BDH1* per fer estudis posteriors del seu efecte en el metabolisme del 2,3-butanodiol en *S. cerevisiae*.

7.1 Estratègia de la deleció.

La deleció del gen *BDH1* es va realitzar per substitució de la zona codificant del gen *BDH1* pel gen *TRP1*. Es va transformar la soca FY834, que presenta auxotrofia pel triptòfan, amb el fragment de DNA lineal que conté el gen *TRP1* flanquejat per dos

regions de la zona codificant del gen *BDH1* de 327 i 461 pb. Com que les regions són idèntiques al gen *BDH1* del cromosoma, tindrà lloc la recombinació homòloga i es substituirà el gen original pel gen *TRP1* (figura 12). Els transformants es van seleccionar en medi SMM sense triptòfan, seleccionant d'aquesta manera les colònies que havien incorporat el gen *TRP1*. Els nous clons es van purificar per creixement de la colònia en una nova placa de medi SMM sense triptòfan.

7.2 Anàlisi de les noves soques.

Es van fer tres tipus d'anàlisis per saber si les colònies obtingudes de la transformació havien incorporat el gen *TRP1*, i d'aquesta manera s'havia interromput el gen *BDH1*: 1) amplificació del gen *BDH1* per PCR, 2) anàlisi dels homogenats dels diferents clons per isoelectroenfoc tenyits per activitat 2,3-butanodiol deshidrogenasa, i 3) per mesura de l'activitat Bdh1p en els homogenats amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol i acetoïna.

Es va amplificar el gen *BDH1* a partir de DNA genòmic dels diferents clons obtinguts de la mateixa manera que es va dur a terme l'amplificació del gen per clonar-lo al vector pYES2. En l'anàlisi de l'amplificació del gen *BDH1* a partir de DNA genòmic dels clons 2 i 3 mitjançant electroforesi d'agarosa (figura 25A), apareix una banda d'aproximadament 1580 pb que correspon al fragment *TRP1* flanquejat per les seqüències del gen *BDH1*, mentre que la soca original presenta la banda de 1149 pb corresponent al gen intacte. En l'anàlisi per isoelectroenfoc (figura 25B) el clon 2 (carril 3) no presenta la banda de pI de 6,95 corresponent a l'enzim Bdh1p. Aquesta banda es troba present tant a la soca FY834, com a la soca WV36-405[pYES2-*BDH1*] crescuda en medi mínim sense uracil i amb galactosa al 2% per induir l'expressió de la Bdh1p.

Tant l'anàlisi de productes de PCR com el gel d'isoelectroenfoc tenyit per activitat Bdh1p indiquen que s'ha produït la integració del gen marcador *TRP1* en el *locus BDH1* i que aquesta recombinació ha comportat una pèrdua de la proteïna Bdh1p. A més, no es va trobar activitat Bdh1p amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol ni amb acetoïna en els homogenats dels clons 2 i 3. El creixement de la soca sense el gen *BDH1* indicava que el gen no és essencial pel creixement en medi YPD. Es va obtenir una soca amb el gen *BDH1* deletat que es va anomenar EG2 (Annex, taula 23).

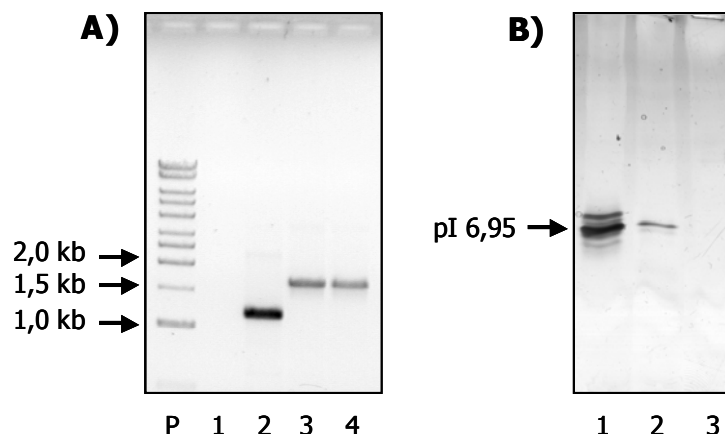


FIGURA 25: Anàlisi de diferents colònies obtingudes durant la deleció del gen *BDH1*.

A) Anàlisi mitjançant electroforesi en gel d'agarosa dels fragments corresponents al *locus BDH1* del DNA genòmic dels clons 2 i 3 amplificats per PCR amb els oligonucleòtids YAG0-A i YAG0-B.

Carril P: Marcadors de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).

Carril 1: Control de PCR sense DNA motlle.

Carril 2: Soca FY834.

Carril 3: Clon 2.

Carril 4: Clon 3.

B) Isoelectroenfoc, en el sistema minigel vertical, d'homogenats (25 μ g de proteïna) de diferents soques de llevat. Tinció per activitat BDH.

Carril 1: Soca WV36-405[pYES2-*BDH1*] crescuda en medi mínim sense uracil i amb galactosa al 2%.

Carril 2: Soca FY834 crescuda en medi ric YPD fins a saturació.

Carril 3: Clon 2 crescut en medi YPD fins a saturació.

8. Creixement de les soques FY834 i EG2 en 2,3-butanodiol com font de carboni.

L'objectiu dels experiments que es presenten a continuació va ser trobar noves proteïnes que tinguessin activitat amb els substrats de la Bdh1p i poder identificar nous enzims implicats en el metabolisme del 2,3-butanodiol en llevat.

8.1 Corbes de creixement de les soques FY834 i EG2 en medi ric (YPD) i amb 2,3-butanodiol al 3% com a font de carboni.

La primera aproximació va ser determinar el creixement de la soca silvestre FY834 i de la mutant EG2 en glucosa al 2% i en 2,3-butanodiol al 3% (mescla d'isòmers). S'ha descrit que diferents espècies del gènere *Candida*, *Hansenula* i *Pichia* (Verduyn i cols., 1988b) poden utilitzar el 2,3-butanodiol al 0,5% i al 3% com única font de carboni, així que es va determinar la corba de creixement amb aquest compost a *S. cerevisiae*.

El creixement de les dues soques en medi ric YPD (Figura 26) no mostra cap diferència en el temps de generació ($t_d = 0,68 \text{ h}^{-1}$) o en la O.D.₆₀₀ final. La deleció del gen no afecta al creixement en aquestes condicions.

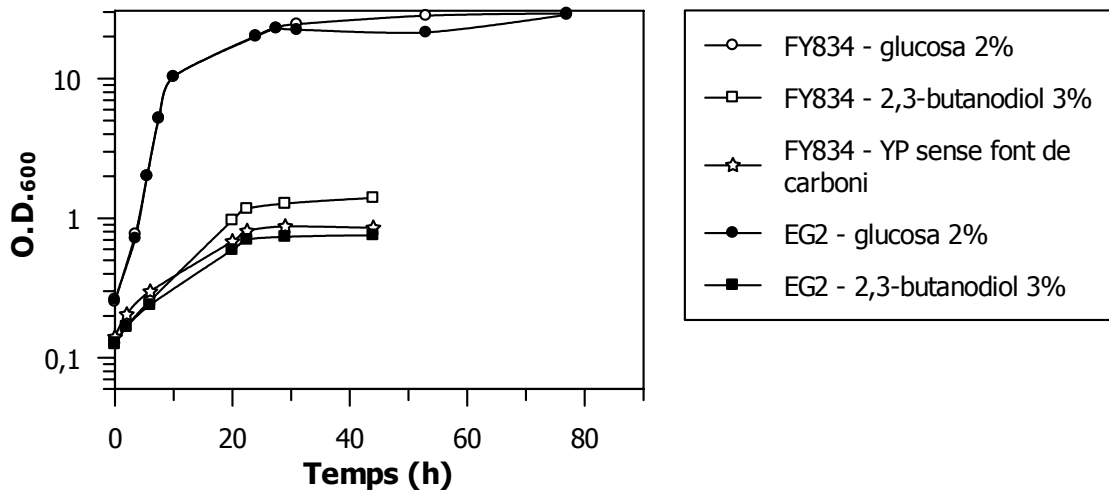


FIGURA 26: Corbes de creixement de les soques FY834 i EG2 en diferents medis i condicions (quadre). El creixement es va seguir per mesura de la O.D.₆₀₀.

Sí que es veuen diferències de creixement quan s'utilitza el 2,3-butanodiol com a font de carboni. En aquest cas, i comparant amb el creixement en YPD, es veu que la soca FY834 arriba a una O.D.₆₀₀ final vint vegades inferior a la del creixement amb glucosa al 2%. En el cas de la soca EG2 no es veu un creixement degut al 2,3-butanodiol al 3%, sinó que la corba de creixement és pràcticament idèntica a la obtinguda únicament amb extracte de llevat i peptona. Sembla que la base del medi ric conté prou nutrients per permetre un creixement pobre encara que no s'hi afegeixi cap font de carboni externa. Amb 2,3-butanodiol al 3%, la soca silvestre creix fins a un valor de O.D.₆₀₀=1,4, mentre que el creixement obtingut sense cap font de carboni adicional o amb la soca mutant EG2 és d'aproximadament 0,75. Per tant, el gen *BDH1*, i en conseqüència l'enzim Bdh1p, possibilitaria el poc creixement adicional de la soca silvestre respecte l'aconseguit sense afegir cap font de carboni externa.

8.2 Anàlisi de les soques crescudes en les condicions anteriors.

Durant la fase exponencial del creixement anterior es van recollir mostres dels cultius crescuts en glucosa i 2,3-butanodiol de les dues soques. Les cèl·lules recollides es van homogeneïtzar per fer-ne un anàlisi per isoelectroenfoc (Figura 27).

Taula 10

Activitat diacetil reductasa (U/mg) en homogenats de les soques FY834 i EG2 crescudes en glucosa al 2% i 2,3-butanodiol (mescla d'isòmers) al 3%

Medi	FY834	EG2
Glucosa 2%	0,12	0,012
2,3-Butanodiol 3%	0,34	0,725

L'activitat amb diacetil es va determinar a 50 mM de substrat en tampò fosfat de sodi 33 mM pH 7,0 i NADH 0,2 mM.

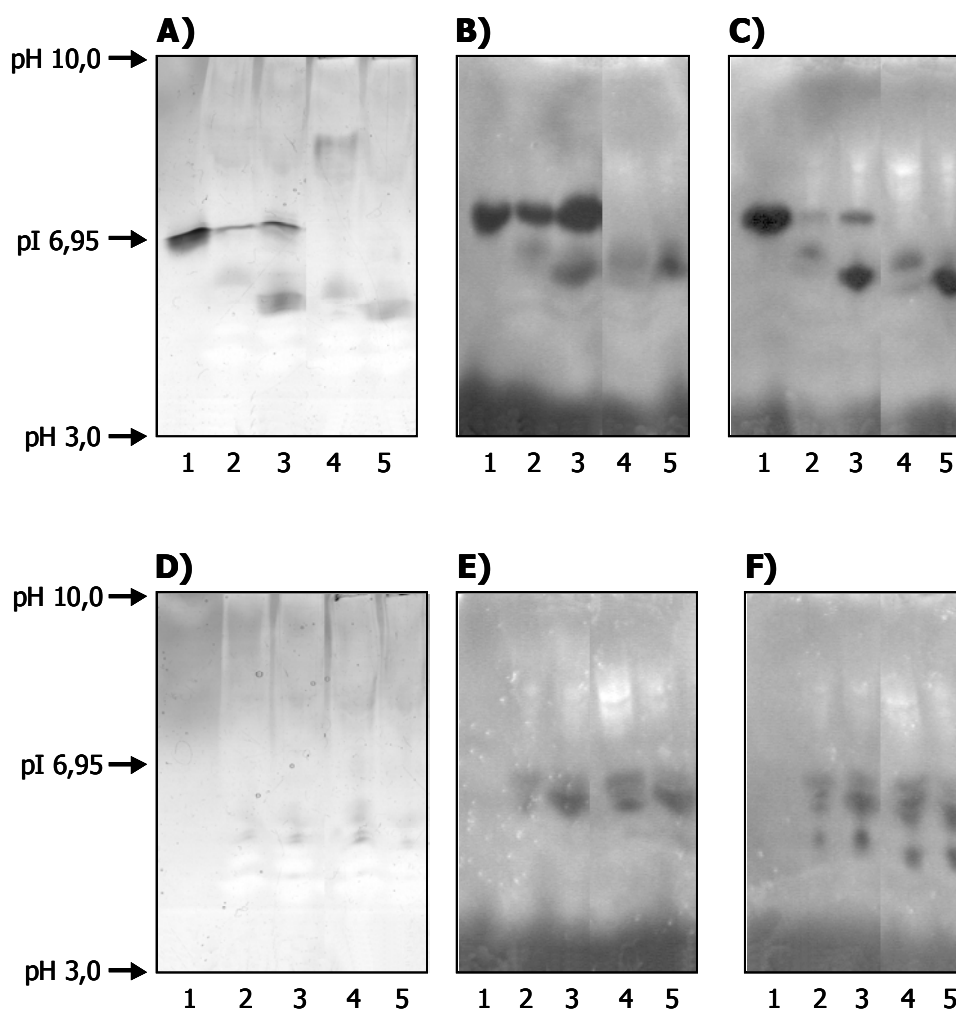


FIGURA 27: Anàlisi mitjançant isoelectroenfoc en gel de poliacrilamida d'interval de pH 3,0-10,0 dels homogenats (40 μ g de proteïna) de les soques FY834 i EG2 crescudes en medi YPD i YP amb 2,3-butanodiol al 3%. Carril 1, 28 mU de Bdh1p excepte en el gel B que es van carregar 2,8 mU; carril 2, soca FY834 crescuda en medi YPD; carril 3, soca FY834 crescuda en medi YP amb 2,3-butanodiol al 3%; carril 4, soca EG2 crescuda en medi YPD; carril 5, soca EG2 crescuda en medi YP amb 2,3-butanodiol al 3%. Els gels es van tenyir per activitat amb els següents substrats i cofactors:

- A)** 2,3-butanodiol (mescla d'isòmers) i NAD⁺.
- B)** acetoina i NADH.
- C)** diacetil i NADH.
- D)** 2,3-butanodiol (mescla d'isòmers) i NADP⁺.
- E)** acetoina i NADPH.
- F)** diacetil i NADPH.

Es van carregar homogenats (40 µg de proteïna) en diferents gels que es van tenyir de dues maneres: per activitat d'oxidació amb 2,3-butanodiol utilitzant NAD⁺ o NADP⁺, i per activitat de reducció de l'acetoïna i del diacetil amb NADH o NADPH (Figura 27). Amb aquest experiment es volia identificar per tinció en els gels alguna altra deshidrogenasa capaç d'usar també els substrats típics de la Bdh1p.

De l'anàlisi realitzat (figura 27) se'n poden extreure diferents conclusions:

- La Bdh1p, tal i com es va demostrar per activitat, és específica per al coenzim NAD(H), de manera que en els gels tenyits amb NADP(H) no es pot detectar la banda de l'enzim.

- S'observa l'absència de Bdh1p en els carrils 4 i 5 de tots els gels, que corresponen a extractes de la soca EG2.

- Hi ha inducció de la Bdh1p en la soca FY834 crescuda amb 2,3-butanodiol (carril 3) respecte de la crescuda en glucosa (carril 2). Això s'observa per a les tres tincions utilitzades (gels A, B i C, carril 3).

- En els gels tenyits amb diacetil i NADH es detecta una activitat diacetil reductasa addicional (gels B i C), de menor pI que la Bdh1p en tots els cultius, però sobretot en els crescuts en 2,3-butanodiol al 3% (carrils 3 i 5).

- També es detecten bandes de menor pI que la Bdh1p que es tenyeixen amb diacetil i acetoïna, i NADPH (gels E i F). Aquestes activitats no són específiques dels cultius crescuts en 2,3-butanodiol, sinó que es troben presents en totes les condicions de creixement analitzades.

Es va determinar l'activitat dels mateixos homogenats amb diacetil 50 mM i NADH 0,2 mM en tampó fosfat de sodi 33 mM pH 7,0, i es va observar un augment de l'activitat específica en la soca EG2 crescuda amb 2,3-butanodiol 3% com a font de carboni respecte la soca silvestre FY834 (0,725 U/mg vs. 0,34 U/mg respectivament) (Taula 10). Això indicava la inducció d'un enzim amb activitat diacetil reductasa. En conseqüència, ens vàrem proposar purificar i identificar l'enzim amb activitat diacetil reductasa a partir de la soca EG2 crescuda en medi YP amb 2,3-butanodiol 3% com font de carboni.

9. Purificació d'una nova diacetil reductasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

9.1 Purificació d'una nova diacetil reductasa de *S. cerevisiae*.

Un cultiu (4,8 g de cèl·lules) de la soca EG2 crescuda en medi YP amb 2,3-butanodiol 3% com a font de carboni va servir de material de partida per a la purificació de la suposada diacetil reductasa identificada en els gels anteriors.

9.1.1 Cromatografia d'intercanvi iònic DEAE Sepharose Fast Flow.

L'activitat diacetil reductasa (DR) present en l'homogenat dialitzat de la soca EG2 va quedar totalment retinguda a la resina i es va eluir aplicant un gradient de NaCl de 0 a 0,2 M en tampó Tris-HCl 10 mM pH 7,5, DTT 0,5 mM (tampó A) (Figura 28A).

Les fraccions actives amb diacetil van resultar coincidir amb les fraccions actives amb etanol, es van concentrar i aplicar a una cromatografia en hidroxilapatit.

9.1.2 Cromatografia en hidroxilapatit BioGel HT.

En aquesta etapa l'activitat DR va quedar retinguda a la resina i es va eluir aplicant un gradient de fosfat potàssic de 10 a 600 mM (Figura 28B). Com en el cas anterior les activitats amb diacetil i etanol van tornar a coeluir.

Les fraccions actives es van concentrar i dialitzar per aplicar-se a una columna d'afinitat.

9.1.3 Cromatografia d'afinitat Cibacron Blue 3GA Agarosa.

A continuació es va realitzar una cromatografia amb la resina d'afinitat Cibacron Blue 3GA Agarosa on l'enzim va quedar totalment retingut. L'elució es va dur a terme amb un gradient de NADH de 0 a 750 μ M en tampó A (Figura 28C). Es va aplicar la fracció activa concentrada a una columna de gel filtració PD10 per treure l'excés de NADH que s'havia utilitzat.

Les fraccions actives amb diacetil també eren actives amb etanol, de manera que es va purificar una alcohol deshidrogenasa de llevat amb activitat reductora amb diacetil.

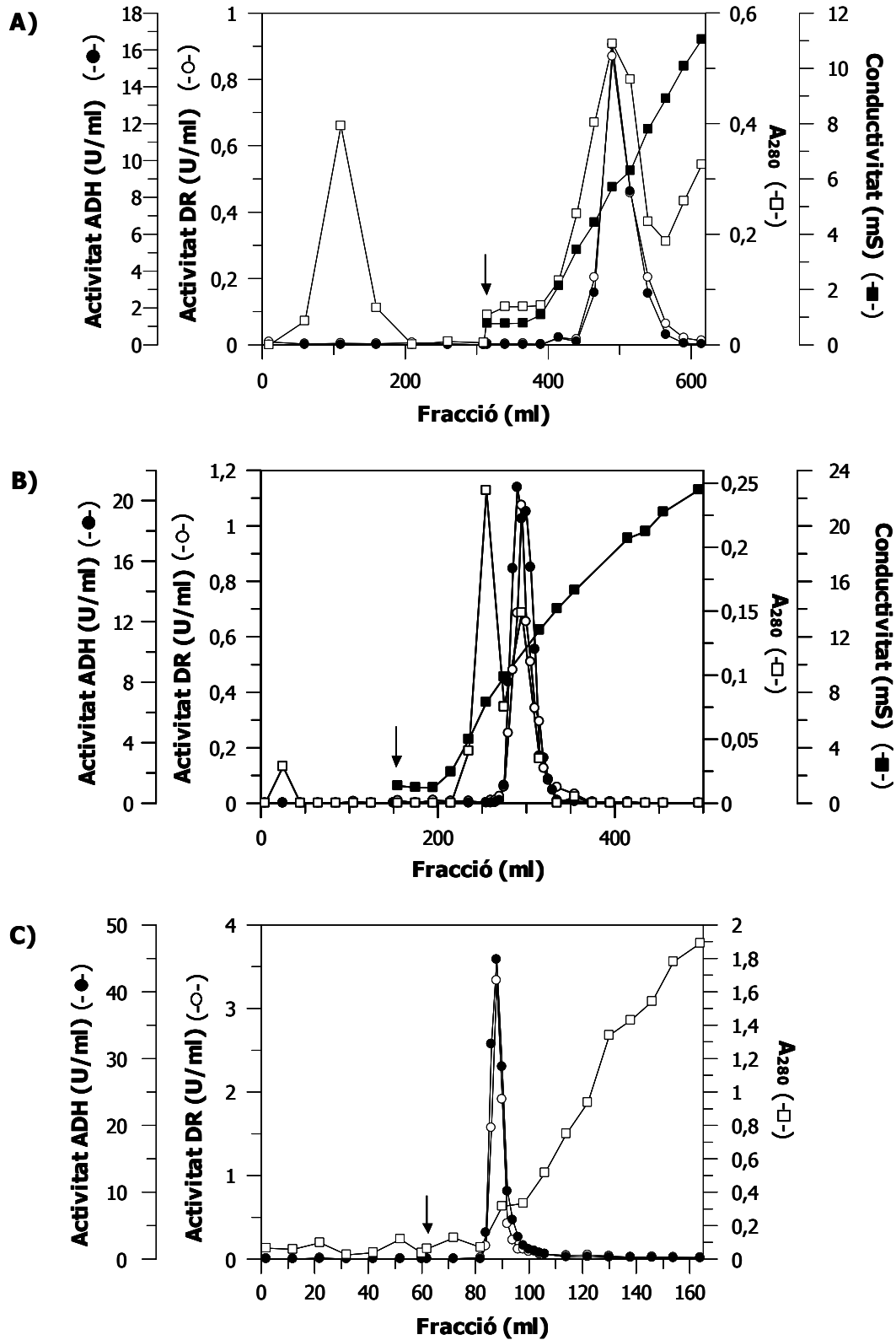


FIGURA 28: Purificació d'una nova diacetil reductasa de *Saccharomyces cerevisiae*. L'activitat ADH es va determinar amb etanol 33 mM en tampó glicina 0,1 M pH 10,0 i NAD⁺ 2,4 mM, mentre que l'activitat diacetil reductasa es va determinar a 50 mM de substrat en tampó fosfat de sodi 33 mM pH 7,0 i NADH 0,2 mM.

- A)** Cromatografia en DEAE Sepharose Fast Flow. La fletxa indica l'inici del gradient de NaCl.
- B)** Cromatografia en hidroxilapatit BioGel-HT. La fletxa indica l'inici del gradient de fosfat de potassi .
- C)** Cromatografia d'afinitat en Cibacron Blue 3GA-Agarosa. La fletxa indica l'inici del gradient de NADH.

9.2 Anàlisi del grau de puresa de l'enzim.

Es va analitzar la puresa de l'enzim mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS tenyit amb sals de plata i només es va detectar una banda de pes molecular d'aproximadament 42.000 Da (Figura 29).

FIGURA 29: Determinació del grau de puresa i del pes molecular de la subunitat de la nova diacetil reductasa de *S. cerevisiae* després de diferents etapes de purificació mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS.

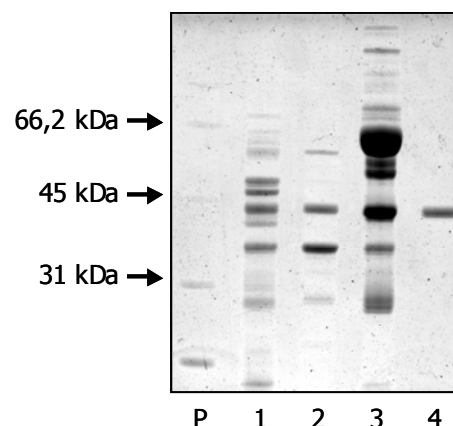
Carril P: Patrons de pes molecular (Bio-Rad).

Carril 1: Homogenat inicial (10 µg).

Carril 2: Cromatografia DEAE Sepharose Fast Flow (5 µg).

Carril 3: Cromatografia d'hidroxiapatit (5 µg).

Carril 4: Cromatografia d'afinitat Cibacron Blue 3GA Agarosa (1 µg).



Es va determinar la concentració de proteïnes de les mostres obtingudes en les diferents etapes de purificació, així com les activitats diacetil reductasa i ADH. Els resultats es troben agrupats en la taula de purificació següent (Taula 11).

Taula 11

Purificació de la diacetil reductasa (Adh2p) de *Saccharomyces cerevisiae*.

Activitat Diacetil Reductasa	Proteïna (mg)	Activitat total (U)	Activitat específica (U/mg)	Factor de purificació	Rendiment (%)
Homogenat	119,24	56,6	0,47	1	100
DEAE Sepharose Fast Flow	9,59	22	2,29	4,87	38,8
Hidroxiapatit	3,94	22,2	5,63	11,98	39,2
Cibacron Blue 3GA-Agarosa	1,113	5,81	5,22	11,1	10,26
Cibacron Blue 3GA-Agarosa (activitat ADH)	1,113	146,5	131,63	15,4	14,4

L'activitat amb diacetil es va determinar a 50 mM de substrat en tampó fosfat de sodi 33 mM pH 7,0 i NADH 0,2 mM.

L'activitat ADH es va determinar amb etanol 33 mM en tampó glicina 0,1 M pH 10,0 i NAD⁺ 2,4 mM.

Així, s'ha purificat una proteïna amb activitat ADH i diacetil reductasa. Al llarg de la purificació hem vist com les dues activitats coincidien en l'elució, i mitjançant un gel de poliacrilamida amb SDS s'ha detectat una única banda electroforètica en la preparació purificada. Es demostra, doncs, que una de les alcohol deshidrogenases de llevat també té activitat amb diacetil.

9.3 Identificació de la diacetil reductasa com l'Adh2p de *S. cerevisiae*.

La proteïna pura obtinguda de la purificació es va digerir amb tripsina i es va comparar el mapa peptídic obtingut amb mapes peptídics teòrics de tots els ORF del genoma del llevat que es troben de la base de dades NCBI nr 20010501. La proteïna que presentava la major similitud amb la diacetil reductasa va ser l'alcohol deshidrogenasa II de llevat o Adh2p.

Així doncs, s'havia purificat l'enzim alcohol deshidrogenasa II (Adh2p) a partir de la seva activitat amb diacetil.

10. Caracterització cinètica de l'Adh2p.

10.1 Constants cinètiques de l'Adh2p.

L'activitat específica de la nostra preparació (131,63 U/mg, Taula 11) es inferior al valor publicat (280 U/mg, Ganzhorn i cols., 1987). Aquesta diferència pot ser deguda a que part de l'enzim es trobi inactiu, o que porti unit NADH provinent de l'elució de la resina Cibacron Blue 3GA, el qual actuaria d'inhibidor.

Donat que les característiques de l'enzim Adh2p són ja conegudes (Ebisuzaki i Guzman Barros, 1957, i Ganzhorn i cols., 1987), només es van determinar les constants cinètiques per l'etanol per confirmar la identificació obtinguda per mapes tríptics de l'enzim. L'activitat es va determinar en tampó glicina 0,1M pH 10,0 i NAD⁺ 2,4 mM i les constants eren: $K_m = 1,35 \pm 0,15$ mM, $k_{cat} = 23.818 \pm 586$ min⁻¹, i $k_{cat}/K_m = 17.634 \pm 2.008$ mM⁻¹.min⁻¹. El valor de la K_m no és molt diferent del publicat (0,81 mM, Ganzhorn i cols., 1987).

Apart de l'estudi amb etanol, el substrat típic de l'Adh2p, es van determinar les activitats amb els substrats típics de la Bdh1p. Es van intentar determinar les constants cinètiques pel diacetil (concentracions assajades de 10 fins a 600 mM) i per la 2,3-pentanodiona (de 10 fins 250 mM), però no es va poder saturar l'Adh2p amb cap dels dos substrats. En el seu lloc es va determinar l'activitat a concentracions fixes de diferents compostos (Taula 12).

Taula 12

Activitats específiques de l'Adh2p amb substrats típics de la Bdh1p

Substrat	Activitat d'oxidació (U/mg)	Substrat	Activitat de reducció (U/mg)
Etanol	131,63	Diacetil	5,22
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-butanodiol	0	2,3-pentanodiona	2,55
2,3-butanodiol (mescla)	0	Acetoïna	0
Acetoïna	0		

L'activitat d'oxidació es va determinar en tampó glicina 0,1 M pH 10,0 i NAD⁺ 2,4 mM, essent les concentracions de l'etanol de 33 mM. Es van assajar concentracions entre 50 i 500 mM per l'acetoïna, el (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol i el 2,3-butanodiol (mescla d'isòmers). Les activitats de reducció es van determinar a 50 mM de substrat en tampó fosfat de sodi 33 mM pH 7,0 i NADH 0,2 mM.

L'Adh2p només presentava activitat amb el diacetil i la 2,3-pentanodiona i no era capaç d'oxidar el (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol i l'acetoïna, ni de reduir aquesta última. Així, de la reacció seqüencial que pot realitzar la Bdh1p (reducció de diacetil a acetoïna i d'aquí fins a 2,3-butanodiol) l'Adh2p només és capaç de dur a terme la primera reacció.

10.2 Estereoespecificitat de l'Adh2p. Comparació amb la Bdh1p.

Es va estudiar la reducció de diacetil i 2,3-pentanodiona pels enzims Adh2p i Bdh1p, doncs ambdós són actius amb ells. Aquest estudi d'estereoespecificitat s'ha realitzat afegint format deshidrogenasa (FDH) de *S. cerevisiae* per regenerar el coenzim (NADH) que s'afegeix en menor concentració (1 mM) que el substrat (Hummel, 1997). No es van poder injectar estàndards dels possibles productes de les reaccions de la 2,3-pentanodiona (2,3-pentanodiol, 2-hidroxi-3-pentanona i 3-hidroxi-2-pentanona) perquè no són productes comercials, i tampoc es van injectar diacetil o 2,3-pentanodiona perquè reaccionaven amb el solvent orgànic utilitzat per realitzar l'extracció, l'acetat d'etil, formant adductes de mobilitat anòmala. L'extracció amb un solvent orgànic es feia necessària per realitzar l'anàlisi cromatogràfic, doncs la columna utilitzada no accepta medis aquosos.

A la figura 30 podem veure els cromatogrames del control positiu que es va realitzar per testar el sistema de regeneració del NADH mitjançant la reacció d'oxidació d'àcid fòrmic per la FDH de *S. cerevisiae* acoblada a la reducció dels isòmers de l'acetoïna per la Bdh1p. Aquesta reacció ja s'havia realitzat (figura 24E) sense aquest sistema de regeneració del coenzim, de manera que la reacció de la figura 30 ens

servia com a control positiu de la reacció acoblada al sistema de regeneració del NADH.

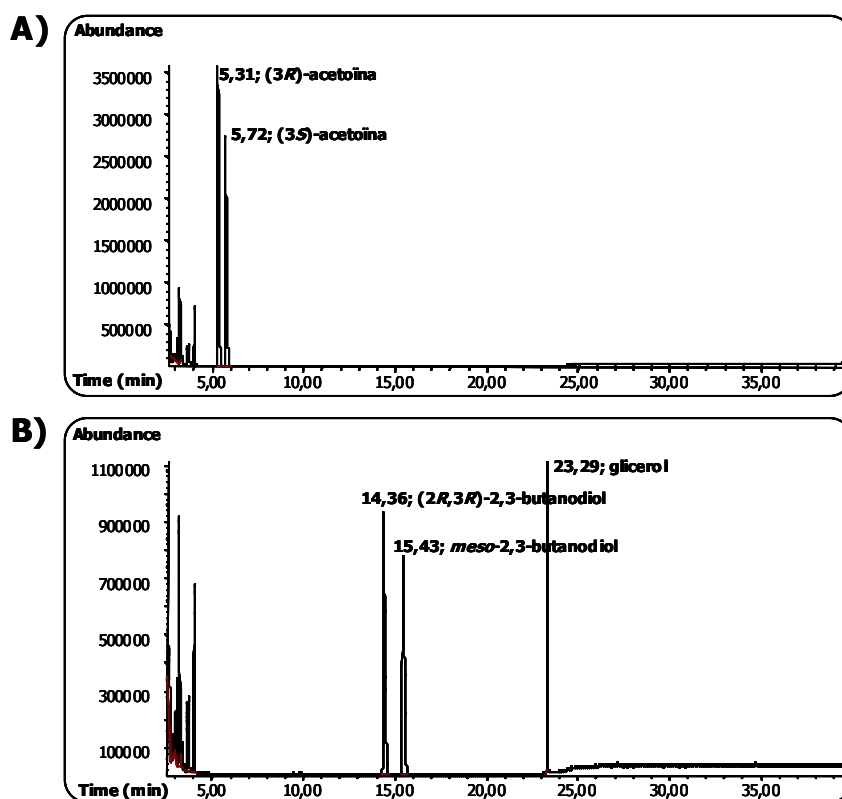


FIGURA 30: Reducció dels diferents isòmers de l'acetoina per la Bdh1p. La reacció es va realitzar acoblada al sistema de regeneració del NADH per la FDH (Materials i mètodes, apartat 10.2.2) amb NADH 1 mM, acetoina 50 mM, àcid fòrmic 100 mM, 8 unitats de FDH en tampó fosfat de sodi 33 mM pH 7,0 durant tota la nit. S'indica el temps de retenció dels diferents compostos en minuts.

A) Control de reacció de reducció de la (*R/S*)-acetoina, sistema sense Bdh1p.

B) Reacció de reducció de la (*R/S*)-acetoina per la Bdh1p.

Si la reacció de la figura 30B, amb el sistema acoblat, es compara amb la mateixa reacció a la qual no s'hi ha afegit el sistema regenerador de NADH (Figura 24E dels resultats) podem dir que la reacció de la figura 30B dóna un millor rendiment, doncs en aquest cas la reducció de l'acetoina és total i no es detecten restes de cap dels seus isòmers a la cromatografia. Com ja s'havia observat en les reaccions presentades a la figura 24, també apareix un pic de glicerol corresponent a l'usat en la conservació de l'enzim a -80°C .

Havent comprovat que el sistema de regeneració del coenzim funcionava correctament es van realitzar les activitats enzimàtiques amb els enzims Bdh1p i Adh2p

utilitzant diacetil (Figura 32A i B) i 2,3-pentanodiona (Figura 32C i D). L'estructura dels dos compostos es presenta a la següent figura (Figura 31).

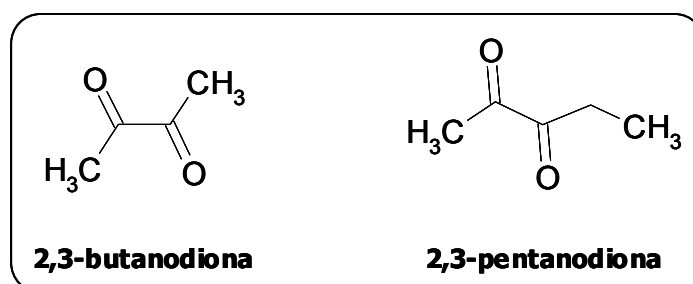


FIGURA 31: Estructura dels dos substrats utilitzats pels enzims Bdh1p i Adh2p, 2,3-butanodiona (o diacetil) i 2,3-pentanodiona. La reducció de cadascun d'ells comporta la producció de diferents estereoisòmers del alcohols depenent de l'enzim utilitzat per la seva reducció.

Les figures 32A i 32B corresponen a la reducció del diacetil per la Bdh1p i l'Adh2p respectivament. La principal diferència observada entre l'activitat dels dos enzims és la capacitat de la Bdh1p de reduir el diacetil a acetoïna i finalment a 2,3-butanodiol mentre que l'Adh2p només catalitza el primer pas. És interessant destacar que l'acetoïna que es produeix per la reducció del diacetil per part de la Bdh1p no s'acumula (i no es detecta en la cromatografia), i es redueix tota a (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol. Anteriorment s'ha demostrat que l'acetoïna és el millor substrat de l'enzim (taules 8 i 9), presentant la millor eficiència catalítica de tots els substrats analitzats, fins i tot el diacetil, que no satura l'enzim. Així, tot indica que la velocitat de reducció del diacetil és menor a la de reducció de l'acetoïna i que, per tant, no podem observar-la en la cromatografia, perquè tota la que es sintetitza serveix de substrat per la Bdh1p que la redueix a (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol.

La reducció del diaceti és un pas estereoespecífic per cada enzim, així la reducció de diacetil per la Bdh1p només produeix (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol, a través de la producció de (*R*)-acetoïna (figura 32A). En canvi, l'Adh2p només produeix l'isòmer (*S*)-acetoïna i no és capaç de reduir el segon grup carbonil a un altre grup alcohol (32B). Aquestes dades concorden amb les activitats espectrofotomètriques obtingudes amb l'enzim purificat (taula 12).

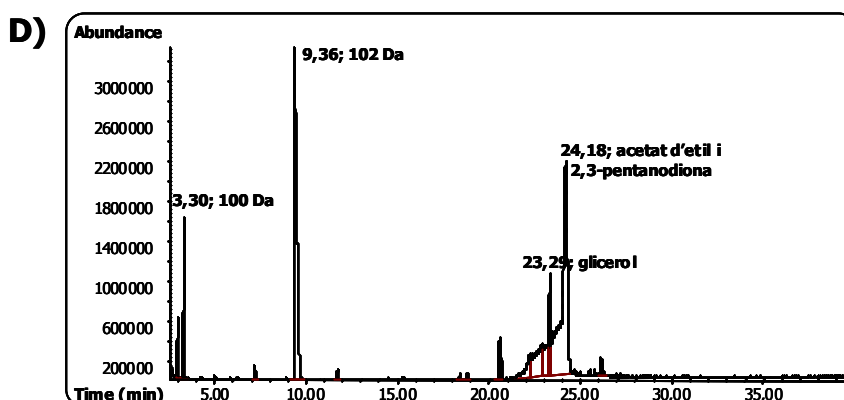
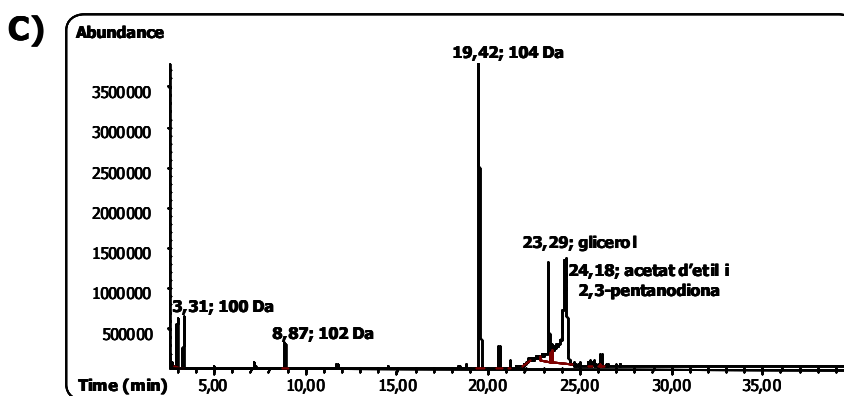
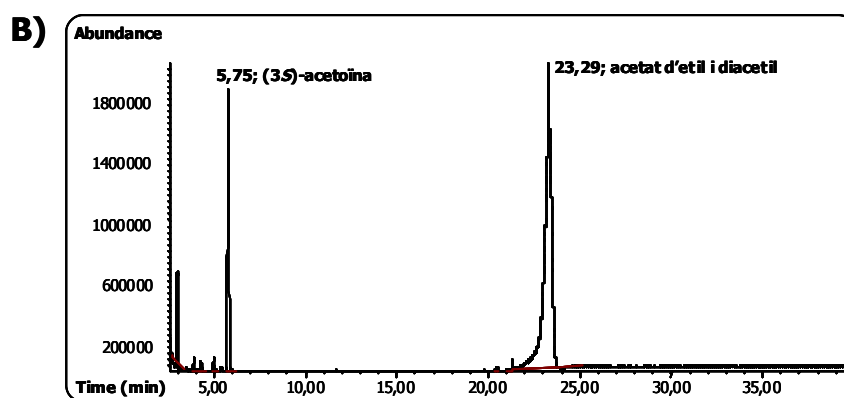
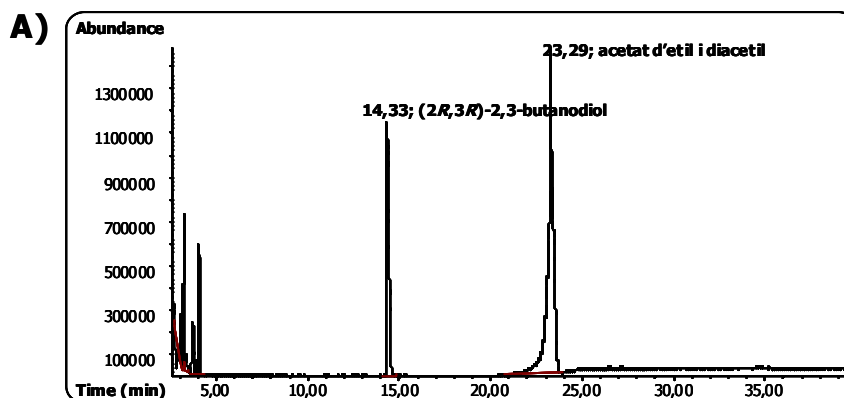


FIGURA 32 (pàgina anterior): Anàlisi de l'estereoespecificitat de la Bdh1p i l'Adh2p mitjançant reaccions de reducció del diacetil i la 2,3-pentanodiona per CG-EM. Les reaccions es van realitzar en tampó fosfat sòdic 33 mM pH 7,0 en presència de NADH 1 mM, àcid fòrmic 100 mM, 8 unitats de FDH i substrat a 50 mM. Les reaccions començaven en afegir 3,75 unitats de Bdh1p o 1,62 unitats d'Adh2p pures. Les reaccions s'incubaven tota la nit a temperatura ambient. El glicerol present a les reaccions C i D correspon al glicerol utilitzat per a la conservació de l'enzim a -80°C . A les reaccions A i B el glicerol queda emmascarat per l'aparició de l'adducte entre l'acetat d'etil i el diacetil que no ha reaccionat. S'indica el temps de retenció dels diferents compostos en minuts.

- A)** Reacció de reducció del diacetil per la Bdh1p.
- B)** Reacció de reducció del diacetil per l'Adh2p.
- C)** Reacció de reducció de la 2,3-pentanodiona per la Bdh1p.
- D)** Reacció de reducció de la 2,3-pentanodiona per l'Adh2p.

L'anàlisi de la reducció de la 2,3-pentanodiona pels enzims Bdh1p i Adh2p és més complex pel fet de no poder comptar amb patrons comercials dels isòmers dels productes. Els compostos produïts no es van poder identificar en cap de les dues llibreries on està connectat el cromatògraf de gasos, de manera que només es va poder conèixer el pes molecular de cadascun dels fragments obtinguts en passar els analits pel detector.

En base al pes molecular de la 2,3-pentanodiona (100 Da), de la corresponent hidroxipentanona (102 Da) i del 2,3-pentanodiol (104 Da) podem observar que la Bdh1p és capaç de reduir la 2,3-pentanodiona fins la seva forma més reduïda que és el 2,3-pentanodiol (Figura 32C), mentre que l'Adh2p, de manera anàloga a l'activitat amb diacetil, només és capaç de reduir un dels dos grups cetona del compost (Figura 32D) produint un dels isòmers de la hidroxipentanona.

També cal destacar que en el cas de la reducció de la 2,3-pentanodiona per la Bdh1p es detecta una petita producció de la hidroxipentanona (compost amb temps de retenció 8,87 min), el qual és un isòmer diferent al produït per l'Adh2p (compost amb temps de retenció 9,36 min). Tenint en compte l'estereoespecificitat dels enzims es pot hipotetitzar que la Bdh1p redueix els grups cetona a grups alcohol en configuració *R*, mentre que l'Adh2p redueix un dels grups ceto a un grup alcohol en configuració *S*.

11. Construcció de mutants delecionats pels gens *ADH2*, *YAL061W* i *BDH1*.

Per aprofundir en el paper d'aquests enzims en el metabolisme del 2,3-butanodiol, es van construir diferents mutants delecionats per els gens *BDH1*, *ADH2* i *YAL061W*.

Aquest últim s'ha inclòs en l'estudi del metabolisme del 2,3-butanodiol de llevat perquè, malgrat que no es té informació sobre el seu producte gènic, presenta un 51% d'identitat de seqüència amb el gen *BDH1*.

11.1 Clonatge del gen *ADH2* de *Saccharomyces cerevisiae* al vector pYES2.

L'amplificació del gen *ADH2* es va dissenyar a partir de la seqüència obtinguda en el banc de dades SGD. Per PCR es va obtenir tota la zona codificant del gen flanquejada per les seqüències de les dianes de restricció *Bam*HI/*Eco*RI als extrems 5' i 3' respectivament. Es va amplificar una banda de 1065 pb (Figura 33) que era una barreja de les seqüències dels gens *ADH2* i *ADH1*, doncs els oligonucleòtids hibridaven en els dos *locus*.

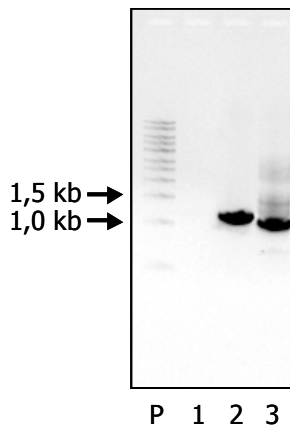
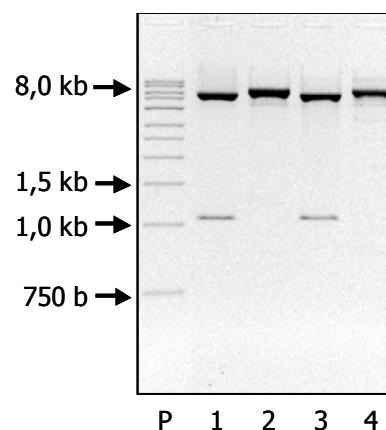


FIGURA 33: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,8% del producte d'amplificació per PCR amb els oligonucleòtids ADH2-B i ADH2-E.
Carril P: Patrons de pes molecular 1kb Ladder (Biotools).
Carril 1: Control negatiu de l'amplificació: reacció sense DNA motlle.
Carril 2: Producte d'amplificació del gen *BDH1* a partir de DNA genòmic de la soca S288C.
Carril 3: Producte d'amplificació del gen *ADH2* (i *ADH1*) a partir de DNA genòmic de la soca S288C.

Després de digerir el fragment de PCR purificat amb l'enzim de restricció *Kpn*I es va subclonar en el vector pYES2 modificat per eliminar-li la diana de restricció *Hind*III, necessària en les posteriors etapes per deletar el gen *ADH2*. Es van analitzar 11 clons digerint-los amb *Bam*HI/*Eco*RI i amb *Kpn*I (Figura 34). Els clons que havien incorporat el gen *ADH2* presentaven un fragment de 1047 pb quan es digerien amb *Bam*HI/*Eco*RI. La digestió amb *Kpn*I era un control per veure que el fragment clonat no era el gen *ADH1*, doncs la digestió amb aquest enzim de restricció alliberava dos fragments de DNA de 360 i 430 pb, mentre que no digeriria el gen *ADH2*.

La construcció es va anomenar pYES2-*ADH2* i va servir per deletar el gen en diferents soques de *S. cerevisiae*.

FIGURA 34: Electroforesi en gel d'agarosa al 1% de les digestions enzimàtiques amb *Bam*HI/*Eco*RI i *Kpn*I de dos clons pYES2-*ADH2*. Carril P: Patrons de pes molecular 1kb Ladder (Biotools). Carril 1: Clon 1 digerit amb *Bam*HI/*Eco*RI. Carril 2: Clon 1 digerit amb *Kpn*I. Carril 3: Clon 11 digerit amb *Bam*HI/*Eco*RI. Carril 4: Clon 11 digerit amb *Kpn*I.



11.2 Deleció del gen *ADH2* en les soques FY834 i EG2 de *S. cerevisiae*.

11.2.1 Estratègia de la deleció.

La deleció del gen *ADH2* es va realitzar per substitució de la zona codificant del gen pel gen *HIS3* (figura 13).

Es van transformar les soques FY834 i EG2 (auxotròfiques per histidina) amb un fragment lineal de DNA que contenia el gen *HIS3* flanquejat per dues regions del gen *ADH2* de 282 i 165 pb. El fragment s'obtenia per amplificació per PCR, i en transformar les cèl·lules substitueix el gen original per recombinació homòloga. Els transformants es seleccionaven en medi SMM sense histidina, seleccionant les colònies que havien incorporat en el genoma el gen *HIS3*. Els nous clons es purificaven en noves plaques de medi SMM sense histidina.

11.2.2 Anàlisi de les noves soques.

Es van analitzar els diferents clons per amplificació del gen *ADH2* en les mateixes condicions en que es va amplificar per clonar-lo al vector pYES2. Es va utilitzar com a motlle de la reacció, DNA genòmic dels diferents clons obtinguts de les soques FY834 i EG2. A la figura 35 podem comprovar que cinc dels sis clons derivats de la soca FY834 presentaven el fragment de 1,5 kb mentre que la soca silvestre presentava la banda de 1047 pb corresponent al gen *ADH2* intacte. El mateix va passar amb la soca EG2, cinc dels sis clons analitzats van amplificar la regió de 1,5 kb corresponent al gen *HIS3* que havia substituït al gen *ADH2*, mentre que la soca original EG2 presentava la banda de 1047 pb corresponent al gen *ADH2* original.

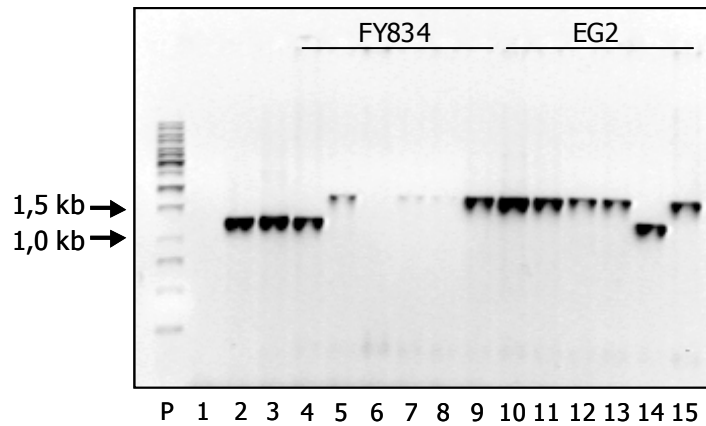


FIGURA 35: Anàlisi per electroforesi en gel d'agarosa de l'amplificació de la regió cromosòmica del gen *ADH2* en les soques de *S. cerevisiae* FY834, EG2, i en les soques obtingudes en la transformació per delecionar el gen *ADH2* amb el gen *HIS3*.

Carril P: Marcadors de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).

Carril 1: Control de PCR sense DNA motlle.

Carril 2: Control d'amplificació del *locus ADH2* en la soca FY834.

Carril 3: Control d'amplificació del *locus ADH2* en la soca EG2.

Carrils 4 a 9: Clons 1 a 6 derivats de la soca FY834.

Carrils 10 a 15: Clons 1 a 6 derivats de la soca EG2.

Vam obtenir dues noves soques que tenien el gen *ADH2* deleccionat, la soca FYA2 derivada de la soca silvestre FY834, i la EGA2 derivada de la soca EG2 (Annex, taula 23).

11.3 Deleció del gen *YAL061W* en la soca FY834 de *S. cerevisiae*.

La deleció d'aquest gen, homòleg al gen *BDH1*, es va realitzar segons l'estratègia descrita per Wach i col·laboradors (1998) que utilitza el gen de la kanamicina com gen marcador. En aquest cas no vam necessitar tenir clonada la seqüència del gen en cap vector, sinó que es va amplificar el casset d'expressió de la kanamicina que es troba en el vector pFA6-*kanMX4* (Wach i cols., 1994) amb els oligonucleòtids descrits al materials i mètodes (apartat 14.3). El producte de PCR de 1,5 kb es va utilitzar per transformar la soca FY834 que es va seleccionar en medi YPD amb geneticina. Els clons obtinguts es van purificar en nou medi YPD amb geneticina per eliminar possibles falsos positius.

Els clons es van analitzar per amplificació de la regió cromosòmica del gen *YAL061W* a partir de DNA genòmic (Figura 36).

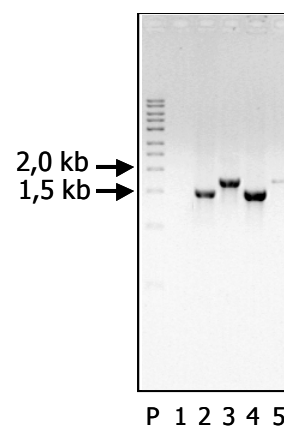
FIGURA 36: Anàlisi per electroforesi en gel d'agarosa de l'amplificació de la regió cromosòmica del gen *YAL061W* en les soques de *S. cerevisiae* FY834, i en les obtingudes en la transformació per deleccionar el gen *YAL061W* amb el gen marcador *kanMX4*.

Carril P: Marcadors de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).

Carril 1: Control de PCR sense DNA motlle.

Carril 2: Control d'amplificació del *locus YAL061W* en la soca FY834.

Carrils 3 a 5: Clons 1 a 3 derivats de la soca FY834.



En la soca silvestre FY834 hi havia l'amplificació d'una banda de ~1500 pb, mentre que en els clons que havien deleccionat el gen *YAL061W* (clons 1 i 3) s'amplificava una banda de ~1800 pb, doncs el gen *kanMX4* té 300 pb més que el gen *YAL061W*. La soca obtinguda es va anomenar FY61 (Annex, taula 23).

11.4 Deleció del gen *BDH1* en la soca FY61 de *S. cerevisiae*.

El protocol de deleció del gen *BDH1* es troba descrit en l'apartat 14.1 dels Materials i Mètodes. Es va procedir de la mateixa manera exceptuant la soca de partida, que en aquest cas fou la soca FY61.

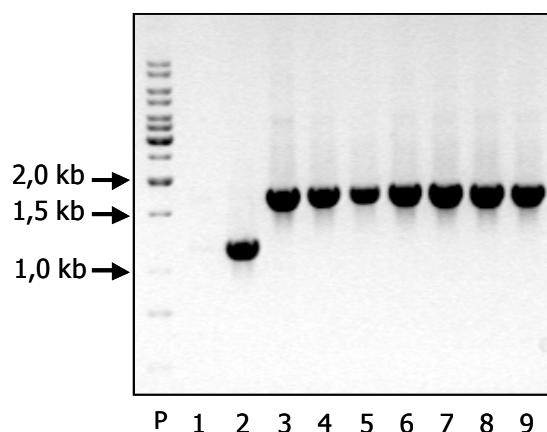


FIGURA 37: Anàlisi per electroforesi en gel d'agarosa de l'amplificació de la regió cromosòmica del gen *BDH1* en les soques de *S. cerevisiae* FY834, EG2 i en les obtingudes en la transformació per deleccionar el gen *BDH1* de la soca FY61.

Carril P: Marcadors de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).

Carril 1: Control de PCR sense DNA motlle.

Carril 2: Control d'amplificació del *locus BDH1* en la soca FY834.

Carril 3: Control d'amplificació del *locus BDH1* en la soca EG2.

Carrils 4 a 9: Clons 1 a 6 derivats de la soca FY61.

L'anàlisi dels clons que havien crescut en medi selectiu SMM sense triptòfan es va realitzar únicament per amplificació per PCR del *locus BDH1* cromosòmic tal i com ja s'ha descrit (Figura 37). Tots els clons analitzats van presentar una banda de 1580 pb corresponent al fragment de transformació (*TRP1* flanquejat per zones codificants del gen *BDH1*) igual al fragment present en la soca EG2 obtinguda anteriorment. La nova soca delecionada pel gen *BDH1* es va anomenar FY6160 (Annex, taula 23).

12. Estudi funcional de la Bdh1p. Paper en el metabolisme del 2,3-butanodiol de *Saccharomyces cerevisiae*.

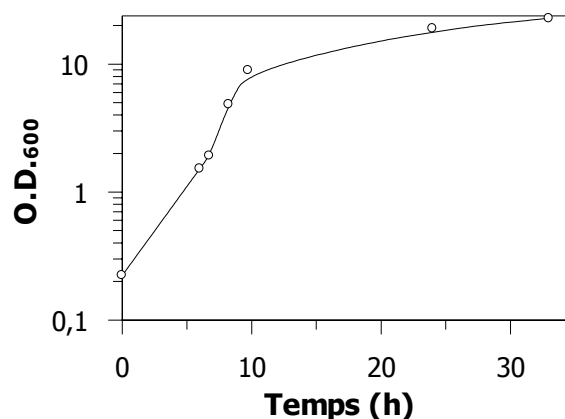
12.1 Expressió de la Bdh1p durant el creixement en medi ric i diferents fonts de carboni.

La soca silvestre FY834 es va créixer en diferents medis per estudiar el patró d'expressió de la Bdh1p. Es va seguir el creixement de la soca en les diferents condicions i es va determinar l'activitat específica d'extractes proteics (recollits en diferents punts de la corba de creixement) amb acetoïna.

12.1.1 Corba de creixement en glucosa al 2%. Determinació de l'activitat específica al llarg del temps.

La figura 38 mostra el creixement de la soca FY834 en medi YPD que conté un 2% de glucosa. Es distingeixen dues fases en el creixement; la fase de creixement exponencial (fins a una O.D.₆₀₀ d'aproximadament 10) que dura unes 12 hores i una fase estacionària que arriba a O.D.₆₀₀ ~ 33. Es va recollir mostra (100 unitats de O.D.₆₀₀) a les dues etapes de creixement amb la qual es va analitzar l'expressió de la Bdh1p calculant l'activitat específica i determinant-ne la inducció o repressió en gels d'isoelectroenfoc tenyit per activitat BDH (taula 13, Figura 39). A la taula 13 es defineix la fase de creixement per cada mostra (G1-G5) i la densitat òptica a la que es van recollir (segons les dades de la Figura 38), a més de l'activitat específica de la Bdh1p en cada etapa.

FIGURA 38: Corba de creixement de la soca de *S. cerevisiae* FY834 en medi YPD (glucosa 2%).



Taula 13

Activitat específica de la Bdh1p al llarg del creixement en medi YPD (glucosa 2%)

Fase de creixement	Mostra	O.D. ₆₀₀	Activitat específica (U/mg)
Exponencial	G1	1,95	0,05
Exponencial	G2	4,13	0,06
Exponencial	G3	8,65	0,09
Estacionària	G4	25,40	0,17
Estacionària	G5	33,88	0,16

Els valors d'activitat específica (mitja de duplicats) es van determinar amb acetoina 50 mM i NADH 0,2 mM en tampó fosfat de sodi 33 mM, pH 7,0.

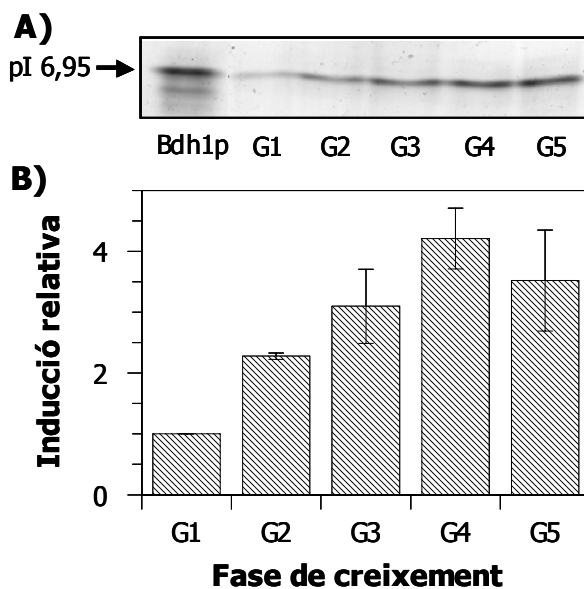


FIGURA 39: Expressió de la Bdh1p a diferents punts del creixement en medi YPD (glucosa 2%).

A) Isoelectroenfoc d'homogenats (100 µg proteïna) de cada etapa del creixement (G1-G5) tenyit per activitat BDH. El carril anomenat Bdh1p conté 0,35 unitats de l'enzim purificat.

B) Representació de la inducció de l'enzim Bdh1p respecte de l'etapa inicial G1. Els valors es van determinar per densitometria del gel d'isoelectroenfoc en un escàner GS700 (Bio-Rad) i són la mitja de tres cultius diferents.

L'enzim Bdh1p augmenta la seva expressió a mida que avança el creixement en medi YPD. D'un valor inicial de 0,05 U/mg d'activitat específica s'arriba a triplicar (x 3,4) la seva expressió (0,17 U/mg). Aquestes dades es confirmen en el gel d'isoelectroenfoc on es veu que les últimes etapes de creixement (G4 i G5) són les que presenten la banda de la Bdh1p més intensa, tal i com també ho indica l'anàlisi dels gels per densitometria.

12.1.2 Corba de creixement en etanol al 3%. Determinació de l'activitat específica al llarg del temps.

Per estudiar l'expressió de l'enzim en una font no fermentable es va utilitzar etanol al 3%. Es varen recollir mostres (100 unitats de O.D.₆₀₀) en diferents punts de la corba de creixement, determinant-se l'activitat específica de la Bdh1p dels extractes obtinguts.

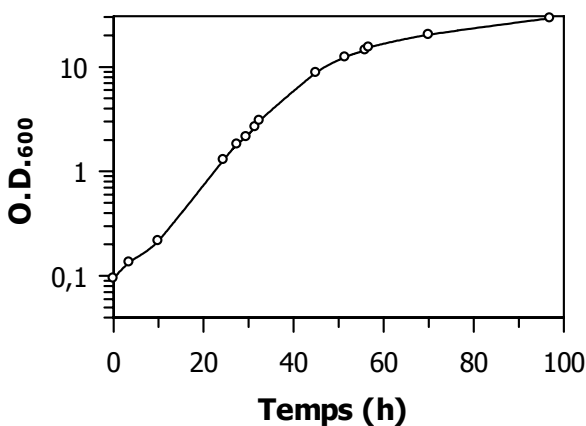


FIGURA 40: Corba de creixement de la soca de *S. cerevisiae* FY834 en etanol al 3%.

Taula 14

Activitat específica de la Bdh1p al llarg del creixement en etanol al 3%

Fase de creixement	Mostra	O.D. ₆₀₀	Activitat específica (U/mg)
Exponencial	E1	4,57	0,11
Exponencial	E2	9,54	0,12
Exponencial	E3	12,70	0,11
Estacionària	E4	19,69	0,11
Estacionària	E5	32,14	0,14

Els valors d'activitat específica (mitja de duplicats) es van determinar amb acetoina 50 mM i NADH 0,2 mM en tampó fosfat de sodi 33 mM, pH 7,0.

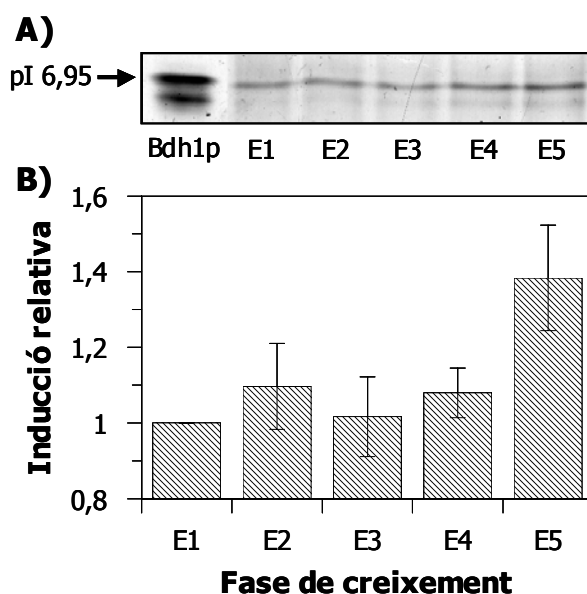


FIGURA 41: Expressió de la Bdh1p en la soca de *S. cerevisiae* FY834 en diferents temps del creixement en etanol al 3% com a font de carboni.

A) Isoelectroenfoque d'homogenats (100 μ g de proteïna) de cada etapa del creixement (E1-E5) tenyit per activitat BDH. El carril anomenat Bdh1p conté 0,35 unitats de l'enzim pur.

B) Representació de la inducció de l'enzim Bdh1p respecte de l'etapa inicial E1. Els valors es determinen per densitometria del gel d'isoelectroenfoque en un escaner GS700 (Bio-Rad) i són la mitja de tres cultius diferents.

Els nivells d'activitat Bdh1p es mantenen constants al llarg del creixement en etanol al 3% com a font de carboni (aproximadament 0,11 U/mg, taula 14). Aquestes dades es confirmen en el gel d'isoelectroenfoque on s'observa que la intensitat de la banda de la Bdh1p es manté constant al llarg de totes les etapes. L'anàlisi dels gels per densitometria també concorda amb els valors d'activitat.

La comparació de les activitats obtingudes respecte la mateixa soca FY834 crescuda en medi YPD indica que els valors que s'observen durant el creixement en etanol al 3% són 1,5 vegades inferiors al obtinguts en les dues últimes etapes del creixement en glucosa al 2% (0,11 U/mg *vs.* 0,17 U/mg), però 2,2 vegades superiors als obtinguts al principi del creixement en glucosa (0,11 U/mg *vs.* 0,05 U/mg). Aquests resultats poden indicar que l'absència de glucosa (etapes finals de creixement en medi YPD) desreprimeix l'expressió de l'enzim Bdh1p i llavors s'assoleixen valors similars a l'expressió obtinguda durant tot el creixement amb etanol.

12.1.3 Corba de creixement en glucosa al 20%. Determinació de l'activitat específica al llarg del temps.

Es va créixer la soca FY834 en presència d'alta concentració de glucosa (20%). Aquestes concentracions s'assoleixen en fermentacions vinícoles (revisió a Querol i cols., 2003) i en menor quantitat en fermentacions cerveseres (Boulton i Quain, 2001). En ambdós casos el 2,3-butanodiol és un producte minoritari de la fermentació i per això es va voler estudiar l'expressió de la Bdh1p en aquestes condicions.

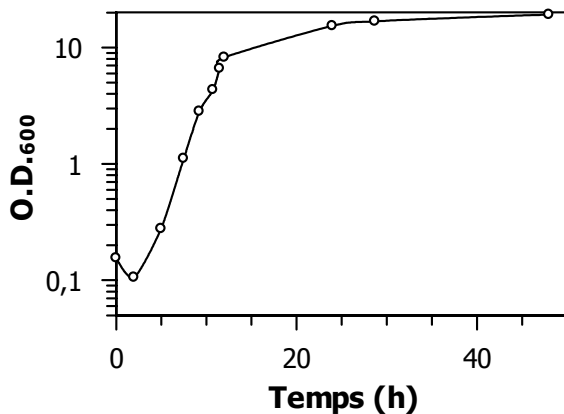


FIGURA 42: Corba de creixement de la soca de *S. cerevisiae* FY834 en glucosa al 20%.

Com en el cas de la glucosa al 2%, el creixement de la soca FY834 de *S. cerevisiae* en glucosa 20% presenta dues fases de creixement (Figura 42), la fase de creixement exponencial que arriba fins una O.D.₆₀₀ d'aproximadament 10 en 15 hores, i la fase estacionària on el creixement s'atura, i s'arriben a observar O.D.₆₀₀ d'aproximadament 22. Es van recollir mostres (100 unitats de O.D.₆₀₀) a les dues etapes en les quals es va analitzar la Bdh1p per activitat específica i per gels d'isoelectroenfoc tenyits per activitat BDH (Figura 43, Taula 15).

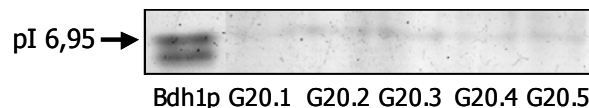


FIGURA 43: Expressió de la Bdh1p a diferents temps del creixement en glucosa al 20% com a font de carboni. Isoelectroenfoc d'homogenats (100 µg de proteïna) de cada etapa del creixement (G20.1-G20.5). El carril Bdh1p conté 0,35 unitats de l'enzim pur.

Taula 15**Activitat específica de la Bdh1p al llarg del creixement en glucosa al 20%**

Fase de creixement	Mostra	O.D. ₆₀₀	Activitat específica (U/mg)
Exponencial	G20.1	2,21	0,05
Exponencial	G20.2	4,47	0,08
Exponencial	G20.3	7,83	0,09
Estacionària	G20.4	13,09	0,07
Estacionària	G20.5	22,49	0,08

Els valors d'activitat específica (mitja de duplicats) es van determinar amb acetoina 50 mM i NADH 0,2 mM en tampó fosfat de sodi 33 mM, pH 7,0.

L'activitat Bdh1p es manté constant al llarg del creixement en medi amb glucosa 20% com a font de carboni (aproximadament 0,08 U/mg, Taula 15). Aquestes dades queden recolzades en el gel d'isoelectroenfoc on s'observa que la intensitat de la banda de la Bdh1p és poc intensa i es manté constant al llarg de totes les etapes. Els valors obtinguts durant el creixement en glucosa al 20% són similars als obtinguts en les primeres etapes de la soca crescuda en medi YPD (glucosa 2%) que varien de 0,05 a 0,09 U/mg. Aquests resultats suggereixen que la presència de glucosa al medi reprimeix l'expressió de l'enzim Bdh1p.

12.1.4 Concentració de glucosa present en el medi a diferents fases de creixement de la soca FY834, en els medis YPD i YP amb glucosa al 20%.

Durant el creixement de la soca FY834 en els medis YPD i YP amb glucosa al 20% es van recollir mostres on es va analitzar la concentració de glucosa present (Figura 44).

Es va comprovar que a mida que es produeix el creixement en medi YPD, la soca FY834 de *S. cerevisiae* consumeix ràpidament la glucosa i al final de la fase de creixement exponencial la seva concentració és indetectable.

En el cas del creixement amb glucosa al 20%, després de 31 hores de creixement encara hi havia glucosa al medi en una quantitat d'aproximadament 11 mg/ml. En aquest tipus de creixement, el llevat consumeix la major part de la glucosa quan ja es troba en fase estacionària, a diferència del creixement en medi YPD en que entra en aquesta fase quan ja s'ha consumit tota la glucosa.

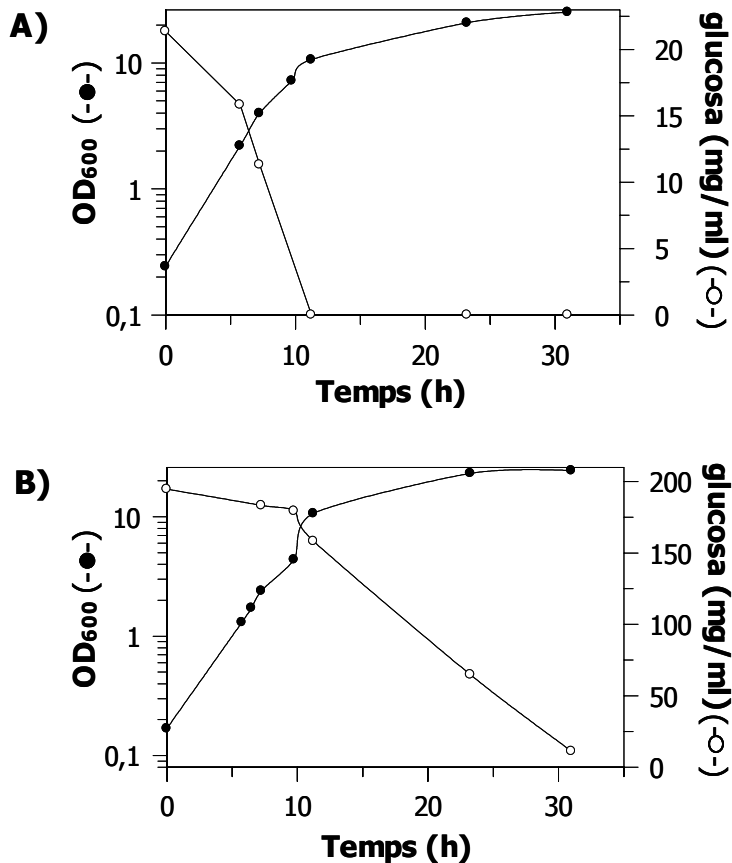


FIGURA 44: Determinació de la concentració de glucosa present al medi durant el creixement de la soca FY834 en els medis YPD i YP amb glucosa al 20%.
A) Medi YPD (glucosa 2%).
B) Medi YP amb glucosa al 20%.

12.1.5 Corbes de creixement amb diferents fonts de carboni. Expressió de la *Bdh1p* a diferents fases de creixement.

Es va créixer la soca FY834 en una base de medi YP als quals afegíem diferents fonts de carboni: glucosa al 2% i al 20%, galactosa al 2%, etanol al 3%, 2,3-butanodiol al 3% i acetat al 3% (Figura 45).

En la Figura 45 podem veure dos tipus de creixement, un de creixement exponencial més ràpid que correspon a l'ús de glucosa 2% i 20% i galactosa 2% com a fonts de carboni, i l'altre més lent. Amb glucosa i galactosa es manté el metabolisme fermentatiu típic del llevat, mentre amb la resta de compostos (etanol, 2,3-butanodiol i acetat) s'indueix el metabolisme respiratori i el creixement exponencial és més lent. Cal destacar que dels 3 compostos que utilitza el llevat respirant, només amb l'etanol s'assoleixen valors de densitat òptica comparables als valors obtinguts amb els diferents substrats fermentables (superiors a 20). L'acetat i el 2,3-butanodiol (mescla d'isòmers) són compostos que no són bones fonts de carboni doncs la densitat òptica a la qual arriben és molt baixa (per sota de 2) i el creixement molt lent.

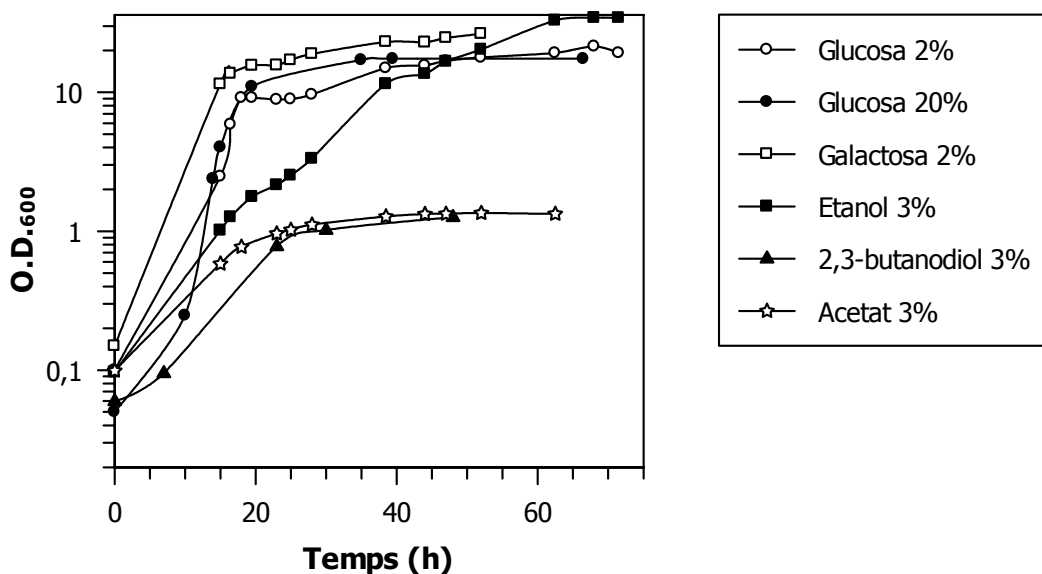


FIGURA 45: Creixement de la soca FY834 en medi ric (YP) utilitzant diferents compostos com a font de carboni.

Per mesurar els nivells de Bdh1p en els diferents cultius es van recollir 100 unitats de O.D. a cada etapa de creixement, i els homogenats es van analitzar mitjançant gels d'isoelectroenfoc tenyits per activitat BDH i quantificats per densitometria (Figura 46, Taula 16).

Taula 16

Expressió de la Bdh1p a les fases de creixement exponencial i estacionària en diferents fonts de carboni

Font de C	F. Exponencial	O.D. ₆₀₀	F. Estacionària	O.D. ₆₀₀
Glucosa 2%	G1	4,21	G2	20,21
Glucosa 20%	G20.1	4,02	G20.2	17,35
Galactosa 2%	GAL1	11,03	GAL2	29,15
Etanol 3%	E1	8,76	E2	24,08
2,3-butanodiol 3%	B1	0,62	B2	1,32
Acetat 3%	A1	0,65	A2	1,96

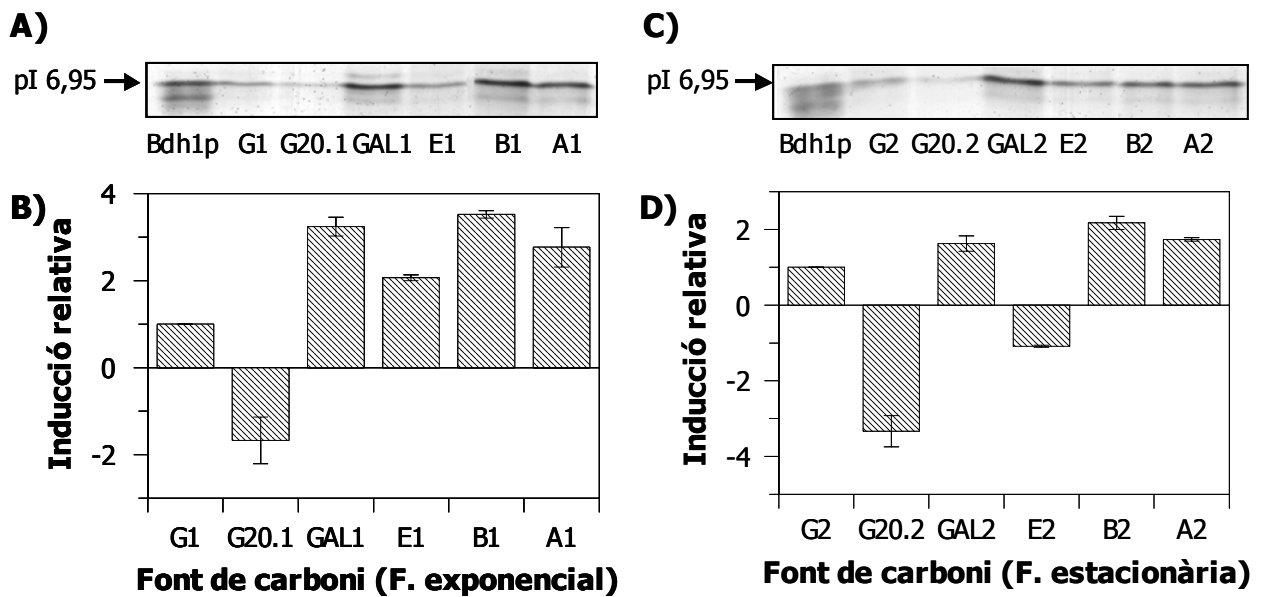


FIGURA 46: Expressió de la Bdh1p a la fase de creixement exponencial i a la fase estacionària del cultiu en medi YP, amb diferents fonts de carboni (taula 16).

A) Isoelectroenfoc d'homogenats (100 µg de proteïna) corresponent a cultius crescuts en diferents fonts de carboni fins a la fase exponencial. El carril Bdh1p conté 0,35 unitats de l'enzim pur.

B) Representació dels nivells relatius de Bdh1p en la fase exponencial dels diferents cultius respecte del cultiu crescut en glucosa al 2% (G1), determinats per densitometria del gel d'isoelectroenfoc. Els valors són la mitja de tres cultius diferents.

C) Isoelectroenfoc d'homogenats (100 µg de proteïna) corresponent a cultius crescuts en diferents fonts de carboni fins a fase estacionària. El carril Bdh1p conté 0,35 unitats de l'enzim pur.

D) Representació dels nivells relatius de Bdh1p en la fase de estacionària dels diferents cultius respecte al cultiu crescut en glucosa al 2% (G2), determinats per densitometria del gel d'isoelectroenfoc. Els valors són la mitja de tres cultius diferents.

Les gràfiques d'inducció relativa en les mostres preses durant la fase en creixement exponencial (Figura 46B), indiquen que totes aquelles fonts considerades respirables (com l'etanol) presenten una expressió més alta de la Bdh1p. El valor més alt es troba utilitzant 2,3-butanodiol i galactosa (superior a 3 vegades l'expressió en glucosa al 2%), seguit de l'etanol i l'acetat (entre 2 i 3).

En el cas de la fase estacionària s'observa una disminució de tres vegades en l'expressió de la Bdh1p en el creixement en glucosa al 20% respecte al creixement en glucosa al 2%, doncs en el cultiu amb glucosa al 20% l'expressió de la Bdh1p augmenta respecte a la fase exponencial, mentre que en glucosa al 20% l'expressió es manté constant.

En el cultiu amb etanol 3%, a fase estacionària es veu una lleugera disminució de l'expressió de la Bdh1p respecte del cultiu amb glucosa al 2% que concorda amb els resultats d'activitat específica obtinguts en l'apartat 121.1.2. Així, al mateix punt de

creixement, l'activitat amb glucosa al 2% és de 0,17 U/mg, mentre que amb etanol al 3% és de 0,11 U/mg (taules 13 i 14).

Finalment cal destacar que durant el creixement en galactosa al 2% la Bdh1p es troba fortament expressada, sobretot en la fase exponencial, on la inducció és de més de 3 vegades l'expressió mesurada en glucosa al 2%.

12.2 Producció de diferents estereoisòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoïna durant el creixement de les soques FY834, EG2, FY61, FY6160, FYA2 i EGA2 en medi YP amb glucosa al 20%.

Utilitzarem els mutants descrits a l'apartat 10 dels Resultats per determinar el paper dels diferents gens en la producció del 2,3-butanodiol i acetoïna durant la fermentació alcohòlica.

12.2.1 Corbes de creixement dels diferents mutants deletionats en medi YPD.

Es va analitzar el creixement al llarg del temps de les soques FY834, EG2, FY61, FY6160, FYA2 i EG2 en medi YPD per veure si la delecció dels diferents gens afectava el creixement en medi ric (Figura 47).

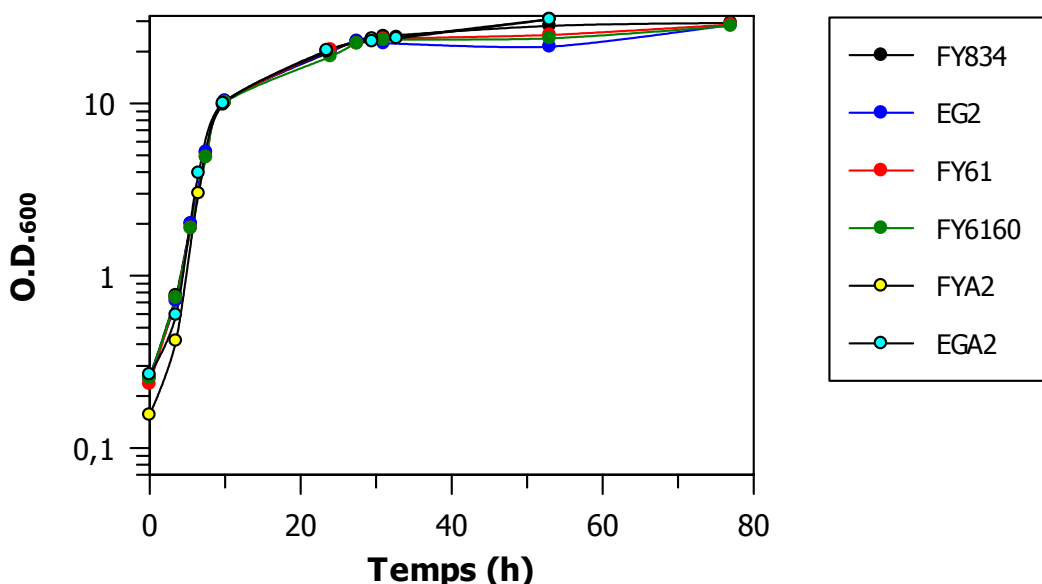


FIGURA 47: Creixement en medi YPD de les soques FY834, EG2, FY61, FY6160, FYA2 i EGA2.

No es va trobar cap diferència en el creixement de les diferents soques en medi YPD. A continuació es van recollir 100 unitats de O.D.600 a les fases de creixement

exponencial i estacionària, i se'n van determinar les activitats amb acetoïna i amb diacetil (Taula 17).

Taula 17
Activitats acetoïna reductasa (AR) i diacetil reductasa (DR)
dels homogenats de soques crescudes en medi YPD

Soca (Gens delecionats)	Fase de creixement	Activitat	Activitat específica (U/mg)
FY834	Exponencial	AR	0,072
		DR	0,054
	Estacionària	AR	0,159
		DR	0,120
EG2 (BDH1)	Exponencial	AR	0
		DR	0,023
	Estacionària	AR	0
		DR	0,049
FY61 (YAL061W)	Exponencial	AR	0,016
		DR	0,019
	Estacionària	AR	0,073
		DR	0,079
FY6160 (BDH1, YAL061W)	Exponencial	AR	0
		DR	0,016
	Estacionària	AR	0
		DR	0,035
FYA2 (ADH2)	Exponencial	AR	0,059
		DR	0,030
	Estacionària	AR	0,119
		DR	0,050
EGA2 (BDH1, ADH2)	Exponencial	AR	0
		DR	0,014
	Estacionària	AR	0
		DR	0,011

La fase de creixement exponencial correspon a valors de O.D.₆₀₀ de 3,5-5,5, mentre que la fase estacionària correspon als valors de 23,5-25,5.

Les activitats amb acetoïna (AR) i diacetil (DR) es varen determinar a 50 mM en tampó fosfat de sodi 33 mM pH 7,0 i NADH 0,2 mM.

Dels valors obtinguts se'n pot concloure el següent:

- Els valors de les activitats AR i DR es dupliquen a la fase estacionària respecte a la fase exponencial en la soca silvestre FY834.

- La deleció del gen *BDH1* comporta la pèrdua de l'activitat amb acetoïna i la pèrdua del 57% de l'activitat diacetil reductasa a la fase exponencial i del 40% a la fase estacionària.

- La deleció del gen *ADH2* comporta la pèrdua del 44% de l'activitat diacetil reductasa de la fase de creixement exponencial i del 58% a la fase estacionària.

- La doble deleció dels gens *BDH1* i *ADH2* eliminen l'activitat acetoïna reductasa i només es detecta un 25% de l'activitat amb diacetil a la fase exponencial i 9% a l'etapa estacionària.

- La deleció del gen *YAL061W* disminueix l'activitat amb acetoïna un 75% i amb diacetil un 65% a la fase exponencial. A la fase estacionària les activitats disminueixen un 54% amb acetoïna i un 34% amb diacetil.

- La doble deleció *YAL061W* i *BDH1* elimina l'activitat amb acetoïna i només queda un 29% de l'activitat amb diacetil a les dues etapes de creixement analitzades.

A partir d'aquestes dades podem dir que l'activitat acetoïna reductasa és exclusivament dependent del gen *BDH1*, perquè quan el delecionem ja no detectem l'activitat en els homogenats. En canvi, l'activitat diacetil reductasa present en els homogenats prové de la participació de tres enzims com a mínim, doncs en la soca delecionada per els gens *BDH1* i *ADH2* encara s'hi pot detectar activitat amb diacetil i NADH.

La deleció del gen *YAL061W* disminueix les activitats diacetil i acetoïna reductasa dels homogenats, però com que l'activitat acetoïna reductasa depèn únicament de la presència del gen *BDH1*, es suggereix que el gen *YAL061W* podria participar en la regulació de l'activitat del gen veí *BDH1*.

12.2.2 Corbes de creixement dels diferents mutants delecionats en medi ric amb glucosa al 20%.

La producció de 2,3-butanodiol va lligada a la reducció de l'acetoïna produïda per la piruvat descarboxilasa en condicions d'alta concentració d'acetaldehid (Chen i Jordan, 1984). Així, es va afegir un 20% de glucosa al medi per augmentar la producció d'acetaldehid i així afavorir la producció de 2,3-butanodiol i poder-ne realitzar un anàlisi cromatogràfic. Es va seguir el creixement de les diferents soques obtingudes en l'apartat 10, en medi ric amb glucosa al 20% (Figura 48) i es van recollir mostres per analitzar mitjançant CG-EM.

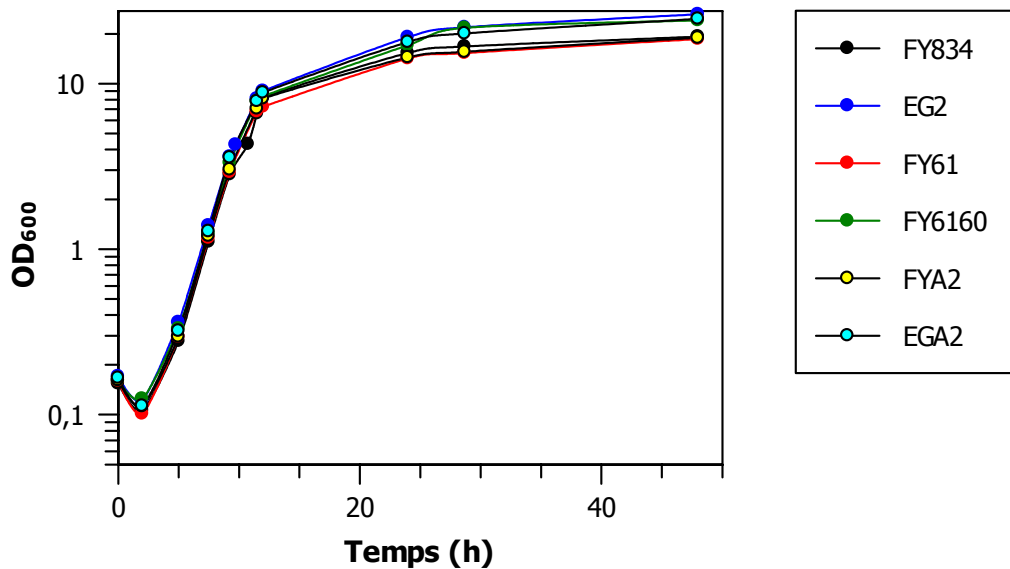


FIGURA 48: Creixement de les soques FY834, EG2, FY61, FY6160, FYA2 i EGA2 en medi ric (YP) amb glucosa al 20%.

Cap deleció afecta al creixement durant la fase exponencial i no en varia el seu temps de generació. Però, tot i que no sigui gaire gran, es detecta una diferència en la O.D.₆₀₀ final dels cultius a 48 hores, essent el màxim al voltant de 20 en les soques amb el gen *BDH1* intacte, i superior a 24 en aquelles que el presenten deletat.

12.2.3 Anàlisi mitjançant CG-EM dels isòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoïna produïts durant el creixement de les soques FY834 i EG2 en medi ric amb glucosa al 20%.

Les mostres del cultiu recollides a temps 10, 12, 24 i 48 h, es van analitzar per cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses, utilitzant una columna quiral que ens permetia separar els diferents isòmers dels compostos analitzats. Es van quantificar les àrees de cada pic obtingut en la cromatografia i el resultat es troba representat en la Figura 49.

S'observa a la figura que els diferents metabolits s'acumulen al llarg del temps. Respecte a l'acetoïna, la soca FY834 produeix els dos isòmers, essent el *R* la forma majoritària. A les 24 hores trobem l'acumulació màxima d'acetoïna en proporció 70,1% d'isòmer *R* i 29,9% d'isòmer *S*. Passat aquest temps, els nivells davallen perquè s'està utilitzant per formar 2,3-butanodiol (figura 49A, barres negres).

Dins del període de temps analitzat l'acumulació màxima de 2,3-butanodiol es troba a les 48 hores. Es comença a apreciar a 12 hores en molt baixa quantitat i només

es detecta l'isòmer (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol. A les 24 hores augmenta la quantitat i apareixen els altres dos isòmers, el (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol només en traces. A les 48 h hi ha un 80,7% de l'isòmer (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol, un 18,7% del *meso*-2,3-butanodiol i un 0,6% del (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol. El (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol es troba a 21,1 mM (aproximadament 1,9 g/l), semblant als valors que s'obtenen durant la producció de vi (Romano i cols., 1996) (figura 49B, barres negres).

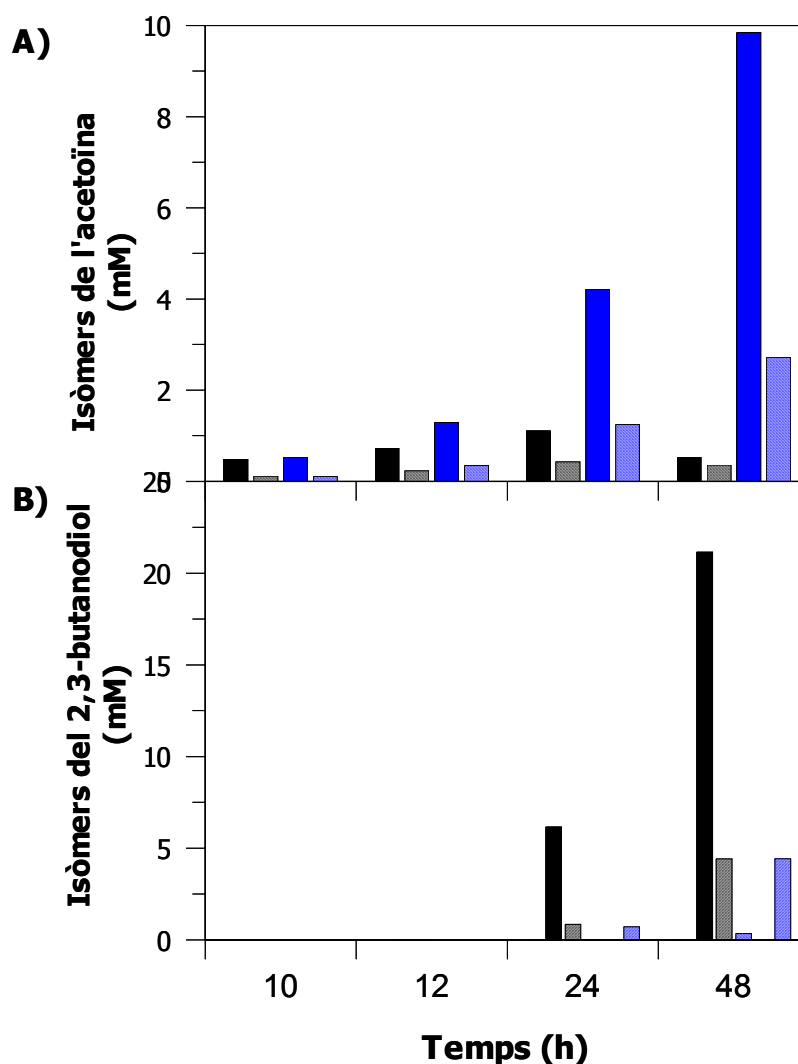


FIGURA 49: Anàlisi dels isòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoina, i dels nivells d'àcid acètic produïts durant el creixement de les soques FY834 (en negre) i EG2 (en blau) en medi YP amb glucosa al 20%. Es considera la fase de creixement exponencial fins les 10 hores, i l'estacionària a partir de les 12 hores de creixement.

A) Producció dels isòmers de l'acetoina al llarg del temps. - ■ - *R*-acetoina, - ▨ - *S*-acetoina.

B) Producció dels isòmers del 2,3-butanodiol al llarg del temps. - ■ - (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol, - ▨ - (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol, i - ▩ - *meso*-2,3-butanodiol.

La soca delecionada pel gen *BDH1* (soca EG2) presenta un comportament molt diferent al obtingut amb la soca silvestre respecte els metabolits estudiats. No es detecta l'isòmer (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol, indicant que la seva producció depèn de la presència del gen *BDH1*. L'isòmer *meso*-2,3-butanodiol es produeix al mateix nivell que en la soca silvestre i el (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol augmenta una mica la seva producció (figura 49B, barres blaves). En canvi, l'acetoïna es produeix en grans quantitats en la soca EG2. Hi ha una acumulació producció d'aproximadament 9,8 mM de l'isòmer *R*-acetoïna i de 2,7 mM de *S*-acetoïna, en una proporció de 78,4% i 21,6% respectivament.

12.2.4 Anàlisi mitjançant CG-EM dels isòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoïna produïts durant el creixement de les soques FY834, EG2, FY61, FY6160, FYA2 i EGA2 en medi YP amb glucosa al 20%.

Per aprofundir en l'estudi de la producció de 2,3 butanodiol durant la fermentació alcohòlica es va fer el mateix anàlisi que en l'apartat anterior amb la resta de soques que s'havien construït i que tenien delecionats diferents gens. En aquest cas només es va analitzar l'acumulació d'isòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoïna a les 48 h.

El resultat obtingut va ser el següent (Figura 50):

- Totes les soques que tenen el gen *BDH1* delecionat (EG2, FY6160 i EGA2) no acumulen (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol. La producció de 2,3-butanodiol en aquestes soques queda limitada als isòmers (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol i *meso*-2,3-butanodiol en la mateixa proporció que en les soques amb el gen intacte.

- Les soques amb el gen *BDH1* delecionat acumulen grans quantitats d'acetoïna. La proporció dels dos isòmers és d'aproximadament 75% de l'isòmer *R* i un 25% del *S*. Aquest patró és idèntic al que es va observar en els experiments anteriors de comparació de la soca silvestre FY834 i la EG2 (apartat 12.2.3 dels Resultats).

- Les soques FY61 i FYA2 presenten el mateix patró i concentració de metabolits que la soca silvestre FY834. Aquesta no acumula acetoïna, que es troba en poca quantitat respecte les soques delecionades pel gen *BDH1*, però acumula grans quantitats de 2,3-butanodiol. Per aquestes soques la proporció dels 3 isòmers és

d'aproximadament 81% de l'isòmer (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol, 18,5% de l'isòmer *meso*-2,3-butanodiol i 0,5% de l'isòmer (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol.

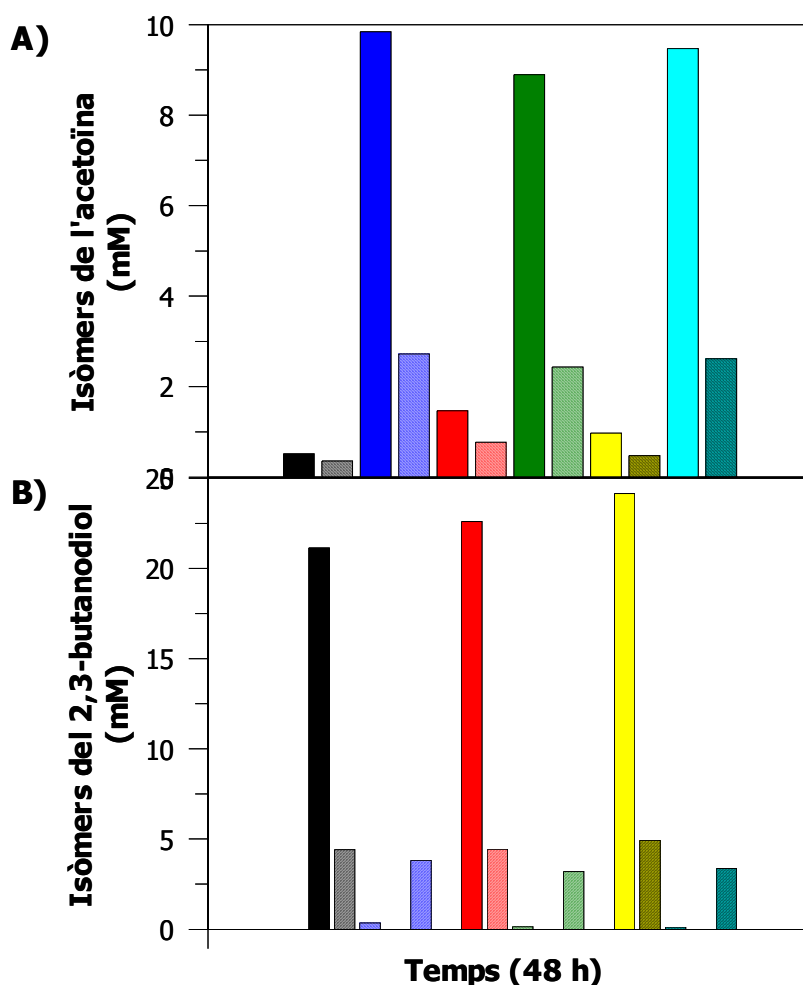


FIGURA 50: Anàlisi dels isòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoïna, i dels nivells d'àcid acètic produïts a les 48 h de creixement de les soques FY834 (negre), EG2 (blau), FY61 (vermell), FY6160 (verd), FYA2 (groc) i EGA2 (blau clar) en medi YP amb glucosa al 20%.

A) Isòmers de l'acetoïna. - ■ - *R*-acetoïna, - ▨ - *S*-acetoïna.

B) Isòmers del 2,3-butanodiol. - ■ - (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol, - ▨ - (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol, i - ▩ - *meso*-2,3-butanodiol.

- La deleció del gen *YAL061W* (soca FY6160) no afecta a l'acumulació dels compostos estudiats tot i que l'activitat Bdh1p en els homogenats sigui menor (apartat 12.2.1).

- La deleció del gen *ADH2* (FYA2) tampoc afecta la producció d'aquests metabolits. Ja vam demostrar que l'Adh2p no presenta activitat *in vitro* amb l'acetoïna. Els resultats de la Figura 50 indiquen que l'Adh2p tampoc pot reduir l'acetoïna *in vivo*.

- Les soques que porten les dobles delecions *YAL061W/BDH1* (FY6160) i *ADH2/BDH1* (EGA2) presenten el mateix patró d'acumulació de metabolits que la soca amb la deleció simple del gen *BDH1* (soca EG2).

13. Aplicacions biotecnològiques a la indústria cervesera I. Construcció de soques de laboratori i cerveseres que expressen la Bdh1p mitjançant vectors seleccionables per geneticina.

13.1 Sensibilitat de les soques de llevat S288C i SID als antibiòtics geneticina i pleomicina.

Es va determinar la sensibilitat als antibiòtics geneticina i pleomicina de les dues soques que es van utilitzar en aquests experiments. Per determinar la sensibilitat a geneticina es va créixer les dues soques en estria en medi YPD que contenia l'antibiòtic a diferents concentracions en placa: 50, 100, 150, 200 i 250 µg/ml. La soca de laboratori S288C era sensible a una concentració de 150 µg/ml de geneticina en el medi, així que es va decidir treballar a 200 µg/ml per assegurar que es seleccionaven els transformants correctament. La soca cervesera SID va resultar ser sensible a concentracions més baixes. Així, a 50 µg/ml de geneticina en el medi el creixement era gairebé inexistent. La concentració de treball es va fixar en 100 µg/ml de geneticina al medi.

Per la pleomicina només es va créixer la soca de llevat industrial SID en medi YPD que contenia diferents concentracions de l'antibiòtic: 50, 100, 150 i 200 µg/ml. La soca va ser sensible a totes les concentracions, així que es va decidir utilitzar la concentració de 100 µg/ml de pleomicina en el medi.

13.2 Construcció de diferents vectors d'expressió de llevat amb resistència a geneticina.

Les soques de llevat industrials són soques salvatges que no tenen cap dels marcadors de selecció usual de les soques de *S. cerevisiae* de laboratori. Per expressar la Bdh1p en la soca industrial SID es van haver de construir els vectors d'expressió que continguessin el marcador de selecció contra l'antibiòtic geneticina.

13.2.1 Construcció dels vectors *pRSMX* i *pRSMXY0*.

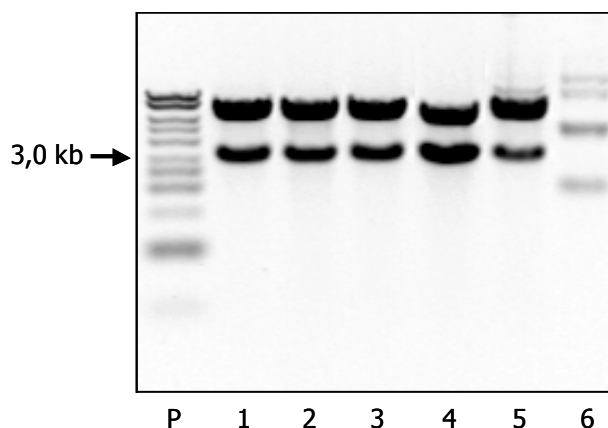
El vector *pRSMX* es va construir lligant el fragment *NoI* obtingut del vector *pFA6-kanMX4* al lloc de restricció *NoI* del vector *pRS316*. Posteriorment es van lligar linkers *HindIII* en el vector *pYES2-BDH1* digerit amb *EcoRI* i defosforilat. Després de comprovar que en el nou vector la digestió amb *HindIII* alliberava un fragment de DNA de 1149 pb, es va utilitzar aquesta banda per clonar-la en el vector *pAAH5* per l'únic lloc de clonatge *HindIII*. El nou vector es va anomenar *pAAY0*.

En el vector *pRSMX* es va subclonar el cassat d'expressió (constituït pel promotor *ADH1*, el gen *BDH1* i el terminador *ADH1*) alliberat del vector *pAAY0* per digestió del vector amb *BamHI*. Sis dels clons obtinguts es van analitzar per digestió amb *BamHI* que allibera dos fragments, un de ~3,0 kb del cassat d'expressió i un de ~6,5 kb de la resta del vector (Figura 51). Cinc clons van resultar ser positius i el nou vector es va anomenar *pRSMXY0*.

FIGURA 51: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,7% de les digestions enzimàtiques amb *BamHI* de 6 clons del vector *pRSMXY0*.

Carril P: Patrons de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).

Carrils 1-6: Digestió dels clons 1 a 6.



13.2.2 Construcció dels vectors *pAAMX* i *pAAYORMX*.

Per la construcció del vector *pAAYORMX* es van seguir dues etapes. Primer es va clonar el gen *BDH1* a partir del vector *pYES2-BDH1* per la doble digestió *KpnI/EcoRI*. El fragment de 1149 pb corresponent al gen es va subclonar per extrems roms al vector *pAAH5* digerit amb *HindIII* tractat de la mateixa manera i defosforilat. L'anàlisi dels transformants va resultar complex perquè el vector *pAAH5* no està seqüenciat. Deu transformants de la lligació es van analitzar en primer lloc per digestió amb *BamHI* que alliberava tot un fragment de ~3,0 kb (contenia el promotor *ADH1*, el gen *BDH1* i el terminador *ADH1*) (figura 52). El nou vector es va anomenar *pAAY0R*.

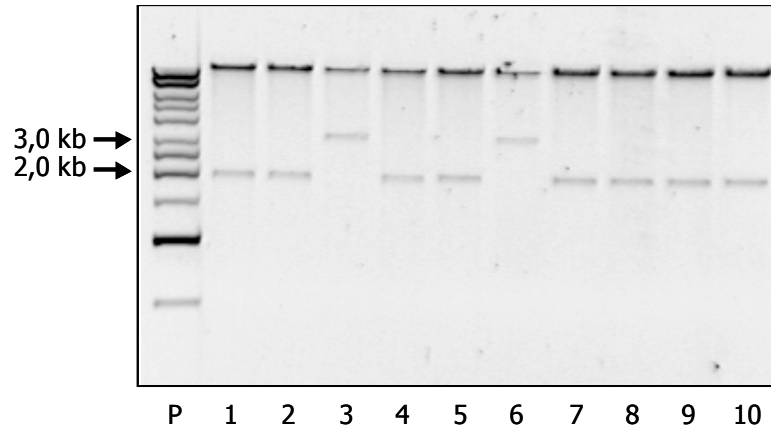


FIGURA 52: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,7% de les digestions enzimàtiques amb *Bam*HI dels clons pAAY0R.
 Carril P: Patrons de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).
 Carrils 1-10: Digestions dels clons 1-10.

Els dos clons positius 3 i 6 es van tornar a analitzar per trobar la orientació del gen *BDH1* en el vector. Es va realitzar una doble digestió *Bam*HI/*Xba*I dels dos clons i del vector original. El clon 3 presenta les bandes de 1158 i 995 pb (Figura 53) corresponents a la orientació correcta en el vector.

El clon 3 del possible vector pAAY0R es va digerir amb *Eco*RI per alliberar el marcador *LEU2*. Al seu lloc es va suclonar el casset d'expressió de la kanamicina (*kanMX4*) que provenia del fragment de digestió amb *Not*I del vector pFA6-*kanMX4* fet rom.

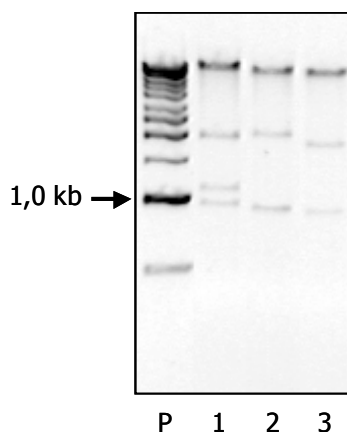


FIGURA 53: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,7% de les digestions enzimàtiques amb *Bam*HI/*Xba*I dels clons pAAH5-*BDH1* 3 i 6 i del vector pAAH5.
 Carril P: Patrons de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).
 Carril 1: Digestió del clon 3.
 Carril 2: Digestió del clon 6.
 Carril 3: Digestió del vector pAAH5.

13.2.3 Esquema dels nous vectors construïts.

L'esquema dels nous vectors es pot observar a la figura 54. Els derivats del vector pRS316 (centromèric) corresponen a les figures 54A i B, mentre que els derivats del vector pAAH5 (multicòpia) corresponen a les figures 54C i D.

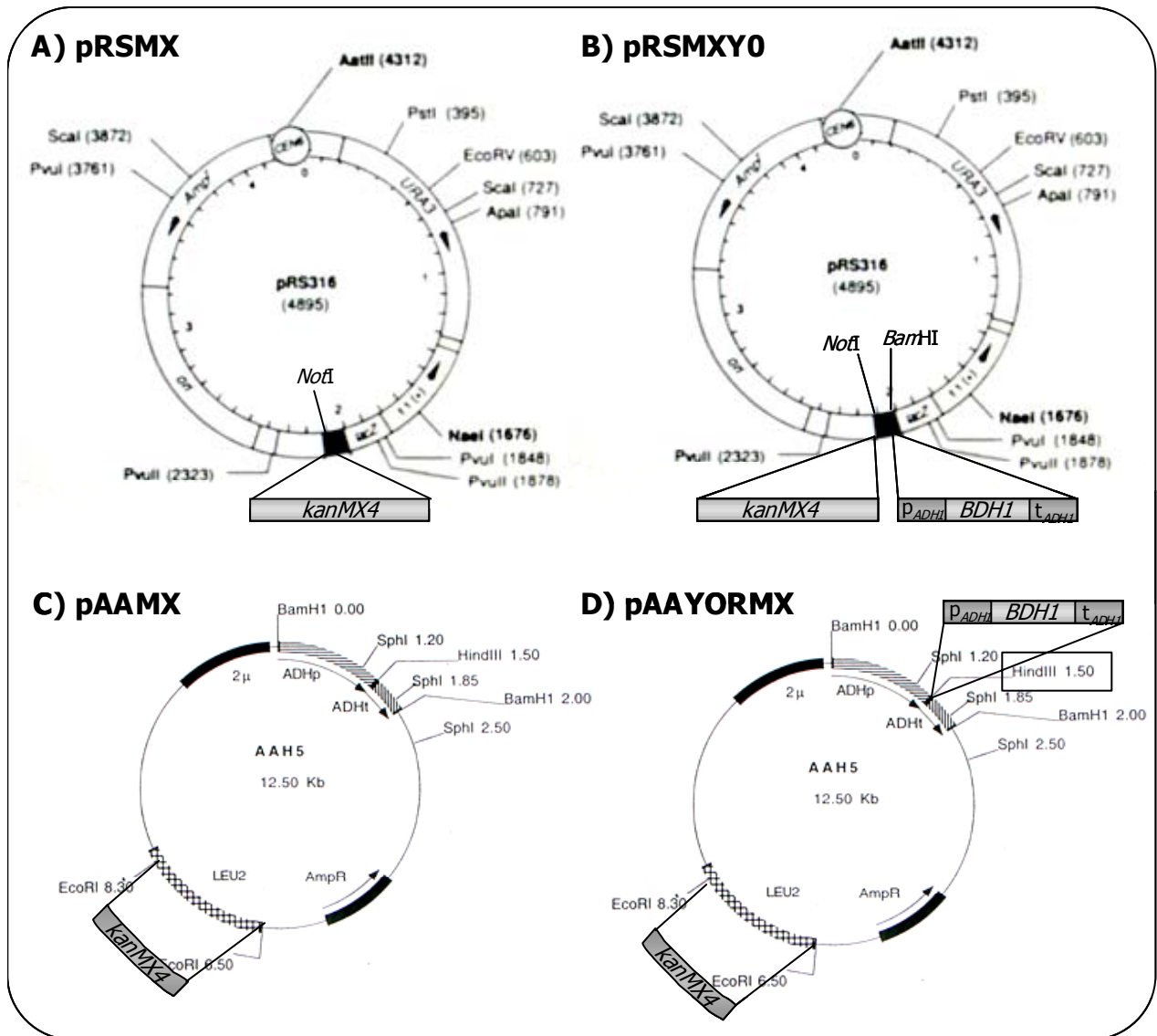


Figura 54: Esquema dels vectors construïts en els apartats 13.2.1 i 13.2.2 derivats dels vectors pRS316 (centromèric) i pAAH5 (multicòpia). A) vector pRSMX, B) vector pRSMXY0, C) vector pAAMX, i D) vector pAAYORMX.

13.3 Transformació de les soques de llevat S288C i SID amb els vectors d'expressió seleccionables per genètica. Determinació de les activitats específiques.

La soca de laboratori S288C es va transformar amb els vectors pRSMX i pRSMXY0, mentre que la soca industrial SID es va transformar amb els vectors pRSMX, pRSMXY0, pAAMX i pAAY0RMX. Les colònies individuals es van replaquejar en medi YPD amb genètica per purificar-les.

Les soques transformades amb els diferents vectors es van fer créixer fins a saturació en 10 ml de medi YPD i genètica. Les cèl·lules es van homogeneïtzar i es va determinar l'activitat Bdh1p (Taula 18) per quantificar el nivell d'expressió de la Bdh1p en les diferents soques.

Taula 18

Expressió de la Bdh1p en les soques S288C i SID mitjançant vectors d'expressió seleccionables per genètica

Soca	Activitat específica (U/mg)
S288C[pRSMX]	0,18
S288C[pRSMXY0]	8,33
SID[pRSMX]	0
SID[pRSMXY0]	1,82
SID[pAAMX]	0,01
SID[pAAY0RMX]	4,20

L'activitat es va mesurar amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol 120 mM i NAD⁺ 5 mM en tampó pirofosfat de sodi 33 mM pH 8,0.

L'expressió basal de la Bdh1p en la soca S288C era de 0,18 U/mg, mentre que en la soca industrial SID l'activitat no era identificable per sobre del soroll de fons que s'observava en afegir NAD⁺ en la cubeta de reacció.

L'activitat Bdh1p es va poder induir en les dues soques, però en la soca de llevat cerveser es va induir en menor proporció. Observant l'expressió amb el vector centromèric pRSMXY0, s'obté 4,5 vegades més activitat Bdh1p en la soca de laboratori S288C que en la industrial SID (8,33 U/mg *vs.* 1,82 U/mg). A més, en la soca SID l'expressió de la Bdh1p en el vector multicòpia pAAY0RMX és 2 vegades superior a l'expressió obtinguda amb el vector centromèric pRSMXY0.

13.4 Fermentacions amb most industrial de 15^oP amb la soca industrial SID transformada amb diferents vectors.

Per comprovar si la sobreexpressió de la Bdh1p tenia efecte en l'eliminació del diacetil, 2,3-pentanodiona i acetoïna durant la fermentació alcohòlica, es van realitzar diferents fermentacions amb les soques SID[pRSMX], SID[pRSMXY0] i SID[pAAY0RMX] (Figura 55).

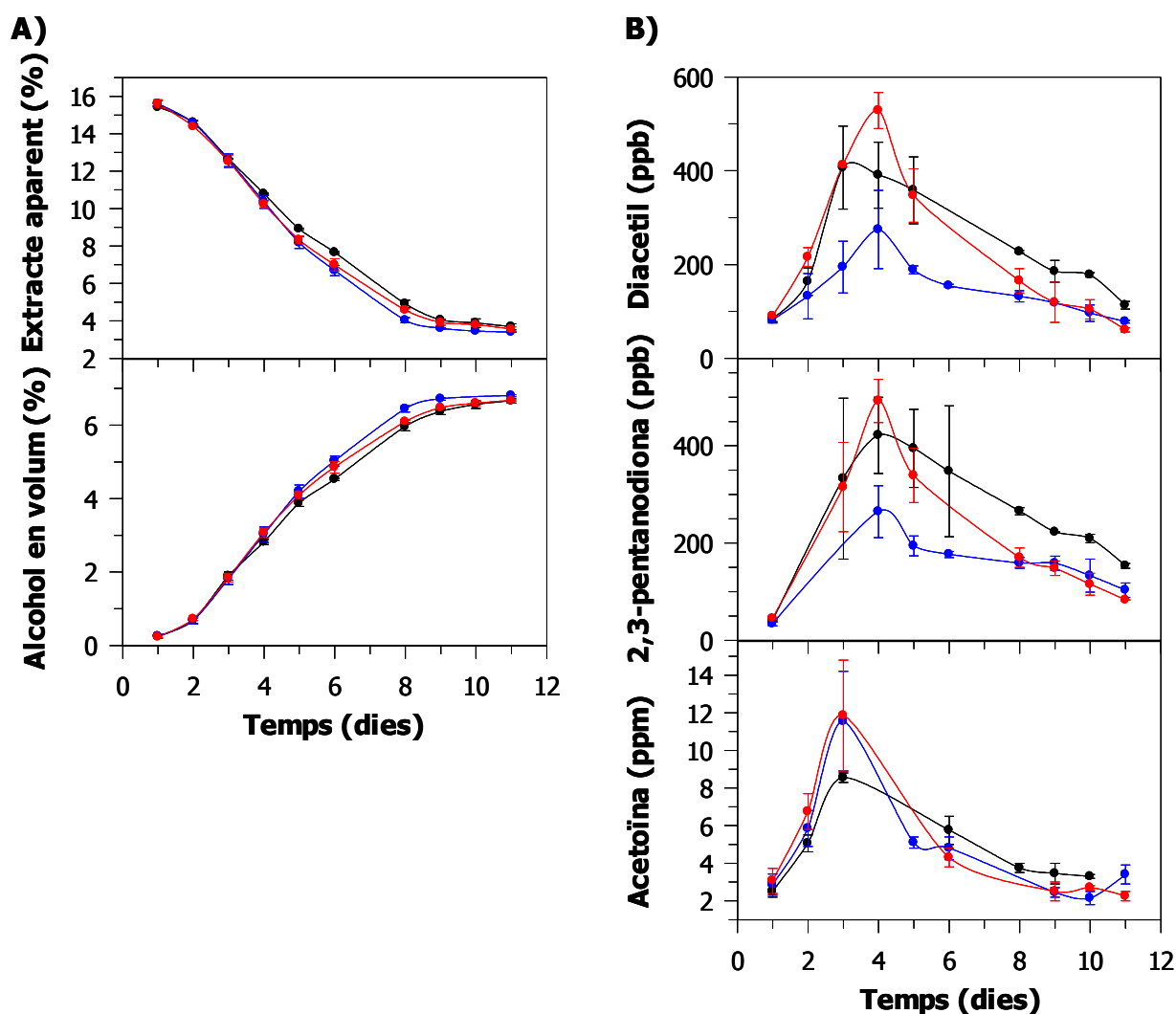


FIGURA 55: Anàlisi de diferents paràmetres durant la fermentació de most industrial de 15^oP en columnes de fermentació estàndard EBC amb les soques SID[pRSMX] (negre), SID[pRSMXY0] (blau) i SID[pAAY0RMX] (vermell). Es va realitzar un *t*-test (Sigma Plot 8.0) per tal de comprovar si hi havia diferències significatives entre les fermentacions de les diferents soques. Es van obtenir diferències significatives en la producció de diacetil per part de la soca SID[pRSMXY0] respecte la soca control SID[pRSMX].

A) Evolució de l'extracte aparent i de l'alcohol en volum durant la fermentació.

B) Evolució de la producció de diacetil, 2,3-pentanodiona i acetoïna per les tres soques al llarg de la fermentació. Els valors són la mitja \pm SD de les determinacions dels compostos en tres fermentacions independents.

A la figura 55A podem veure com evolucionava la fermentació al llarg de temps seguint dos paràmetres: l'extracte aparent i l'alcohol en volum. El primer ens indica la quantitat de sucres presents al medi, mentre que el segon ens quantifica l'alcohol produït pel llevat. Les tres soques no difereixen en cap dels dos paràmetres, obtenint-se una corba d'extracte aparent similar per a les tres que ens indica que la degradació de la glucosa i altres sucres és igual en les tres soques. Es pot dir que la fermentació evolucionava igual al llarg del temps, independentment que les soques expressessin o no la Bdh1p.

L'evolució de la producció de diacetil, 2,3-pentanodiona i acetoïna segueix una corba força característica (Figura 55B). Hi ha un augment de producció dels diferents compostos fins el dia 3-4 (segons el metabolit) seguit d'una disminució constant fins el final de la fermentació.

Es van trobar diferències entre les tres soques utilitzades per fermentar most, en la producció dels tres metabolits. Tant en la producció de diacetil com en la de 2,3-pentanodiona, la soca SID[pRSMXY0] va presentar nivells més baixos al llarg de tota la fermentació respecte de la soca control SID[pRSMX] ($p < 0,05$), essent els nivells finals també inferiors. En contrast, la soca SID[pAAY0RMX] presentava nivells alts durant la primera part de la fermentació, però durant els últims dies, els nivells dels dos compostos esdevenien inferiors a la soca control ($p > 0,05$) i quedaven al nivell de la soca SID[pRSMXY0]. Per tant, s'havia aconseguit disminuir els nivells de diacetil i de 2,3-pentanodiona durant la fermentació alcohòlica amb una soca de llevat industrial que sobreexpressava la Bdh1p mitjançant un vector.

La producció d'acetoïna va ser similar en les soques SID[pRSMXY0] i SID[pAAY0RMX]. En els primers dies de la fermentació la concentració d'acetoïna al medi va augmentar més en les soques que sobreexpressaven la Bdh1p que en la soca control SID[pRSMX], però els nivells finals que es van assolir van ser similars ($p > 0,05$) als de la soca control.

14. Aplicacions biotecnològiques a la indústria cervesera II. Integració del gen *BDH1* sota el control del promotor fort del gen *ADH1* en el genoma de les soques S288C i SID.

A l'apartat anterior s'havia documentat una disminució significativa dels nivells de diacetil i 2,3-pentanodiona durant la fermentació de most industrial amb la soca que portava el vector centromèric pRSMXY0 que sobreexpressava la Bdh1p. Això ens va fer plantejar en introduir de manera estable el casset d'expressió de l'enzim en el genoma del llevat.

En l'estudi anterior es creixien els cultius inicials en presència de l'antibiòtic geneticina, que no afegíem als cultius de 3 litres. En no utilitzar geneticina al llarg de les fermentacions ens arriscàvem a que es perdés el vector que sobreexpressava la Bdh1p al llarg del temps per no mantenir la selecció sobre ells. Per això es va decidir construir dos tipus de soques modificades genèticament: una soca derivada de la soca de laboratori S288C i una soca de llevat industrial derivada de la soca SID. La soca S288C i la seva derivada ens van servir de control del procés de modificació genètica, doncs la soca industrial SID no està caracteritzada genèticament i necessitàvem controlar els canvis que poguessin sorgir degut a les modificacions que es duguessin a terme.

14.1 Construcció de la soca modificada SCU60 derivada de la soca de laboratori S288C.

*14.1.1 Esquema de la integració del gen *BDH1* controlat pel promotor de l'*ADH1* en el genoma de la soca de *S. cerevisiae* S288C.*

Tant la modificació d'aquesta soca de laboratori (Figura 56) com la modificació de la soca de llevat industrial SID es van realitzar seguint una adaptació del protocol del sistema Cre-*loxP* descrit per Güldener i col·laboradors (1996).

El fragment amplificat del vector pUG6Y0 que contenia el casset d'expressió al costat del marcador *kanMX4* es va utilitzar per transformar la soca de *S. cerevisiae* S288C (Fig. 56). Els transformants es van seleccionar en medi amb geneticina.

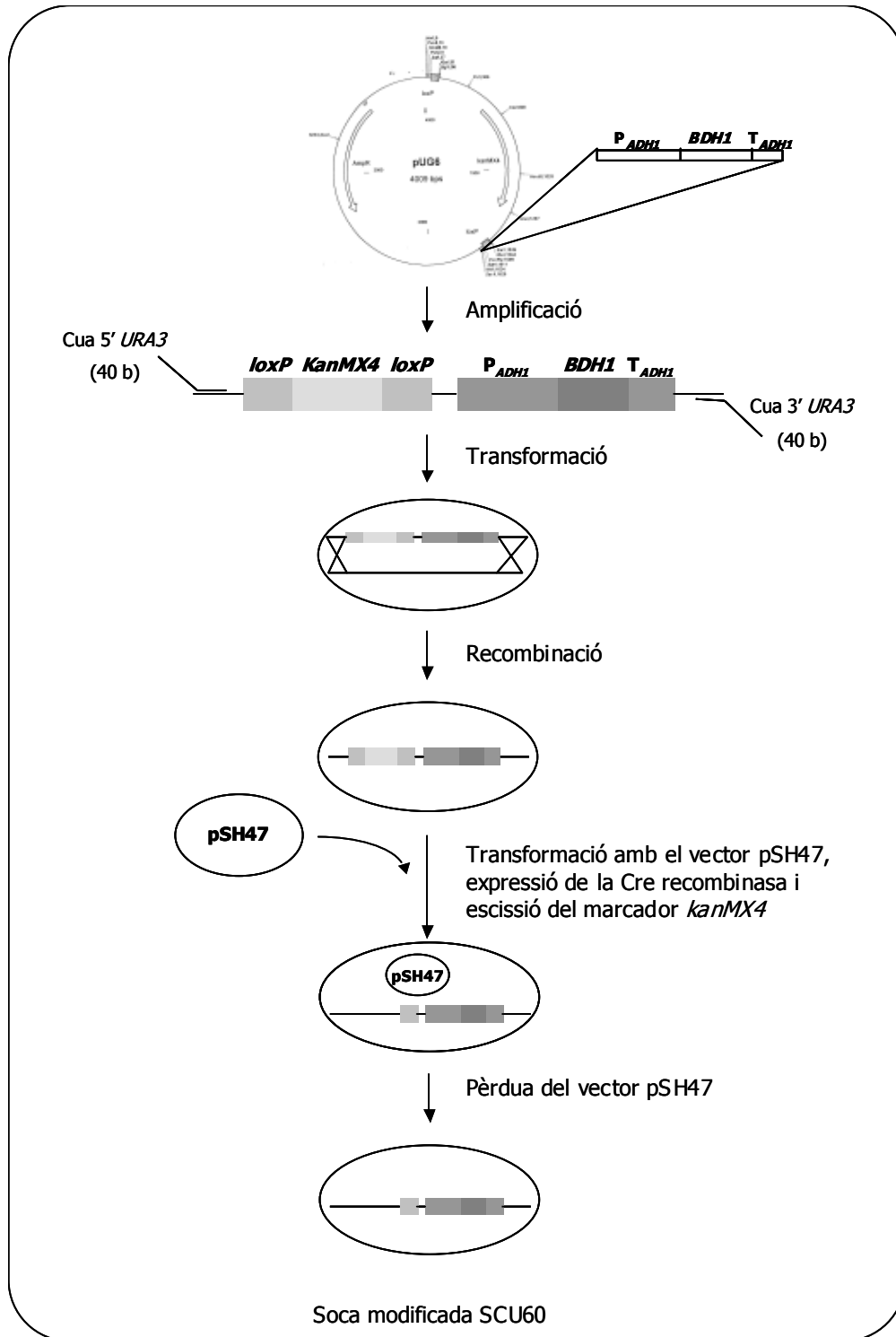


FIGURA 56: Esquema de l'estratègia seguida per modificar la soca de laboratori de *S. cerevisiae* S288C. Es parteix d'una seqüència de DNA amplificada a partir del vector pUG6Y0 que conté el marcador *kanMX4* flanquejat per les seqüències *loxP*. Aquest DNA serveix per transformar la soca S288C de llevat que, per recombinaçió homòloga, incorpora tot el fragment en el *locus URA3* que és on s'ha dirigit. Els nous clons, resistents a genètica, escindiran el marcador un cop es transformin amb el vector pSH47 i s'expressi la Cre recombinasa, enzim capaç d'eliminar fragments de DNA que es troben entre les seqüències *loxP*. Els nous clons sense marcador i sense vector seran els utilitzats per fer estudis de fermentació.

Els clons que havien recombinat es van transformar amb el vector pSH47 (seleccionable per uracil) en presència de galactosa per expressar la Cre recombinasa. Els diferents clons obtinguts en la transformació es van seleccionar de nou en medi amb geneticina per conèixer aquells que havien escindit el marcador flanquejat de les seqüències *loxP*.

Aquests nous clons es van forçar a créixer en medi selectiu amb uracil i 5-FOA per tal que perdessin el plasmidi pSH47 i així obtenir-ne els clons finals que sobreexpressaven la *Bdh1p* i no contenien el marcador *kanMX4* ni el vector pSH47.

14.1.2 Clonatge del casset d'expressió de la *Bdh1p* al vector *pUG6* i amplificació del mateix amb el marcador de selecció *kanMX4*.

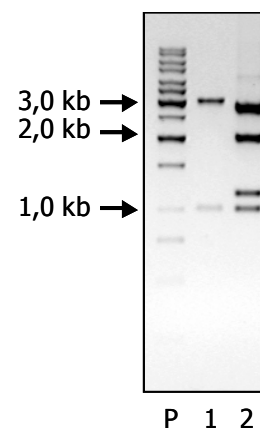
El casset d'expressió que provenia del vector pRSMXY0 es va digerir amb *Bam*HI i es van fer extrems roms per subclonar-lo al vector pUG6 digerit amb *Eco*RV i posteriorment defosforilat. Es van analitzar diferents clons obtinguts a la lligació per digestió amb *Hind*III. Els clons positius presentaven les bandes de 2900, 2100, 1149 i 1000 pb corresponents a la inserció del casset d'expressió en la orientació correcta (Figura 57). El nou vector es va anomenar pUG6Y0.

FIGURA 57: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,7% de les digestions enzimàtiques amb *Hind*III d'un clon positiu del vector pUG6Y0 i del vector pUG6.

Carril P: Patrons de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).

Carril 1: Digestió del vector pUG6.

Carril 2: Digestió del vector pUG6Y0.



A partir del nou vector es va amplificar per PCR el fragment que va servir per transformar la soca de llevat. Amb els oligonucleòtids URA-UG-5 i URA-UG-3 (homòlegs al vector i al terminador del gen *ADH1* en l'extrem 3' i homòlegs al gen *URA3* en l'extrem 5') i el sistema d'amplificació Expand Long Template System (Roche), es va amplificar un fragment de pes molecular d'aproximadament 5,0 kb (Figura 58).

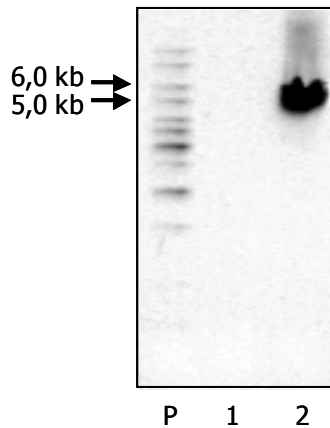


FIGURA 58: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,7% del producte d'amplificació per PCR del vector pUGY0 amb els oligonucleòtids URA-UG-5 i URA-UG-3.

Carril P: Patrons de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).

Carril 1: Control negatiu de l'amplificació: amplificació sense DNA motlle.

Carril 2: Producte d'amplificació del marcador *kanMX4* flanquejat per les seqüències *loxP* seguit del cassat d'expressió de la Bdh1p.

14.1.3 Transformació de la soca de *S. cerevisiae* S288C amb el fragment amplificat a partir del vector pUG6Y0 i anàlisi dels clons obtinguts.

Per transformació amb el fragment de DNA amplificat en l'apartat 13.1.2 es van obtenir moltes colònies individuals que havien incorporat el DNA per recombinació homòloga en el *locus URA3*. Es va obtenir DNA genòmic de diferents clons i es va amplificar la regió corresponent al *locus URA3* amb els oligonucleòtids URA3-5 i URA3-3 homòlegs a la zona codificant. A l'electroforesi de les soques modificades (Figura 59) es presenta una banda de ~5,5 Kb que correspon al fragment integrat en el gen *URA3* i desapareix la banda de 804 pb corresponent al gen silvestre present en la soca control S288C sense transformar. Les noves soques es van anomenar SCUK60.1, 2, 3,...

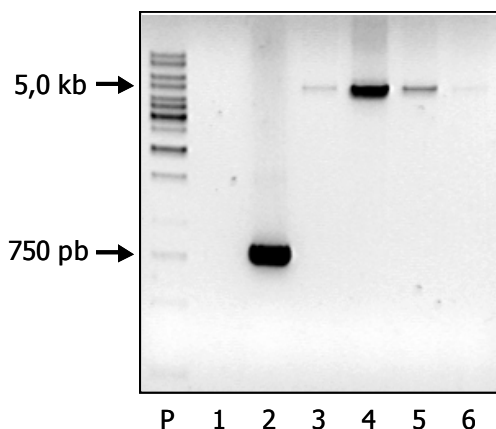


FIGURA 59: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,7% del producte d'amplificació per PCR amb els oligonucleòtids URA3-5 i URA3-3 del *locus URA3* on s'ha integrat el cassat d'expressió de la Bdh1p.

Carril P: Patrons de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).

Carril 1: Control negatiu de l'amplificació: amplificació sense DNA motlle.

Carril 2: Producte d'amplificació del *locus URA3* en la soca S288C sense modificar.

Carrils 3-6: Producte d'amplificació del *locus URA3* en els clons transformats 1 a 4.

Es va triar el clon 2 i es va determinar la seva activitat específica BDH així com el de la soca S288C (Taula 19).

Taula 19

Activitat específica BDH d'homogenats de les soques S288C i SCU60 crescudes en medi YPD, en fase exponencial

Soca	O.D. ₆₀₀	Activitat específica (U/mg)
S288C	5,50	0
SCUK60	4,25	1,86

L'activitat es va mesurar amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol 120 mM i NAD⁺ 5 mM en tampó pirofosfat de sodi 33 mM pH 8,0.

Es va demostrar que s'havia aconseguit sobreexpressar la Bdh1p integrant el casset d'expressió en el genoma del llevat. El valor de 1,86 U/mg obtingut és 4,5 vegades menor al que s'obtenia expressant la Bdh1p en el vector centromèric pRSMXY0 en la soca S288C (Taula 18).

14.1.4 Escissió del marcador de selecció *kanMX4* per expressió de la Cre recombinasa del bacteriòfag P1 en la soca SCU60.

Per escindir el marcador de selecció *kanMX4* es va transformar la soca SCU60 amb el vector pSH47 i els transformants es van créixer en medi sense uracil i amb galactosa 2% per induir l'expressió de la Cre recombinasa. Es va fer una rèplica de 40 clons diferents en medi YP amb galactosa 2% i YP amb galactosa 2% i geneticina 200 µg/ml. Dels clons que havien perdut el marcador de selecció se'n va extreure DNA genòmic. Amb el DNA obtingut es va amplificar el *locus URA3* de nou, amb els oligonucleòtids URA3-5 i URA3-3 (apartat 16.1.2 dels Materials i Mètodes). En aquest cas, tots els clons analitzats presentaven una banda d'aproximadament 4,0 kb que ja no tenia la seqüència del marcador (Figura 60).

Un dels clons positius per la escissió del marcador *kanMX4* es va créixer en medi mínim amb galactosa al 2%, uracil i 5-FOA per forçar-lo a perdre el vector pSH47. La soca obtinguda es va anomenar SCU60.

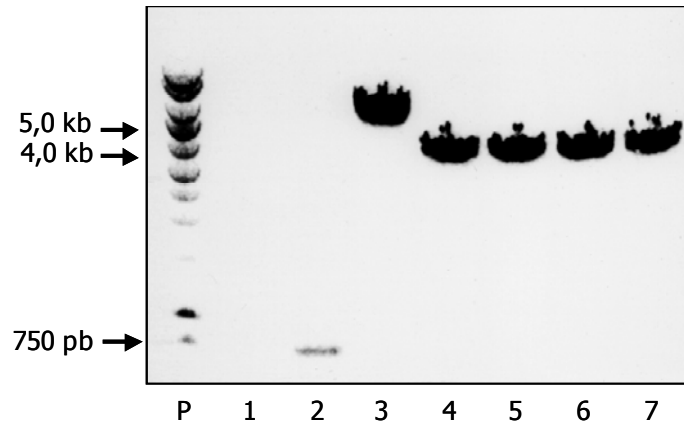


FIGURA 60: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,7% del producte d'amplificació per PCR amb els oligonucleòtids URA3-5 i URA3-3 del *locus URA3* on s'ha integrat el cassat d'expressió de la Bdh1p. Carril P: Patrons de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools). Carril 1: Control negatiu de l'amplificació: amplificació sense DNA motlle. Carril 2: Producte d'amplificació del *locus URA3* en la soca S288C sense modificar. Carril 3: Producte d'amplificació del *locus URA3* en la soca modificada SCUK60. Carrils 4-7: Producte d'amplificació del *locus URA3* en els clons 1 a 4 transformats amb el vector pSH47.

14.2 Construcció de la soca modificada SIDU60.4 derivada de la soca de llevat industrial SID.

14.2.1 Integració del gen *BDH1* controlat pel promotor de l'*ADH1* en el genoma de la soca de llevat industrial SID de *Saccharomyces carlsbergensis*.

En l'esquema de la figura 61, es parteix de la soca de *S. cerevisiae* SCUK60 ja modificada i amb el marcador de selecció *kanMX4*. Els primers passos del protocol, doncs, són iguals que en l'apartat 13.1.1. El DNA genòmic de la soca SCUK60 serveix de motlle per amplificar el marcador de selecció seguit del cassat d'expressió de la Bdh1p flanquejat per dues regions homòlogues a la zona codificant del gen *URA3*: 250 pb per l'extrem 5' i 201 pb per l'extrem 3'. Una vegada s'hagi integrat el cassat d'expressió al genoma de la soca cervesera SID, s'escindeix el marcador amb la Cre recombinasa de la mateixa manera que es va realitzar amb la soca de laboratori.

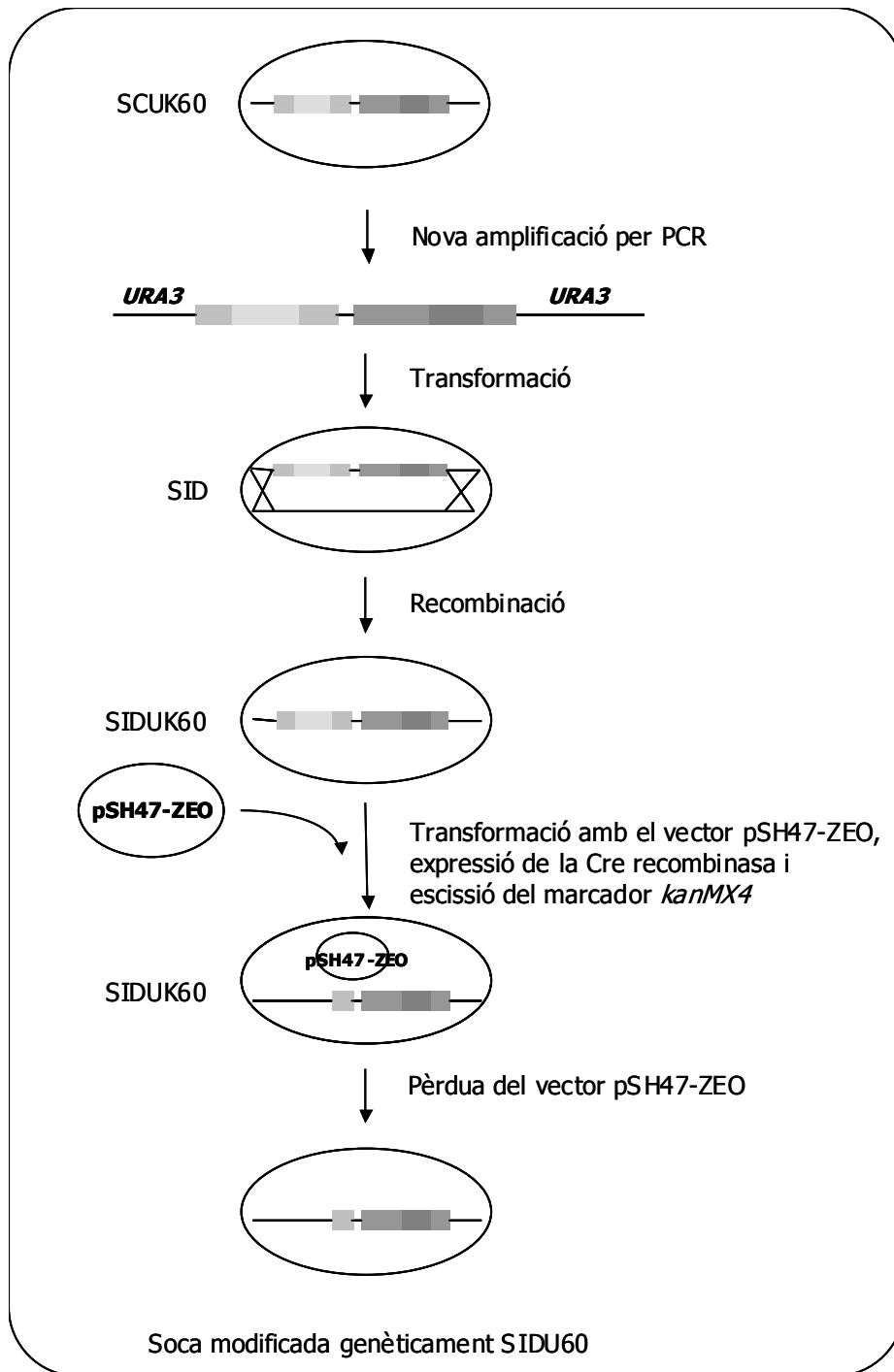


FIGURA 61: Esquema de l'estratègia seguida per modificar la soca de llevat industrial SID de *S. carlsbergensis*. A partir de DNA genòmic de la soca modificada de laboratori SCUK60 obtinguda en l'apartat 13.2 s'amplifica la regió codificant del *locus URA3* que conté el marcador de selecció i el casset d'expressió de la Bdh1p. Aquest DNA serveix per transformar la soca SID de llevat que, per recombinaçió homòloga, incorpora tot el fragment en un dels *locus URA3* que conté, doncs és una soca poliploide. Els nous clons, resistents a geneticina, escindiran el marcador un cop es transformin amb el vector pSH47-ZEO i s'expressi la Cre recombinasa capaç d'eliminar fragments de DNA que es troben entre les seqüències *loxP*. Els nous clons sense marcador i sense vector seran el utilitzats per fer estudis de fermentació.

14.2.2 Amplificació per PCR del mòdul d'expressió de la *Bdh1p* i de la *kanamicina* flanquejada per les seqüències *loxP* i transformació de la soca industrial *SID*.

Es va obtenir el DNA transformant de ~5,0 kb per amplificació del *locus URA3* utilitzant DNA genòmic de la soca de laboratori modificada SCUK60 (Figura 62). El DNA obtingut es va utilitzar per transformar la soca *SID* obtenint-se únicament 7 clons.

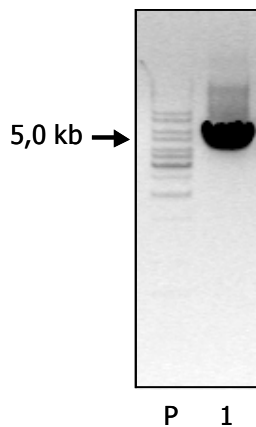


FIGURA 62: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,7% del producte d'amplificació del *locus URA3* amb el casset d'expressió de la *Bdh1p* i el marcadador *kanMX4* amb els oligonucleòtids *URA3-5* i *URA3-3*.
Carril P: Patrons de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).
Carril 1: Producte d'amplificació del *locus URA3* en la soca SCUK60.

14.2.3 Anàlisi de les noves soques de llevat modificades.

Es van analitzar 5 dels clons de la soca *SID* modificada que vam anomenar *SIDUK60.1*, *2*, *3*... Es va realitzar la mateixa PCR que en l'apartat anterior a partir DNA genòmic dels diferents clons i de la soca control sense modificar (Figura 63). Només els clons *SIDUK60.1* i *SIDUK60.4* presentaven la banda de ~5,0 kb que corresponia a un *locus URA3* modificat amb el marcadore de selecció i amb el casset d'expressió de la *Bdh1p*.

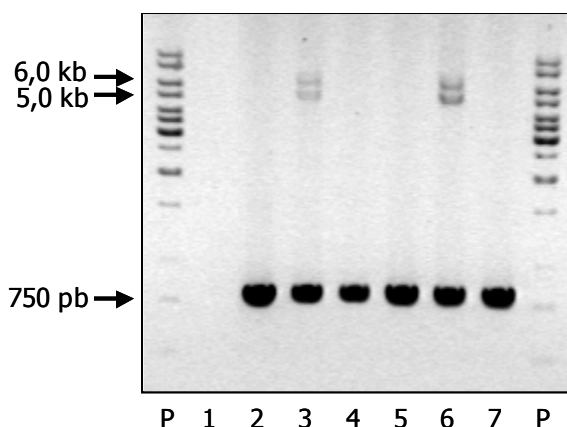


FIGURA 63: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,7% del producte d'amplificació del *locus URA3* amb els oligonucleòtids *URA3-5* i *URA3-3* del clons transformats.
Carrils P: Patrons de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).
Carril 1: Control negatiu de l'amplificació: amplificació sense DNA motlle.
Carril 2: Producte d'amplificació del *locus URA3* en la soca *SID* sense modificar.
Carrils 3-7: Producte d'amplificació del *locus URA3* en els clons transformats 1 a 5.

A més de la comprovació per PCR, es va determinar l'activitat específica BDH d'homogenats dels mateixos clons a la fase exponencial del seu creixement en medi YPD (taula 20).

Taula 20

Activitat específica BDH de les soques SID i dels diferents clons SIDUK60 crescudes en medi YPD en fase exponencial

Soca	O.D. ₆₀₀	Activitat específica (U/mg)
SID	4,06	0
SIDUK60.1	4,47	0,115
SIDUK60.2	1,83	0,045
SIDUK60.3	4,86	0,006
SIDUK60.4	4,12	0,171
SIDUK60.5	3,79	0,206

L'activitat es va mesurar amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol 120 mM i NAD⁺ 5 mM en tampó pirofosfat de sodi 33 mM pH 8,0.

En els clons 1, 4 i 5 detectàvem activitat BDH en comparació amb la soca control, en la qual no se'n va detectar. Malgrat això, la integració del casset d'expressió en el genoma del llevat resulta en nivells d'expressió més baixos que els obtinguts durant l'expressió de la Bdh1p amb els diferents vectors. Comparant les taules 18 i 20 es pot comprovar que l'expressió de la Bdh1p en la soca SID és de 1,82 U/mg quan s'expressa en el vector pRSMXY0 i de 4,20 U/mg en el pAAY0RMX, mentre que en integrar-la al genoma disminueix a 0,171 U/mg (clon SIDUK60.4) o 0,206 U/mg (clon SIDUK60.5), que representa una disminució de 10 a 20 vegades respecte l'expressió en vectors.

Es van triar els clons positius 1 i 4 per continuar amb el protocol de modificació genètica.

14.2.4 Escissió del marcador de selecció kanMX4 per expressió de la Cre recombinasa del bacteriòfag P1 en les soques SIDUK60.1 i SIDUK60.4.

Els clons SIDUK60.1 i SIDUK60.4 es van transformar amb el vector pSH47-ZEO (cedit per la Dra. Dequin). Després d'obtenir diferents clons que havien perdut la resistència a la genètica se'n va analitzar l'activitat específica BDH (Taula 21), i es va comprovar la pèrdua del marcador de selecció *kanMX4* (~1,5 kb) (Figura 64) mitjançant l'amplificació del *locus URA3*.

Taula 21

Activitat específica BDH de les soques SID i dels diferents clons SIDU60 crescudes en medi YPD en fase exponencial

Soca	O.D. ₆₀₀	Activitat específica (U/mg)
SID	5,41	0,012
SIDUK60.1	5,29	0,096
SIDU60.1.5	4,80	0,091
SIDU60.1.8	5,33	0,074
SIDU60.1.9	4,34	0,126
SIDU60.1.14	4,87	0,123
SIDUK60.4	8,26	0,115
SIDU60.4.2	4,26	0,144
SIDU60.4.10	3,19	0,119
SIDU60.4.19	3,49	0,168
SIDU60.4.22	3,62	0,243

L'activitat es va mesurar amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol 120 mM i NAD⁺ 5 mM en tampó pirofosfat de sodi 33 mM pH 8,0.

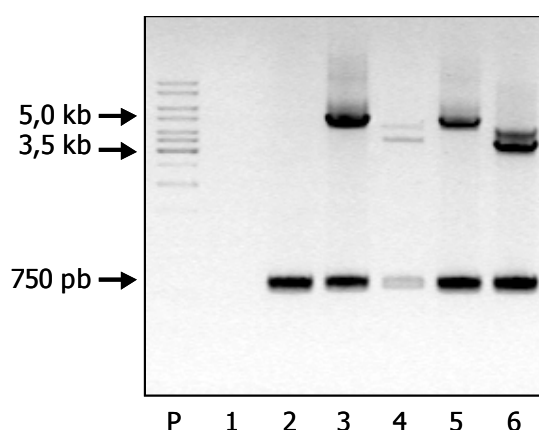


FIGURA 64: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,7% del producte d'amplificació del *locus URA3* amb els oligonucleòtids URA3-5 i URA3-3 dels diferents clons modificats genèticament i que han escindit el marcador *kanMX4* mitjançant la Cre recombinasa.

Carril P: Patrons de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).

Carril 1: Control negatiu de l'amplificació: amplificació sense DNA motlle.

Carril 2: Producte d'amplificació del *locus URA3* en la soca SID sense modificar.

Carril 3: Producte d'amplificació del *locus URA3* en la soca SIDUK60.1.

Carril 4: Producte d'amplificació del *locus URA3* en la soca SIDU60.1.9.

Carril 5: Producte d'amplificació del *locus URA3* en la soca SIDUK60.4.

Carril 6: Producte d'amplificació del *locus URA3* en la soca SIDU60.4.22.

Les activitats específiques obtingudes en les noves soques modificades són similars a les obtingudes abans d'escindir el marcador de selecció *kanMX4*. De tots els clons analitzats els clons SIDU60.1.9 i SIDU60.4.22 són els que presentaven una

activitat específica més elevada. En analitzar per PCR el *locus URA3* s'observà que havien perdut el marcador, doncs amplificant amb oligonucleòtids homòlegs a la regió codificant del gen *URA3* s'obtenia una banda de 3,5 enlloc de la banda de 5,0 kb de les soques sense transformar amb el vector (Figura 64).

Es va escollir el clon SIDU60.4.22 (que vam anomenar SIDU60.4) amb el qual es van realitzar les diferents fermentacions amb most industrial. Es va realitzar una última comprovació per PCR (figura 65) que a l'hora va servir per poder seqüenciar tot el fragment integrat en el *locus URA3*.

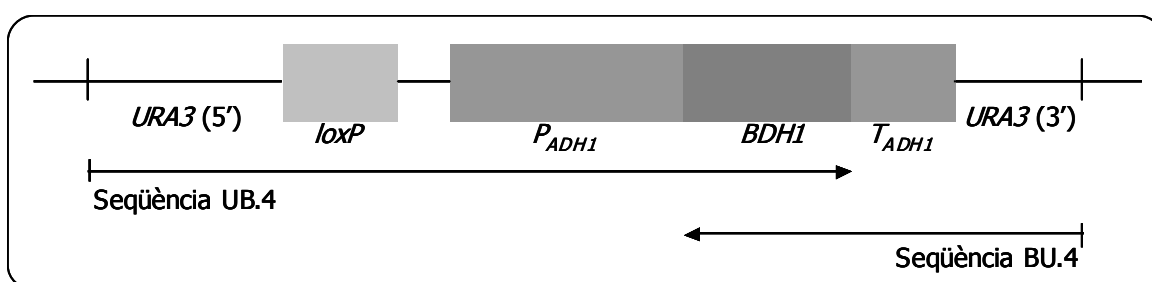


FIGURA 65: Esquema que representa com queda integrat el cassat d'expressió de la Bdh1 dins d'un *locus URA3* de la soca de llevat SID. Dins de la zona codificant del gen *URA3* trobem de 5' a 3' les següents seqüències: una regió 5' del gen *URA3*, una seqüència *loxP* seguida del promotor del gen *ADH1*. A continuació hi ha la seqüència del gen *BDH1* i el terminador del gen *ADH1*. Aquesta seqüència enllaça amb la zona codificant 3' del gen *URA3*. També hi ha indicades les dues regions amplificades i que es van seqüenciar per verificar l'estructura del fragment integrat.

A partir de DNA genòmic de la soca SIDU60.4 es va amplificar la regió que abarcava l'extrem 5' del gen *URA3* fins l'extrem 3' del gen *BDH1* (regió UB.4, de 2953 pb) i una altra regió que contenia l'extrem 5' del gen *BDH1* fins l'extrem 3' del gen *URA3* (regió BU.4, de 1711 pb) (Figura 66).

FIGURA 66: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,7% del producte d'amplificació de les regions UB.4 i BU.4 en la soca SIDU60.4.

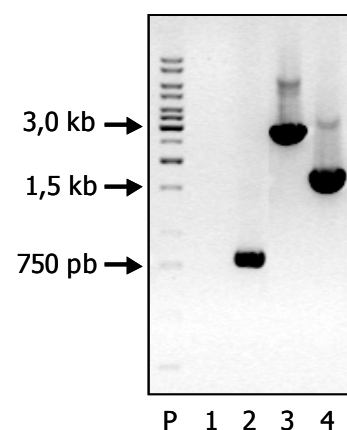
Carril P: Patrons de pes molecular 1 kb Ladder (Biotools).

Carril 1: Control negatiu de l'amplificació: amplificació sense DNA motlle.

Carril 2: Producte d'amplificació del *locus URA3* en la soca SID sense modificar.

Carril 3: Amplificació de la regió UB.4 en la soca SIDU60.4.

Carril 4: Amplificació de la regió BU.4 en la soca SIDU60.4.



Resultats

GCTGCTACTCATCCTAGTCCTGTTGCTGCCAAGCTATTTAATATCATGCACGAAAAGCAAACAAAC 66
 A A T H P S P V A A K L F N I M H E K Q T N

TTGTGTGCTTCATTGGATGTTTCGTACCACCAAGGAATTACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAGGTCCC 132
 L C A S L D V R T T K E L L E L V E A L G P

AAAATTTGTTTACTAAAAACACATGTGGATATCTTGACTGATTTTTCCATGGAGGGCACAGTTAAG 198
 K I C L L K T H V D I L T D F S M E G T V K

CCGCTAAGGCATTATCCGCCAAGT GCTTCGTACGCTGCAGGTCGACAACCCTTAATATAACTTCG 264
 P L R H Y P P S

TATAATGTATGCTATAACGAAGTTATTAGGTGATGATCCGGGATCGAAGAAATGATGGTAAATGAAA 330
loxP *P_{ADH1}*

TAGGAAATCAAGGAGCATGAAGGCCAAAAGACAAATATAAGGGTCGAACGAAAAATAAAGTGAAAAAG 396
P_{ADH1}

TGTTGATATGATGATATTTGGCTTTGCGGCGCCGAAAAACGAGTTTACGCAATTGCACAATCATGC 462
P_{ADH1}

TGACTCTGTGGCGGACCCGCGCTCTTGCCGGCCCCGGCGATAACGCTGGGCGTGAGGCTGTGCCCGG 528
P_{ADH1}

CGGAGCTTTTTGCGCCTGCATTTTCCAAGTTTACCCTGCGCTAAGGGGCGAGATTGGAGAAGCAA 594
P_{ADH1}

TAAGAATGCCGGTTGGGGTTGCGATGATGACGACCACGACAACCTGGTGTCAATTATTTAAGTTGCCG 660
P_{ADH1}

AAAGAACCTGAGTGCATTTGCAACATGAGTATACTAGAAGAATGAGCCAAGACTTGCGAGACGCGA 726
P_{ADH1}

GTTTGCCGGTGGTGCGAACAATAGAGCGACCATTGACCTTGAAGGTGAGACGCGCATAACCGCTAGA 792
P_{ADH1}

GTACTTTGAAGAGGAAACAGCAATAGGGTTGCTACCAGTATAAATAGACAGGTACATACAACACTG 858
P_{ADH1}

GAAATGGTTGTCTGTTTGAGTACGCTTTCAATTCATTTGGGTGTGCACTTTATTTATGTTACAATAT 924
P_{ADH1}

GGAAGGGAACCTTTACACTTCTCCTATGCACATATATTAATTTAAAGTCCAATGCTAGTAGAGAAGGG 990
P_{ADH1}

GGGTAACACCCCTCCGCGCTCTTTTCCGATTTTTTTCTAAACCGTGGAATATTTCCGGATATCCTTT 1056
P_{ADH1}

TGTTGTTTCCGGGTGTACAATATGGACTTCTCTTTTCTGGCAACCAAACCCATACATCGGGATTC 1122
P_{ADH1}

CTATAATACCTTCGTTGGTCTCCCTAACATGTAGGTGGCGGAGGGGAGATATAACAATAGAACAGAT 1188
P_{ADH1}

ACCAGACAAGACATAATGGGCTAAACAAGACTACACCAATTACACTGCCTCATTTGATGGTGGTACA 1254
P_{ADH1}

TAACGAACATAACTGTAGCCCTAGACTTGATAGCCATCATCATATCGAAGTTTCACTACCCCTTTT 1320
P_{ADH1}

TCCATTTGCCATCTATTGAAGTAATAATAGGCGCATGCAACTTCTTTTCTTTTTTTTTCTTTTCTC 1386
P_{ADH1}

TCTCCCCCGTTGTTGTCTCACCATATCCGCAATGACAAAAAATGATGGAAGACACTAAAGGAAAA 1452
P_{ADH1}

AATTAACGACAAAGACAGCACCAACAGATGTCGTTGTTCCAGAGCTGATGAGGGGTATCTCGAAGC 1518
P_{ADH1}

ACACGAAACTTTTTTCTTCCCTTTCATTACGCACACTACTCTCTAATGAGCAACGGTATACGGCCTT 1584
P_{ADH1}

CCTTCCAGTTACTTGAATTTGAAATAAAAAAAGTTTGTCTGTCTTGCTATCAAGTATAAATAGACC 1650
P_{ADH1}

TGCAATTATTAATCTTTTGTTCCTCGTCATTGTTCTCGTTCCTTTCTTCTTCTTTTCTTTTCT 1716
P_{ADH1}

GCACAATATTTCAAGCTATACCAAGCATAACAATCAACTCCAAGCTTGGTACCAATTATGAGAGCTT 1782
P_{ADH1} M R A

TGGCATATTTCAAGAAGGGTGATATTCACCTTCACTAATGATATCCCTAGGCCAGAAATCCAAACCG 1848
 L A Y F K K G D I H F T N D I P R P E I Q T

ACGATGAGGTTATTATCGACGTCTCTTGGTGTGGGATTTGTGGCTCGGATCTTCACGAGTACTTGG 1914
 D D E V I I D V S W C G I C G S D L H E Y L

ATGGTCCAATCTTCATGCCTAAAGATGGAGAGTGCCATAAATTATCCAACGCTGCTTTACCTCTGG 1980
 D G P I F M P K D G E C H K L S N A A L P L

CAATGGGCCATGAGATGTCAGGAATTGTTTCCAAGGTTGGTCCTAAAGTGACAAAGGTGAAGGTTG 2046
 A M G H E M S G I V S K V G P K V T K V K V

GCGACCACGTGGTCGTTGATGCTGCCAGCAGTTGTGCGGACCTGCATTGCTGGCCACACTCCAAAT 2112
 G D H V V V D A A S S C A D L H C W P H S K

TTTACAATTCCAAACCATGTGATGCTTGTGTCAGAGGGGCAGTGAAAATCTATGTACCCACGCCGGTT 2178
 F Y N S K P C D A C Q R G S E N L C T H A G

TTGTAGGACTAGGTGTGATCAGTGGTGGCTTTGCTGAACAAGTCGTAGTCTCTCAACATCACATTA 2244
 F V G L G V I S G G F A E Q V V V S Q H H I

TCCCGGTTCCAAAGGAAATTCCTCTAGATGTGGCTGCTTTAGTTGAGCCTCTTTCTGTCACCTGGC 2310
 I P V P K E I P L D V A A L V E P L S V T W

ATGCTGTTAAGATTTCTGGTTTCAAAAAAGGCAGTTCAGCCTTGGTTCTTGGTGCAGGTCCCATTG 2376
 H A V K I S G F K K G S S A L V L G A G P I

GGTTGTGTACCATTTTGGTACTTAAGGGAATGGGGGCTAGTAAAATTGTAGTGTCTGAAATTGCAG 2442
 G L C T I L V L K G M G A S K I V V S E I A

AGAGAAGAATAGAAATGGCCAAGAACTGGGCGTTGAGGTGTTCAATCCCTCCAAGCACGGTCATA 2508
 E R R I E M A K K L G V E V F N P S K H G H

AATCTATAGAGATACTACGTGGTTTGACCAAGAGCCATGATGGGTTTGATTACAGTTATGATTGTT 2574
 K S I E I L R G L T K S H D G F D Y S Y D C

CTGGTATTCAAG**C**TACTTTCGAAACCTCTTTGAAGGCATTAACATTCAAGGGGACAGCCACCAACA 2640
 S G I Q **A** T F E T S L K A L T F K G T A T N

TTGCAGTTTGGGGTCCAAAACCTGTCCCATTCCAACCAATGGATGTGACTCTCCAAGAGAAAGTTA 2706
 I A V W G P K P V P F Q P M D V T L Q E K V

TGACTGGTTCGATCGGCTATGTTGTGCAAG**A**CTTCGAAGAAGTTGTTTCGTGCCATCCACAACGGAG 2772
 M T G S I G Y V V E **D** F E E V V R A I H N G

ACATCGCCATGGAAGATTGTAAGCAACTAATCACTGGTAAGCAAAGGATTGAGGACGGTTGGGAAA 2838
 D I A M E D C K Q L I T G K Q R I E D G W E

AGGGATTCCAAGAGTTG**G**TGGATCACAAGGAATCCAACGTTAAGATTCTATTGACGCCTAACAAATC 2904
 K G F Q E L **V** D H K E S N V K I L L T P N N

ACGGTGAATGAAGTAAGAATTCCAAGCTTTGGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAA 2970
 H G E M K * *T_{ADH1}*

```

TCAAGGTTGTCGGCTTGTCTACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTG 3036
                                     TADH1
GTAGATACGTTGTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTATTATTAAAT 3102
                                     TADH1
AAGTTATAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGA CTCTTAGGTTTTAAAACGAAAATTCT 3168
                                     TADH1
TATTCTTGAGTAACTCTTTCCCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAGCATGAGGTCGCTCTTA 3234
                                     TADH1
TTGACCACACCTCTACCGGCATGCCGAGCAAATGCCTGCAAATCGCTCCCCATTTACCCAATTGT 3300
                                     TADH1
AGATATGCTAACTCCAGCAATGAGTTGATGAATCCC CGGTGTGGGTTTAGATGACAAGGGAGACGCA 3366
                                     TADH1
                                     P G V G L D D K G D A

TTGGGTCAACAGTATAGAACCGTGGATGATGTGGTCTCTACAGGATCTGACATTATTATTGTTGGA 3432
L G Q Q Y R T V D D V V S T G S D I I I V G

AGAGGACTATTTGCAAAGGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGGTGAACGTTACAGAAAAGCAGGCTGG 3498
R G L F A K G R D A K V E G E R Y R K A G W

GAAGCA 3564
E A

```

FIGURA 67: Seqüència que trobem al *locus URA3* de la soca cervesera modificada SIDU60.4. En negreta s'indiquen les mutacions que ha introduït la polimerasa del Expand Long Template PCR System. La primera seqüència proteica que trobem correspon a residus de l'extrem N-terminal de la proteïna Ura3p. Aquesta es troba seguida d'una seqüència *loxP* que va quedar després de la recombinació per la Cre recombinasa, i del promotor del gen *ADH1* (amb una mutació a l'extrem 5'). Després del promotor trobem la seqüència de la Bdh1p, amb les tres mutacions introduïdes. Finalment, es troben les seqüències del terminador del gen *ADH1* i l'extrem C-terminal de la proteïna Ura3p.

Els resultats de la seqüenciació varen confirmar la identitat entre la seqüència amplificada i la trobada en les bases de dades. L'estructura presentada en la figura 64 també era correcta i només es van trobar quatre mutacions puntuals i la deleció d'un nucleòtid al llarg de tota la seqüència de 3564 pb (Figura 67):

- posició 223: deleció del nucleòtid A que provocava un canvi en el marc de lectura en els últims 6 residus de l'enzim Ura3p de l'extrem N-terminal continguts a la seqüència. Aquest canvi no afecta la resta de la construcció doncs cada gen conserva el seu propi marc de lectura.

- posició 534: trobem un canvi d'una T per una C a l'inici del promotor *ADH1*.

- posició 2588: canvi de T per C a la seqüència codificant del gen *BDH1*. Comporta un canvi en el residu 272 d'una valina per una alanina.

- posició 2737: canvi de C per A la seqüència codificant del gen *BDH1*. Comporta un canvi del residu 322 d'una alanina per un aspàrtic.

- posició 2855: canvi de A per G a la seqüència codificant del gen *BDH1*. Comporta un canvi del residu 362 d'una metionina per una valina, substitució que es troba allunyada del centre actiu.

14.2.5 Anàlisi mitjançant Southern Blot no radioactiu de la modificació genètica en les soques *SIDUK60.1*, *SIDU60.1*, *SIDUK60.4* i *SIDU60.4*.

Adicionalment es van analitzar les soques de llevat industrial modificades per Southern Blot no radioactiu (Figura 68). El DNA genòmic de cada soca es va digerir amb els enzims *Hind*III/*Eco*RI i es va hibridar amb 1077 pb de la zona codificant del gen *BDH1*.

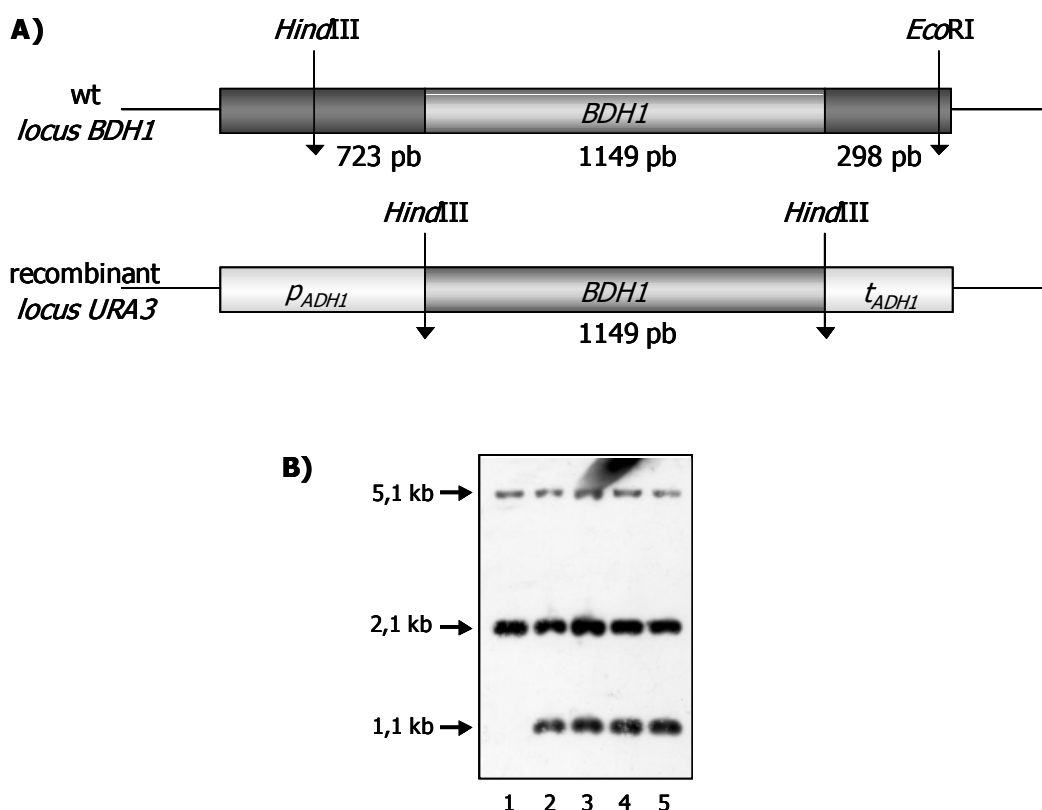


FIGURA 68: Anàlisi per Southern Blot de les colònies de llevat industrial modificades *SIDUK60.1*, *SIDU60.1*, *SIDUK60.4* i *SIDU60.4* i de la soca silvestre SID.

A) Esquema de l'estratègia seguida per realitzar el Southern Blot. La doble digestió *Hind*III/*Eco*RI en la soca silvestre (wt) allibera un fragment de 2169 pb que inclou el gen *BDH1* junt amb 723 pb del seu propi promotor i 298 pb del terminador. En canvi, les soques modificades alliberen el fragment de 1149 pb que correspon al gen *BDH1* que prové del vectro pAAY0R (apartat 13.2.2).

B) El DNA genòmic de cada soca es va digerir amb els enzims de restricció *Hind*III/*Eco*RI i es va utilitzar el gen *BDH1* com a sonda per a la hibridació.

Carril 1: Soca cervesera SID sense modificar.

Carril 2: Soca *SIDUK60.1*

Carril 3: Soca *SIDU60.1*

Carril 4: soca *SIDUK60.4*.

Carril 5: Soca *SIDU60.4*.

En totes les soques analitzades (Figura 68B) es detecta la banda de 2169 pb corresponent a la còpia cromosòmica del *locus BDH1* sense modificar (Figura 68A). Les soques modificades, a més de la banda del gen *BDH1* silvestre, també presentaven la banda de 1149 pb que s'allibera en digerir amb *Hind*III el casset d'expressió que prové del vector pAAY0 (vector construït com pas intermig en la construcció del vector pRSMXY0, apartat 12.2.1), doncs es va clonar el gen *BDH1* en l'únic lloc de restricció del vector pAAH5 que era el lloc *Hind*III. La sonda *BDH1* també hibrida més dèbilment en una seqüència d'aproximadament 5,1 kb en totes les soques analitzades. Probablement la soca SID, com la majoria de soques cerveseres tipus *lager* (Boulton i Quain, 2001), és aneuploide i prové de dos espècies *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces bayanus*. La banda que apareix de 5,1 kb podria ser el resultat de la hibridació de la sonda pel gen *BDH1* amb el seu homòleg de *S. bayanus*. La seqüència d'aquest gen, diferent a la del *BHD1* de *S. cerevisiae*, hibrida de manera més feble, tal i com s'observa a la figura 68B.

El resultat del Southern Blot va confirmar que les 4 soques estaven modificades i contenen el casset d'expressió de la Bdh1p.

14.3 Expressió de la Bdh1p en les diferents soques modificades.

Abans de començar les fermentacions es va fer un estudi de l'expressió de la Bdh1p en les diferents soques obtingudes fins el moment. Les soques S288C, SCU60, SID, SIUK60.4, SIU60.4, SID[pRSMX] i SID[pRSMXY0] es van créixer en 10 ml de medi YPD, i en 10 ml de YP amb glucosa al 20%, fins a la fase exponencial a una O.D.₆₀₀ entre 3,5-4,5. Les cèl·lules es van homogeneïtzar i es van analitzar en gels d'isoelectroenfoc que es van tenyir per activitat diacetil reductasa (Figura 69).

El resultat d'aquests anàlisis ens permet integrar les diferents dades obtingudes en els apartats 13 i 14. Així, podem confirmar que la soca industrial SID no presenta activitat Bdh1p en condicions de creixement en glucosa doncs no s'ha detectat activitat per espectrofotometria (taules 18 i 20) ni mitjançant anàlisis d'homogenats per isoelectroenfoc i tinció per activitat acetoïna o diacetil reductasa (figura 69A i B, carril 4). En canvi, sí que es detecta l'activitat de la Bdh1p en la soca de laboratori S288C (taula 18, figura 69A i B, carril 2).

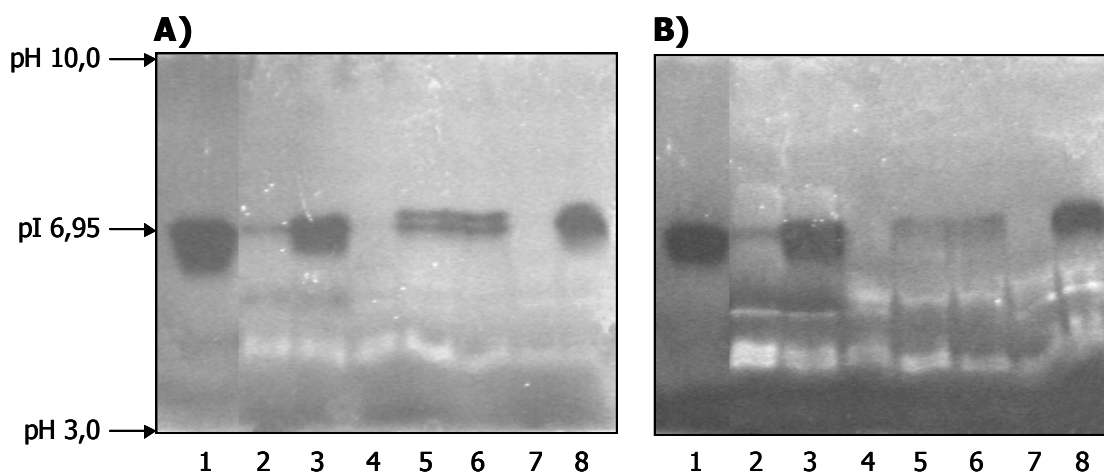


FIGURA 69: Anàlisi per gels d'isoelectroenfoc d'homogenats de les soques S288C (carril 2), SCU60 (carril 3), SID (carril 4), SIDUK60.4 (carril 5), SIDU60.4 (carril 6), SID[pRSMX] (carril 7) i SID[pRSMXY0] (carril 8). Carril 1, 0,35 unitats de Bdh1p purificada. Els genotips de les soques es troben descrits i agrupats en les taules 23 i 24 de l'annex.

A) Creixement en medi YPD, tinció diacetil reductasa, i 50 µg de proteïna per homogenat.

B) Creixement en medi YP amb glucosa al 20%, tinció diacetil reductasa, i 100 µg de proteïna per homogenat.

En relació a la sobreexpressió de la Bdh1p en la soca de laboratori modificada SCU60, observem que és major que la obtinguda per la soca industrial (taules 19 i 21, Figura 69A i B, carrils 3 i 6), encara que els nivells d'expressió en la soca SCU60 són similars als obtinguts en la soca S288C que contenia el vector monocòpia pRSMXY0 (1,86 U/mg i 1,82 U/mg respectivament, taules 19 i 18).

De la mateixa manera, hem sobreexpressat la Bdh1p de manera estable en la soca industrial SID (Figura 69A i B, carrils 5 i 6), però l'expressió de la Bdh1p aconseguida mitjançant el vector centromèric pRSMXY0 va ser més alta que l'expressió en la soca modificada genèticament (1,82 U/mg i 0,243 U/mg respectivament, taules 18 i 21 clon SIDU60.4.22, figura 69A i B, carrils, 5 a 8), indicant que el context genòmic on es realitza la integració (S288C o SID) influeix en l'expressió del gen introduït.

Cal mencionar la identificació de bandes addicionals amb activitat diacetil reductasa de pI menor al de la Bdh1p i de més baixa intensitat als carrils 2 i 3, corresponents a la soques de laboratori S288C i SCU60. Aquestes bandes corresponen a l'Adh1p de llevat, que presenta una feble activitat amb diacetil descrita a Hardwick i cols. (1976), doncs durant el creixement en glucosa l'Adh1p és la principal alcohol deshidrogenasa present a *S. cerevisiae* (Denis i cols., 1983).

14.4 Fermentacions amb most industrial de 15^oP amb la soca de laboratori S288C i la soca de laboratori modificada genèticament SCU60.

Es va realitzar la fermentació de most industrial de 15^oP amb les soques S288C i SCU60, i es va estudiar els nivells de diacetil, 2,3-pentanodiona i acetoïna durant el procés. Aquests experiments es van dur a terme com a control de les posteriors fermentacions amb la soca industrial modificada, doncs la soca SID és una espècie no caracteritzada genèticament, al contrari de la ben coneguda S288C.

Les fermentacions amb les soques S288C i SCU60 presenten diferències en el creixement cel·lular (Figura 70A). Ambdues presenten una petita etapa de creixement fins el dia 3 seguida d'una etapa de floculació on les cèl·lules sedimenten al fons de la columna, més pronunciada en la soca silvestre S288C ($p < 0,05$) que en la modificada genèticament.

Però tot i aquesta diferència en el creixement, no presenten diferències significatives ($p > 0,05$) en la disminució de l'extracte aparent o en la producció d'alcohol (Figura 70A). La velocitat i el temps de degradació de sucres (paràmetre que quantifica l'extracte aparent) és similar en les dues soques, i no són capaces de degradar-ne molt, doncs la disminució és només de dos punts comparat amb la soca SID[pRSMX] que és de 12 (Figura 70A). Amb l'alcohol en volum passa el mateix, la soca de laboratori només produeix un 1,2% d'alcohol en volum mentre que la soca industrial (Figura 55A) és capaç de produir-ne el 6,5%.

Respecte dels nivells dels diferents metabolits estudiats (diacetil, 2,3-pentanodiona i acetoïna), tampoc es troben diferències significatives en la producció per part de les dues soques. A més, el patró de producció és diferent a l'obtingut amb la soca SID[pRSMX] (pic màxim els dies 3 o 4 en la soca, Figura 55B), que també es correlaciona amb la baixa activitat fermentativa (poca degradació de sucres) que presenten les soques de laboratori en les condicions de fermentació de most industrial.

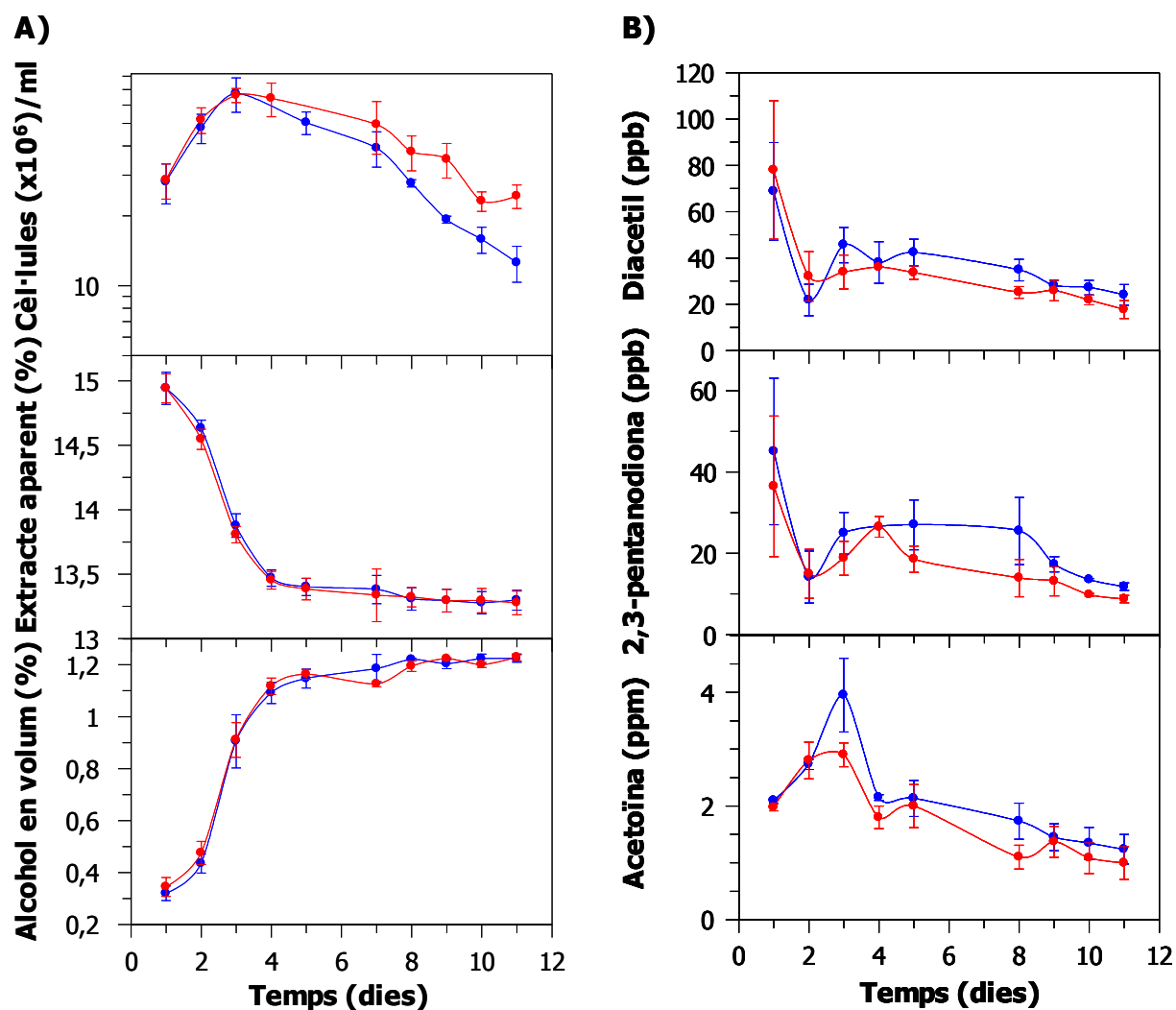


FIGURA 70: Anàlisi de diferents paràmetres durant la fermentació de most industrial de 15^oP en columnes de fermentació estàndard EBC, amb les soques de laboratori S288C (blau) i SCU60 (vermell). Els valors són la mitja \pm SD de les determinacions dels compostos en tres fermentacions independents. Es va realitzar un *t*-test (Sigma Plot 8.0) per tal de comprovar si hi havia diferències significatives entre les fermentacions de les diferents soques. Es van obtenir diferències significatives entre les corbes de creixement de les soques S288C i SCU60.

A) Evolució del nombre de cèl·lules/ml, de l'extracte aparent i de l'alcohol en volum durant la fermentació.

B) Evolució dels nivells de diacetil, 2,3-pentanonodiona i acetoïna per les soques S288C i SCU60 al llarg de la fermentació.

Per a cada soca es van recollir mostres de cèl·lules a diferents temps de la fermentació. Les mostres es van homogeneïtzar i es van analitzar per isoelectroenfoc, amb tinció per activitat diacetil reductasa (Figura 71). Per la soca S288C només es pogué detectar expressió de la Bdh1p en els dies 1 i 5. En canvi, l'expressió en la soca SCU60 es mantingué constant al llarg de la fermentació.

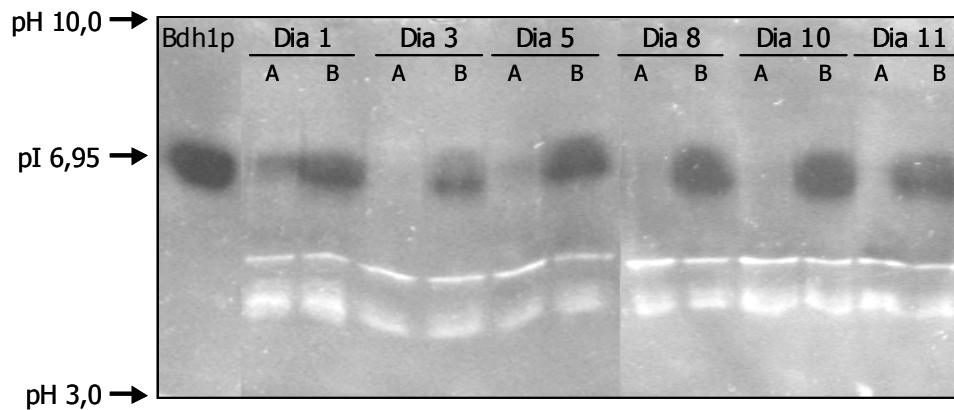


FIGURA 71: Anàlisi per isoelectroenfoc dels homogenats de les soques S288C (A) i SCU60 (B) (100 µg de proteïna) a diferents temps de la fermentació amb most de 15°P. En el carril Bdh1p s'han aplicat 0,35 unitats de l'enzim purificat.

Així doncs, s'havia obtingut una soca modificada genèticament que sobreexpressava la Bdh1p de manera estable i constant.

14.5 Fermentacions amb most industrial de 15°P amb la soca de llevat industrial SID i la soca modificada genèticament SIDU60.4.

Les soques SID i SIDU60.4 es van utilitzar per realitzar fermentacions amb most industrial de 15°P en columnes de fermentació estàndard EBC. Es van seguir paràmetres de la fermentació al llarg del temps, de la mateixa manera que s'havia fet per les fermentacions amb les soques de laboratori S288C i SCU60 (veure apartat anterior). Es van obtenir els resultats presentats a la figura 58.

Les fermentacions amb les soques SID i SIDU60.4 presenten diferències entre elles. Una diferència es trobava en el creixement cel·lular (Figura 72A). La soca SID realitzava una duplicació durant els 3 tres primers dies i a continuació es detectava una etapa de floculació on les cèl·lules sedimentaven al fons de la columna, de tal manera que el darrer dia de la fermentació quedaven en suspensió menys de 10 milions de cèl·lules/ml. En canvi, la soca SIDU60.4 no arribava a duplicar el seu nombre de cèl·lules/ml i començava a flocular a partir del dia 9 de la fermentació, de manera que l'últim dia presentava un nombre de cèl·lules en suspensió més alt que la soca control. Però tot i que gràficament es vegin aquestes diferències, estadísticament no són significatives ($p > 0,05$).

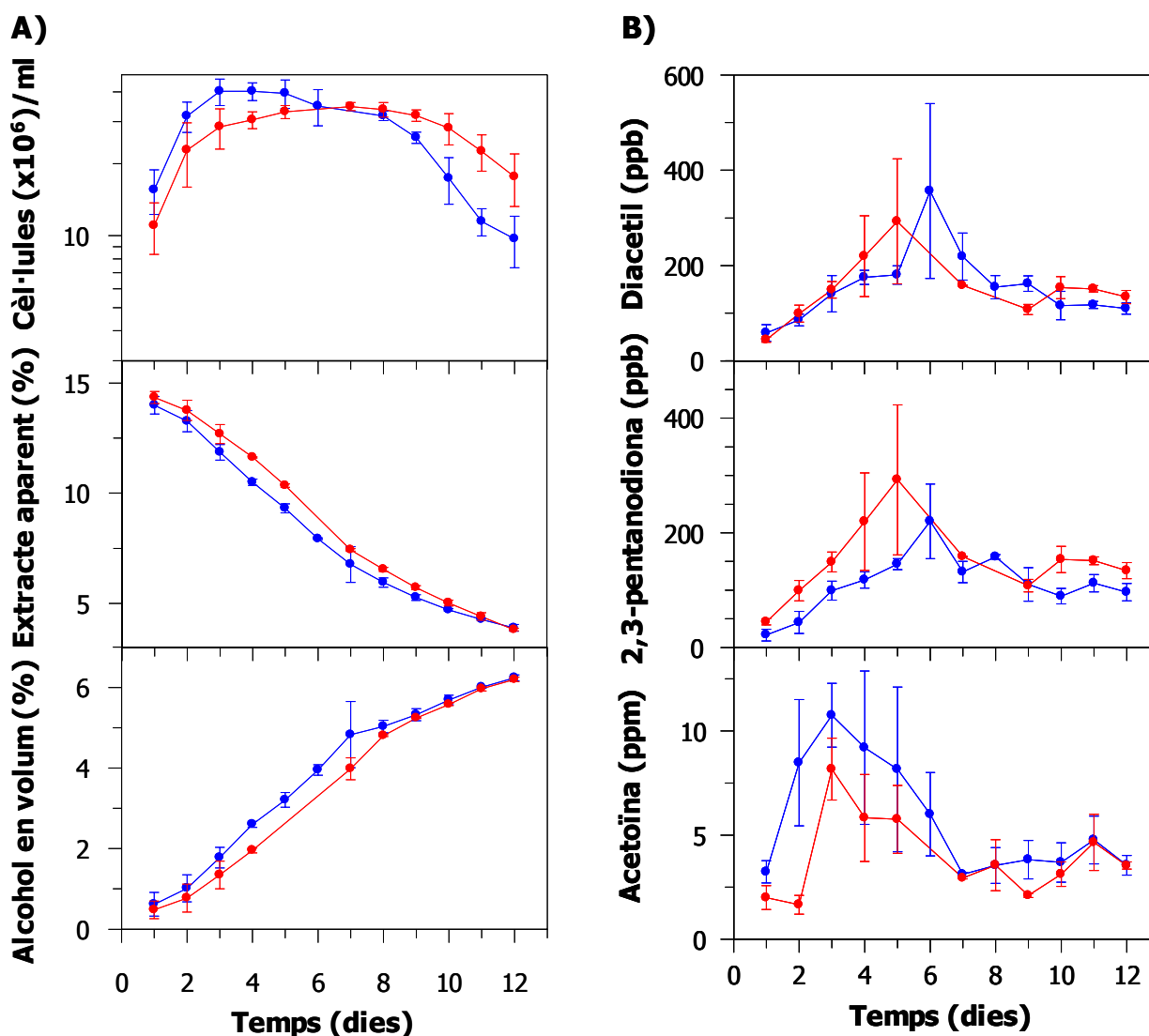


FIGURA 72: Anàlisi de diferents paràmetres durant la fermentació de most industrial de 15°P en columnes de fermentació estàndard EBC amb les soques SID (blau) i SIDU60.4 (vermell). Els valors són la mitja \pm SD de les determinacions dels compostos en tres fermentacions independents. Es va realitzar un *t*-test (Sigma Plot 8.0) per tal de comprovar si hi havia diferències significatives entre les fermentacions de les diferents soques. Es van obtenir diferències significatives entre la producció d'alcohol en volum i la disminució de l'extracte aparent de les soques SID i SIDU60.4.

A) Evolució del nombre de cèl·lules/ml, de l'extracte aparent i de l'alcohol en volum.

B) Evolució dels nivells de diacetil, 2,3-pentanodiona i acetoïna.

L'evolució de l'extracte aparent i de l'alcohol en volum va resultar ésser diferent entre les dues soques ($p < 0,05$). Pels dos paràmetres, les corbes obtingudes per la soca modificada SIDU60.4 van ser més suaus, de pendent menys pronunciada, tot i que el punt final on es va arribar (4% d'extracte aparent i 6% d'alcohol en volum) va ser el mateix.

Pels metabolits d'interès no es van trobar diferències significatives entre els valors obtinguts en les fermentacions de les dues soques ($p > 0,05$) (Figura 72B). No hi havia diferència ni en l'evolució dels nivells dels tres compostos (diacetil, 2,3-pentanodiona i acetoïna), ni en el valor final que s'obtenia al final de la fermentació. Així, la corba de diacetil presentava un pic de producció màxim al dia 6 per la soca SID i al dia 5 per la soca SIDU60.4, però l'error és tan gran que no són estadísticament diferents. El mateix passa amb la 2,3-pentanodiona, que presentava una corba de concentració molt similar a la del diacetil. Degut a l'elevat error experimental tampoc es podia considerar que hi hagués diferència en els nivells d'acetoïna per part de les dues soques.

Es pot concloure que s'havia aconseguit obtenir una soca industrial modificada genèticament que sobreexpressava Bdh1p, però que no era útil per reduir els nivells de diacetil, 2,3-pentanodiona i acetoïna del medi durant la fermentació alcohòlica de most industrial en condicions de producció de cervesa.

DISCUSSION

En aquesta tesi doctoral s'ha identificat el producte del gen *YAL060W* de *Saccharomyces cerevisiae* com una butanodiol deshidrogenasa. S'ha realitzat una caracterització cinètica, estructural i funcional de l'enzim, anomenat Bdh1p, i s'ha proposat una aplicació biotecnològica per a la indústria cervesera.

1. La Bdh1p de *Saccharomyces cerevisiae* pertany a la família de les MDR.

La butanodiol deshidrogenasa (Bdh1p), producte gènic de *YAL060W* de *Saccharomyces cerevisiae*, s'ha classificat en diferents treballs com a membre de la superfamília de les MDR en base a les seves característiques seqüencials. En un primer treball, González i cols. (2000) van identificar els gens *YAL060W* (*BDH1*) i *YAL061W* com a membres de la superfamília i en concret, l'arbre filogenètic realitzat de les MDR que uneixen zinc presents al llevat, indicava que es podien incloure dins de la família enzimàtica de les poliols deshidrogenases. Més tard, estudis de classificació amb totes les MDR conegudes de totes les espècies, varen confirmar la classificació anterior (Nordling i cols., 2002, i Riveros-Rosas i cols., 2003, Figura 2). La Bdh1p és la primera BDH descrita en organismes eucariotes.

L'anàlisi de la seqüència per comparació amb altres enzims MDR revelen que la Bdh1p conserva els diferents residus característics d'aquestes proteïnes (Figura 17). Així, s'observa la seqüència consens d'unió del zinc catalític junt amb les glicines que es troben conservades per mantenir el plegament de Rossmann en el domini d'unió del coenzim (Eklund i Brändén, 1987) i les glicines presents en el domini d'unió del substrat, del que es podria inferir que l'estructura tridimensional global pot ser la característica dels enzims MDR (Sun i Plapp, 1992).

Hi ha diferents aspectes que ens permeten incloure la Bdh1p dins del grup de les PDH, com poden ser la unió del zinc catalític, el *gap* present en la regió del *loop* on

s'uneix el zinc (si en tenen), o una homologia més alta amb les PDH en regions concretes.

En el cas del zinc catalític, la Bdh1p conserva la Cys46 i la His67 (numeració de l'ADH-E de cavall) com a l'ADH-E de cavall, però en canvi presenta un glutàmic en la posició 174 com en el cas de la SDH de rata (Eklund i Brändén, 1987). Totes les PDHs presenten Glu en aquesta posició, lligand que s'ha confirmat que coordina el zinc catalític en la SDH de rata per anàlisi de l'estructura tridimensional (Johansson i cols., 2001). Però no tots els enzims de la família de les PDH tenen el Glu174 coordinant el zinc catalític, doncs en l'estructura tridimensional de l'enzim cetosa reductasa de *B. argentifolii* (BaKR) el tercer lligand del zinc catalític és el Glu68, mentre que el Glu174 participa en la unió del substrat (Bandfield i cols., 2001). Per les dades de que disposem i amb la poca identitat estructural que presenta la Bdh1p envers la SDH de rata o la cetosa reductasa de *B. argentifolii* (menys del 30%), no podem assegurar quin dels dos residus participa en la coordinació del zinc catalític en la Bdh1p de *S. cerevisiae*.

Respecte al zinc estructural, la Bdh1p presenta les Cys103, 120, 123 i 131 que s'alineen amb els residus d'unió del zinc estructural en l'ADH-E de cavall. A diferència de les SDH, que no tenen aquest segon àtom de zinc, la Bdh1p probablement el presenta, doncs conté els 4 lligands per fer-ho. El zinc estructural es troba en un *loop* superficial, totalment coordinat i es pensa que té un paper estabilitzant de l'estructura proteica (Drum i cols., 1969). A més, aquesta regió intervé en les interaccions entre les subunitats per formar el tetràmer en la SDH de rata (Johnston i cols., 2001) i en altres proteïnes de les PDH (Karlsson i cols., 1995). En aquest *loop*, la Bdh1p té una inserció de 14 residus entre la primera i la segona cisteïna, de manera que el fa més gran. Aquest engrandiment de la regió pot ser un factor determinant per a la formació de l'estructura dimèrica de la Bdh1p en comptes de tetramèrica com en la majoria de les sorbitol deshidrogenases.

Finalment, cal ressaltar el Glu221, residu que s'alineja amb el Asp223 de l'ADH-E de cavall, implicat en la discriminació entre el NAD(H) i el NADP(H). La Bdh1p, junt amb la BDH de *P. putida*, són rars exemples on la discriminació a favor del NAD(H) es realitza per un Glu enlloc d'un Asp. Aquest residu suposaria un impediment estèric més gran al grup fosfat extra que presenta el NADP(H), i aquest fet contribuiria a la gran

especificitat envers el NAD(H) que presenta la Bdh1p (apartat 5.1 dels Resultats), doncs l'activitat amb NADP(H) és menys del 0,7% de l'activitat obtinguda amb NAD(H).

2. Característiques estructurals i cinètiques de la Bdh1p de *S. cerevisiae*.

2.1 Purificació de la Bdh1p de *S. cerevisiae*. Propietats físico-químiques.

La Bdh1p és la primera butanodiol deshidrogenasa eucariota, de les MDR i seqüència coneguda que ha estat purificada. Altres BDH, de les quals no se'n coneix la seqüència, s'han purificat de llevats com *S. cerevisiae* (Heidlas i Tressl, 1990a), *Candida utilis* (Verduyn i cols., 1988a) o *Kluyveromyces marxianus* (Schwarz i Hang, 1994), però totes elles amb propietats cinètiques i estructurals diferents a les dels enzims MDR.

Així, l'enzim purificat de *S. cerevisiae* és un tetràmer de 140 kDa amb un pes molecular de la subunitat de 35 kDa. És un enzim estable amb una activitat específica de 20.25 U/mg (Heidlas i Tressl, 1990a). Aquest enzim és clarament molt diferent de la Bdh1p. Es té poca informació de les propietats físico-químiques de les altres BDHs.

S'ha descrit el clonatge d'una BDH bovina, similar a la de *Klebsiella terrigena*, però pertany a la família de les SDR (Smania i Aragaña, 1997). En canvi, ha augmentat el nombre de seqüències de suposades BDH d'organismes procariotes en els darrers anys, degut a la seqüenciació massiva dels seus genomes. Així, realitzant cerques de proteïnes relacionades es troben possibles BDH de la superfamília de les MDR de *Lactobacillus lactis*, *Bacillus cereus*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae* (Takusagawa i cols., 2001), *Pseudomonas putida* (Huang i cols., 1994) i *Pseudomonas aeruginosa* entre altres.

2.2 Caracterització cinètica de la Bdh1p.

La Bdh1p de *S. cerevisiae* és activa amb compostos similars als substrats d'altres BDHs, tant de la superfamília de les MDR com de les SDR. Així, hem vist que són substrats per la oxidació compostos que contenen grups diol en posició 1,2 o 2,3, preferint els alcohols secundaris (per ex. 2,3-butanodiol) als primaris (1,2-butanodiol). Són substrats per la reducció aquells que contenen grups dicetones o hidroxicetones contigus (acetoïna i diacetil). L'enzim prefereix compostos de 4 carbonis com a

substrats tant per a la oxidació com per a la reducció (taula 8). Els substrats utilitzats són similars als que utilitza la BDH de *S. cerevisiae* purificada per Heidlas i Tressl (1990a), però l'especificitat difereix en part, doncs metilgloxal i dihidroxiacetona són substrats per la Bdh1p, però no per l'altra. També les constants de Michaelis són més elevades, en general, per la Bdh1p.

Una de les propietats cinètiques que diferencien la Bdh1p de la resta de les BDH descrites és la manca de saturació amb el diacetil. Tant l'enzim purificat de *C. utilis* (Verduyn i cols., 1988a), com el de *K. marxianus* (Schwarz i Hang, 1994), presenten saturació amb aquest substrat i s'ha pogut calcular valors de Km de 4,3 mM i 2,5 mM respectivament. La Bdh1p no es satura fins i tot a concentracions de diacetil 100 mM. Però tot i així, l'activitat amb 50 mM de diacetil representa un 50% de l'activitat amb el seu millor substrat, l'acetoïna. Sembla ser que la Bdh1p no ha necessitat mantenir una especificitat alta envers el diacetil i sí amb l'acetoïna i el 2,3-butanodiol. Així, durant la fermentació del vi s'han descrit valors de fins a 1 g/l de 2,3-butanodiol, que provenen majorment de la síntesi directa d'acetoïna per la piruvat descarboxilasa (figura 7), en canvi només s'obtenen concentracions de diacetil del nivell de mg/l durant la fermentació del most cerveser (figura 9). Així, en el transcurs de la fermentació *S. cerevisiae* es troba amb quantitats d'acetoïna més altes que de diacetil, i ha de ser capaç de reduir-la eficaçment, paper que realitza la Bdh1p.

2.3 Estereoespecificitat de la Bdh1p de *S. cerevisiae*.

Hem demostrat que la Bdh1p és un enzim estereoespecífic. La oxidació dependent de NAD⁺ dels compostos (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol i *meso*-2,3-butanodiol comporta la producció de (3*R*)-acetoïna i (3*S*)-acetoïna respectivament, així com la producció de (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol i *meso*-2,3-butanodiol en les reaccions inverses a partir dels isòmers de l'acetoïna. Aquesta especificitat envers els grups alcohol en configuració *R* és extremadament alta, doncs no s'ha observat reacció amb el (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol. A més s'ha demostrat que la reducció del grup cetona depèn de la configuració del grup alcohol contigu, essent major si està en configuració *R* que en *S*, doncs la *k*_{cat} per a la oxidació del *meso*-2,3-butanodiol (46.000 min⁻¹) és menor que la obtinguda per la oxidació del (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol (78.000 min⁻¹).

La reducció del diacetil per la Bdh1p produeix només (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol (Figura 32A). Aquest fet dóna suport a l'estricta estereoespecificitat de la Bdh1p envers els grups en configuració *R*, doncs no apareixen en absolut traces de l'isòmer *meso*-2,3-butanodiol o del (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol. Aquesta estereoespecificitat també es troba descrita per la BDH de llevat descrita prèviament (Heidlas i Tressl, 1990a). De manera similar, la reducció de la 2,3-pentanodiona només produeix un únic isòmer del 2,3-pentanodiol i un únic intermediari hidroxipentanona (Figura 32C). Malgrat que no s'ha determinat la seva configuració és molt probable que siguin l'isòmer (2*R*,3*R*)-2,3-pentanodiol i una hidroxiacetona en configuració *R*, tenint en compte l'especificitat de la Bdh1p.

Altres deshidrogenases han estat caracteritzades en termes d'estereoespecificitat envers els diferents isòmers del 2,3-butanodiol i les corresponents acetoïnes. Pertanyen a la família de les SDR, i en son exemple les BDH de *Brevibacterium saccharolyticum* (Ui i cols., 1998, Takusagawa i cols., 2001), *Klebsiella terrigena* (Blomqvist i cols., 1993) o *Klebsiella pneumoniae* (Ui i cols., 1997), totes elles de procariotes. Aquests enzims han despertat interès en el camp de la química orgànica, doncs les BDH i fins i tot les cèl·lules que les expressen s'han utilitzat per produir compostos òpticament actius, com els propis butanodis i acetoïnes (Ui i cols., 1999).

Tenint en compte que el llevat és un organisme que ja s'ha utilitzat com a biocatalitzador per a la obtenció de diferents compostos quirals (Hummel, 1997, Pereira i cols., 1998, Griffin i cols., 2001) es pot pensar en la Bdh1p per realitzar una aplicació biotecnològica d'aquest tipus. Aquestes reaccions són importants en termes d'estudis biològics doncs és ben conegut que molts compostos només són assimilables o actius en alguna de la seva forma quiral. A més no sempre són disponibles comercialment com per exemple, els isòmers del 2,3-pentanodiol o de la hidroxipentanona. Així, la Bdh1p, un enzim extremadament específic pels grups alcohol en configuració *R*, junt amb l'Adh2p, que és activa amb els grups alcohol en configuració *S*, serien enzims adequats per utilitzar-se en la producció química dels diferents isòmers del 2,3-pentanodiol i de la hidroxipentanona. Per tant, no es pot descartar una possible aplicació de la Bdh1p en aquesta part de la indústria química, moltes vegades necessitada d'aquest tipus de catalitzadors.

3. Noves activitats de l'Adh2p de *S. cerevisiae*.

La detecció i seguiment d'una activitat diacetil reductasa en homogenats de llevat ens ha dut a la purificació d'una alcohol deshidrogenasa ben coneguda, l'Adh2p (apartat 8 dels Resultats). Des de la seva purificació (Ebisuzaki i Barron, 1957) s'han estudiat abastament les característiques cinètiques i funcionals de l'Adh2p, però fins el moment no s'havia descrit l'activitat de l'Adh2p envers el diacetil. L'enzim és capaç de reduir-ho a acetoïna, però ja no és capaç de reduir el segon grup cetona, així com és incapaç d'oxidar cap dels isòmers del 2,3-butanodiol. Un similar comportament cinètic s'ha descrit per l'Adh1p de llevat. Així, s'ha demostrat que l'Adh1p reduïa diacetil fins a acetoïna i que, ni aquesta, ni el 2,3-butanodiol, no eren substrats (Hardwick i cols., 1976). Tenint en compte que Adh1p i l'Adh2p estan relacionades estructuralment i que presenten constants cinètiques similars no és d'estranyar que els dos enzims mostrin un comportament cinètic similar amb el diacetil i els seus derivats.

Una altra activitat descrita en el present treball ha estat la reducció de la 2,3-pentanodiona per l'Adh2p, tal com ja havia estat descrita per l'Adh1p (Hardwick i cols., 1976). Ni la 2,3-pentanodiona ni el diacetil saturen l'enzim, i la seva activitat és molt menor comparada amb la d'oxidació de l'etanol, de 26 a 50 vegades pel diacetil i la 2,3-pentanodiona respectivament (Taula 11). La reacció, a més, és estereoespecífica. Quan es va analitzar la reacció de reducció del diacetil i la 2,3-pentanodiona es va comprovar que l'Adh2p produïa l'isòmer *S*-acetoïna i un únic isòmer hidroxiacetona, respectivament (Figura 32B i D). Per tant, l'enzim és específic per a la reducció dels grups carbonils a grups alcohol en configuració *S*. Per similitud amb el diacetil, es probable proposar que el producte de la reducció de la 2,3-pentanodiona sigui l'isòmer *S*. Aquesta estricta estereoespecificitat no és un fenomen nou per les alcohol deshidrogenases, doncs l'ADH i la lactat deshidrogenasa (LDH) de *Equus caballus* s'han utilitzat per a la producció de compostos estereoespecífics (Pereira, 1995, Pereira i cols., 1998).

4. Funció de la Bdh1p de *S. cerevisiae*.

4.1 Expressió de la Bdh1p en diferents fonts de carboni.

Durant el creixement en glucosa al 2% (Apartat 11.1.1 dels Resultats) la Bdh1p augmenta la seva expressió fins arribar a un màxim en la fase estacionària. L'activitat de la Bdh1p augmenta a partir del moment en què s'esgota la glucosa del medi (Figures 38 i 44A, taula 13), indicant que l'expressió de la Bdh1p es trobaria sotmesa a repressió per catabolit, doncs la presència de glucosa al medi en manté els nivells baixos, i quan s'esgota la glucosa l'expressió de l'enzim augmenta, increment que no es dona durant el creixement en 20% de glucosa al medi.

Més evidències d'aquesta possible regulació les trobem quan analitzem el creixement en etanol al 3% com a font única de carboni per al creixement. En aquest cas, tot i no trobar una inducció al llarg del temps, l'activitat en els extractes de llevat és similar a la obtinguda en la fase estacionària en glucosa al 2%, on la Bdh1p augmenta la seva activitat.

L'Adh2p és un clar exemple que segueix aquest patró d'expressió en funció de la glucosa present al medi. El gen *ADH2* es troba completament reprimat en presència de glucosa, mentre que augmenta la seva expressió més de 100 vegades quan es troba en presència d'etanol al medi (Ciriacy, 1975, Russell i cols., 1983). La seva regulació, depèn dels activadors Adr1p i Cat8p (Walther i Schüller, 2001), que a l'hora depenen del principal complex regulador del metabolisme del carboni que és Snf1p. En presència d'altres concentracions de glucosa Snf1p es troba inactiu i no pot fosforilar els seus substrats, entre ells Cat8p i no està clar si també Adr1p, de manera que els manté inactius (Rahner i cols., 1996, i Randez-Gil i cols., 1997, Young i cols., 2002). No es coneix de quina manera es troba regulada l'expressió del gen *BDH1*, però sí que és cert que l'absència de glucosa fa augmentar l'activitat de la Bdh1p en extractes proteics de llevat.

També hem vist que durant el creixement en diferents fonts de carboni (Figura 46), l'expressió de la Bdh1p és més gran en totes les condicions de creixement en comparació a les que presenten glucosa. La major expressió s'assoleix quan es troba en presència de 2,3-butanodiol. Tot i que aquest compost no sigui una bona font de carboni (el creixement és molt pobre) (Figures 26 i 45), sí que provoca la inducció de la

Bdh1p, el que acceleraria la oxidació del 2,3-butanodiol a l'acetoïna. Altres llevats del gènere *Candida*, *Hansenula* i *Pichia* poden créixer en 2,3-butanodiol com a font de carboni, però com en el cas de *S. cerevisiae*, el creixement és pobre (Verduyn i cols., 1998b).

Molts bacteris, entre ells *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Clostridium magnum*, *Alcaligenes eutrophus*, *Klebsiella pneumoniae* o *Pelobacter carbinolicus*, contenen un operó format per un complex similar a la piruvat deshidrogenasa (PDH) anomenat sistema enzimàtic de l'acetoïna deshidrogenasa, i, en alguns casos, també contenen una BDH que els permet utilitzar l'acetoïna o el 2,3-butanodiol com a font de carboni. Aquest sistema trenca l'acetoïna en dues molècules de dos carbonis, acetaldehid i acetil-CoA, que poden utilitzar-se en els cicles del glixilat i del àcids tricarbòxilic per obtenir energia i permetre el creixement del bacteri (López i cols., 1975, Oppermann i cols., 1988, Priefert i cols., 1991, Huang i cols., 1994, Deng i cols., 1994, Krüger i cols., 1994, Huang i cols., 1999,). Aquest tipus de sistema d'assimilació de l'acetoïna s'ha buscat en *Candida utilis* sense obtenir resultats positius, indicant, que l'assimilació i el creixement en 2,3-butanodiol es realitza per un sistema diferent al presentat per molts procariotes (Verduyn i cols., 1988b). Aquest mateix raonament es pot aplicar al creixement de *S. cerevisiae* presentat en aquest treball, doncs el creixement obtingut amb 2,3-butanodiol és marginal (Figura 26). A més, no s'han trobat al genoma de *S. cerevisiae* enzims homòlegs als components del complex acetoïna deshidrogenasa bacterians. En base a totes aquestes dades podem dir que *S. cerevisiae* és pràcticament incapaç de créixer utilitzant el 2,3-butanodiol com a font de carboni.

4.2 Estudi dels mutants pels gens *BDH1*, *ADH2* i *YAL061W* durant el creixement en medi ric.

El creixement dels diferents mutants en glucosa 2% (Figura 47) no queda afectat per cap de les delecions realitzades a la soca silvestre FY834. En canvi, es detecten lleugeres diferències en la O.D.₆₀₀ final assolida quan les soques creixen en glucosa concentrada al 20% (Figura 48), essent les soques que presenten el gen *BDH1* delecionat les de major creixement. La presència o absència del gen *BDH1* es troba lligada a una menor o major acumulació d'acetoïna respectivament (Figura 50). Està

descriu que l'addició d'acetoïna al medi estimula la fermentació en cultius que es troben en fase estacionària de manera que la Bdh1p redueix l'acetoïna, reoxida el NADH i s'assoleix un nou equilibri NADH/NAD⁺ que estimula de nou la fermentació alcohòlica (Roustan i Sblayrolles, 2002a i 2002b). Aquest fenomen també s'ha descrit durant la fermentació de xilosa per part de *S. cerevisiae*, on l'addició d'acetoïna al medi afavoreix la formació d'etanol per mol de xilosa afegida (Wahlbom i Hahn-Hägerdal, 2002). En aquest sentit, l'acumulació d'acetoïna en les soques que tenen el gen *BDH1* deletat podria haver provocat aquest major creixement respecte les soques amb el gen intacte. La reducció de l'acetoïna en aquestes soques s'hauria de realitzar mitjançant algun dels altres enzims descrits actius amb aquest compost (Heidlas i Tressl, 1990a i b).

És important remarcar que la deleció del gen *BDH1* elimina per complet l'activitat acetoïna reductasa (AR) en homogenats. La deleció no elimina activitat diacetil reductasa (DR), que depèn com a mínim, de tres enzims: la Bdh1p, l'Adh2p i algun altre, doncs la soca EGA2 amb els gens *BDH1* i *ADH2* deletats (Taula 17) encara presenta activitat DR en els seus extractes proteics. Candidats que poden ser responsables d'aquesta activitat DR remanent serien la BDH purificada per Heidlas i Tressl (1990a), l'Adh1p (Hardwick i cols., 1976), les dues oxidoreductases actives amb aquest compost (Heidlas i Tressl, 1990b) o la 2-metilbutiraldehid reductasa (Ypr1p), de la família de les aldo-ceto reductases, que també és activa amb diacetil (Ford i Ellis, 2002).

És interessant el fet que la deleció del gen *YAL061W*, amb un 51% d'identitat de seqüència amb el gen *BDH1*, disminueixi les activitats AR i DR. Fins el moment no s'ha pogut expressar ni detectar la proteïna codificada (Yal061p) per cap de les tècniques de purificació clàssiques de les ADH que es realitzen al nostre laboratori, i no es coneix doncs, la seva funció. El gen *YAL061W* es troba uns 500 pb de la regió 5'UTR del gen *BDH1*, i és probable que la seva substitució pel marcador *kanMX4* hagi eliminat llocs de regulació que es trobin més enllà de la zona promotora del gen, i ja en la zona codificant del gen *YAL061W*. Serien necessaris estudis d'expressió gènica a nivell de Northern Blot, o RT-PCR quantitativa si es vol conèixer de manera més específica el paper que jugaria el gen *YAL061W* sobre la regulació del gen *BDH1*.

4.3 Producció dels diferents isòmers de l'acetoïna i del 2,3-butanodiol durant la fermentació alcohòlica. Funció de la Bdh1p.

Neish (1950) va fer un estudi sobre la composició dels estereoisòmers del 2,3-butanodiol produïts durant la fermentació alcohòlica, i Tittel i Radler al 1979 van purificar parcialment una acetoïna reductasa amb característiques similars a la Bdh1p, que reduïa l'acetoïna a 2,3-butanodiol. Cap dels dos però, va determinar quin enzim produïa el 2,3-butanodiol *in vivo*.

Més recentment s'ha estudiat l'acumulació d'acetoïna, de 2,3-butanodiol i els seus isòmers durant la fermentació alcohòlica per part de soques de llevat vinícoles. *S. cerevisiae* presenta un fenotip de baixa acumulació d'acetoïna (entre 2 i 20 mg/l) (Romano i cols., 1996) que es troba inversament relacionat amb una alta acumulació de 2,3-butanodiol (de 148 a 1053 mg/l). Aquest comportament és el mateix que hem pogut identificar en la soca silvestre FY834 (Figures 49 i 50) al llarg de la fermentació alcohòlica on s'acumula el 2,3-butanodiol i, en canvi, l'acetoïna es manté en nivells baixos i fins i tot disminueix a les 48 h indicant que s'ha reduït a 2,3-butanodiol. En aquest punt trobem que la concentració de l'isòmer (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol és d'aproximadament 4,7 mM, equivalent a uns 0,9 g/l, concentració molt semblant a les obtingudes per Romano i cols. (1998). S'ha demostrat que aquest patró d'acumulació d'acetoïna i 2,3-butanodiol és una característica de l'espècie *S. cerevisiae*, en contrast amb altres espècies de llevats presents també al vi com *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata* o *Metschnikowia pulcherrima* (Romano i cols., 1995, 2000, 2003).

Un anàlisi més exhaustiu de la producció dels isòmers de l'acetoïna i del 2,3-butanodiol ens indica que en la soca silvestre FY834 un 70,1% de l'acetoïna acumulada està en la forma *R* i un 29,9% en la forma *S*, mentre que els isòmers del 2,3-butanodiol es troben en una proporció de 80,7% de la forma *RR*, un 18,7% del *meso* i un 0,6% del *SS* a 48h. Aquests valors són iguals als determinats per Romano i cols. (2000, 2003), on a més d'estudiar *S. cerevisiae*, van avaluar altres espècies de llevat que es troben en vins com *K. apiculata*, *C. stellata* o *M. pulcherrima*. Aquests estudis indiquen que la producció d'isòmers de l'acetoïna i del 2,3-butanodiol són espècie específics, fet que concorda amb les diferents estereoespecificitats de les BDH presents en diferents llevats (Verduyn i cols., 1998a, Heidlas i Tressl, 1990a i González i cols., 2000).

La producció d'acetoïna per part de la PDC és una reacció estereoespecífica, on es forma un 64% de l'isòmer *R* i un 36% del *S* si la reacció es realitza a partir de l'acetaldehid, i un 77% en forma *R* i 23% en *S* si es realitza a partir de piruvat (Chen i Jordan, 1984). En la present tesi, la fermentació alcohòlica ha proporcionat un 70,1 % de l'isòmer *R* i 29,9% de l'isòmer *S*, pel que sembla que la producció d'acetoïna ha vingut tant de l'acetaldehid com del piruvat. Ambdós casos són possibles doncs durant la fermentació alcohòlica s'acumulen grans quantitats de piruvat i d'acetaldehid producte d'una glicòlisi molt activa (Pronk, 1996, Hohmann, 1997, Jones, 1989, Gancedo i Serrano, 1989).

En aquesta Tesi hem pogut demostrar que la producció de l'isòmer (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol *in vivo* depèn només de la Bdh1p (Figures 49 i 50), doncs la soca delecionada pel gen *BDH1*, soca EG2, no el produeix durant la fermentació alcohòlica. Els altres dos isòmers, *meso*-2,3-butanodiol i (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol, es sintetitzen independentment que hi hagi present la Bdh1p o no. Els gels tenyits per activitat AR i DR (Figura 27) demostren que altres enzims actius amb acetoïna i NADH o NADPH es troben presents en el llevat. Desconeixem quins enzims són responsables de l'acumulació d'aquests dos isòmers doncs ja sabem que ni l'Adh1p (Hardwick i cols., 1976) ni l'Adh2p (present treball) són capaços de reduir l'acetoïna. Les dues oxidoreductases actives amb diacetil i acetoïna purificades de *S. cerevisiae* (Heidlas i Tressl, 1990b), podrien ser candidates per aquesta funció.

La delecio del gen *BDH1* provoca, a més, que s'acumulin grans quantitats d'acetoïna al medi indicant que el principal enzim responsable de la reducció d'aquesta és la Bdh1p i que els enzims que formen el *meso*-2,3-butanodiol i (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol no són tant actius amb l'acetoïna com ho és la Bdh1p. Així, determinades soques de *S. cerevisiae* productores d'altres quantitats d'acetoïna i baix nivell de 2,3-butanodiol en vins, podrien tenir alguna alteració en el gen *BDH1* doncs el seu fenotip (Romano i cols., 1995) és similar a l'obtingut per la soca EG2 (Figures 49 i 50).

També cal remarcar que els enzims Yal061p i Adh2p no participen en el metabolisme de l'acetoïna ni del 2,3-butanodiol durant la fermentació alcohòlica perquè la delecio dels corresponents gens no afecta a la producció dels diferents isòmers (Figura 50).

Així, podem concloure que la Bdh1p participa en la via metabòlica de la producció del 2,3-butanodiol durant la fermentació alcohòlica representada en la Figura 73. D'aquesta manera, la Bdh1p reduiria l'acetoïna formada per la piruvat descarboxilasa per excés de piruvat i acetaldehid en la cèl·lula, a més de reduir el diacetil a acetoïna i 2,3-butanodiol quan aquell es forma per descarboxilació de l' α -acetolactat.

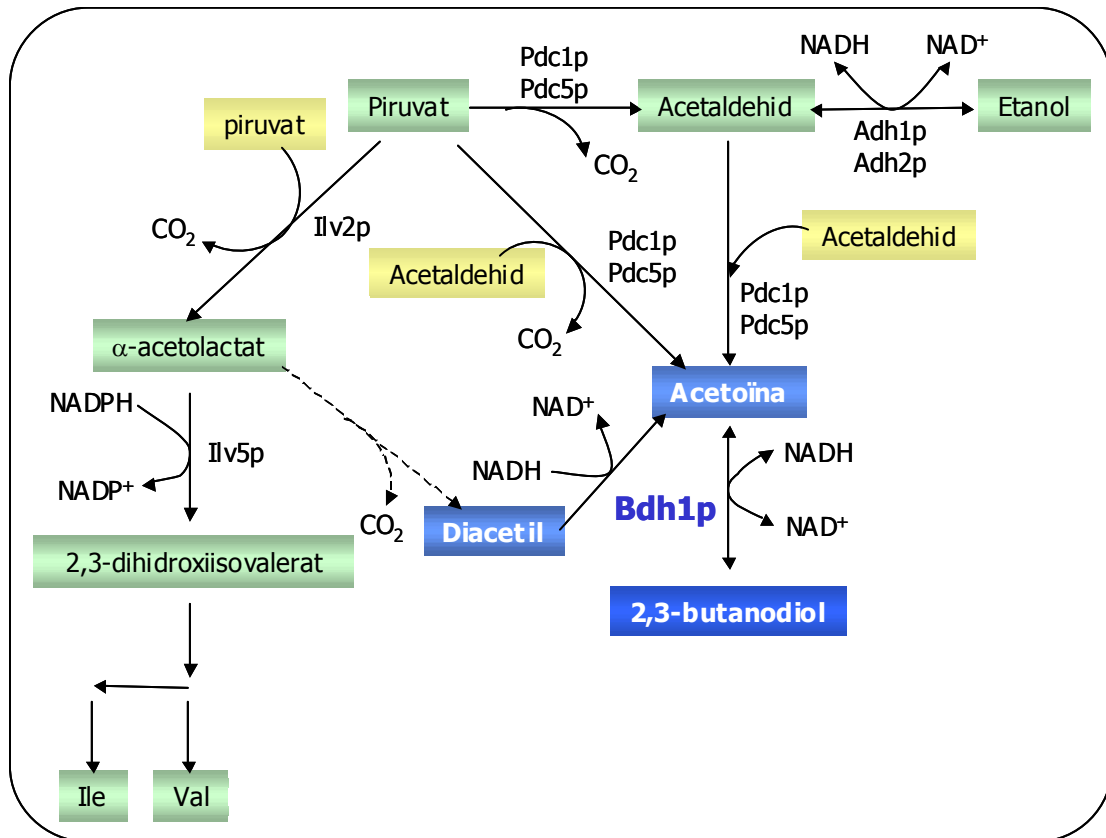


Figura 73: Vies de producció de l'acetoïna i el 2,3-butanodiol durant la fermentació alcohòlica. A la figura es mostra que la piruvat descarboxilasa (isoenzims Pdc1p i Pdc5p) sintetitzen acetoïna a partir de 2 molècules d'acetaldehid o des d'una de piruvat i una d'acetaldehid (Chen i Jordan, 1984). El diacetil es forma per descarboxilació espontània (--) de l' α -acetolactat (Suomalainen i Ronkainen, 1968). El diacetil es pot reduir a acetoïna i 2,3-butanodiol per acció de la Bdh1p. Figura modificada de González i cols., 2000.

El paper de la Bdh1p en la producció del (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol ha quedat demostrat *in vivo* amb el mutant deletat pel gen *BDH1*, però altres evidències ens confirmen aquesta funció de l'enzim. La Bdh1p presenta la major especificitat de substrat envers l'acetoïna ($k_{cat}/K_m = 21.700 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), així com una K_m baixa per el NADH ($K_m = 0,055 \text{ mM}$). En canvi, l'eficiència catalítica per el (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol és menor ($k_{cat}/K_m = 5.600 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), i la K_m per el NAD⁺ és més gran ($K_m = 0,55$

mM). Això suggereix que l'enzim actuaria com reductasa en la cèl·lula. Per altra part s'ha demostrat que la Bdh1p redueix l'acetoïna de manera estereoespecífica sintetitzant els isòmers (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol i *meso*-2,3-butanodiol i que no forma l'isòmer (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol. I és precisament l'isòmer (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol el més abundant durant la fermentació alcohòlica.

L'equilibri NADH/NAD⁺ es veu alterat durant la fermentació alcohòlica on hi ha la producció d'un excés de NADH que necessita ser reoxidat, ja sigui per la producció d'etanol, o a través de la producció de glicerol entre altres reaccions (apartat 4.3 de la Introducció). Per tant, ens trobem en un medi amb excés de NADH, que afavoreix que es realitzi la reacció de reducció de l'acetoïna per part de la Bdh1p. Altres autors ja han descrit el paper de la butanodiol deshidrogenasa de *S. cerevisiae* com un enzim important per mantenir l'ajust fi del balanç redox durant la fermentació. Un canvi en la via de producció de glicerol comporta una acumulació al medi de 2,3-butandiol provocada per l'acumulació d'acetaldehid, que la Pdcp utilitza per sintetitzar acetoïna (Michnick i cols., 1997, Björkqvist i cols., 1997, Remize i cols., 1999).

Però el paper de la Bdh1p durant la fermentació alcohòlica quedaria en entredit si es té en compte que l'enzim presenta repressió per glucosa. Per contra, la Bdh1p és un enzim molt actiu, amb una activitat específica de 968 U/mg amb (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol i una *k*_{cat} per l'acetoïna de 98.000 min⁻¹, el que comportaria que encara que l'expressió sigui baixa, la seva activitat podria ser suficient per a que la producció de 2,3-butanodiol no es vegi afectada. L'acumulació de 2,3-butanodiol durant el creixement de la soca FY834 en glucosa al 20%, així com el creixement de la soca FY61, de baixa activitat Bdh1p, recolzen aquesta hipòtesi.

Una BDH amb estereoespecificitat similar a la Bdh1p descrita prèviament (Heidlas i Tressl, 1990a), no s'ha detectat en gels tenyits per activitat BDH, on només apareix la banda específica de la Bdh1p (Figura 27). La purificació de la primera BDH es va realitzar a partir de llevat obtingut de Versuchs und Lehranstalt für Spiritusfabrikation, Berlin, i no es va mencionar la soca utilitzada. Per l'estudi del metabolisme del 2,3-butanodiol i del diacetil és molt important la font de llevat usada, doncs es coneix que l'activitat diacetil reductasa depenent de NADH varia segons la soca, i les de cerveseria poden expressar enzims diferents per metabolitzar aquests compostos (Murphy i cols.,

1996). És raonable pensar que l'enzim de Heidlas i Tressl s'expressaria en la soca utilitzada per aquests autors, però no en la soca FY834 utilitzada en aquesta Tesi.

5. Aplicacions biotecnològiques de la Bdh1p a la indústria cervesera.

5.1 Modificació genètica de la soca industrial cervesera SID.

Un dels problemes de la producció de la cervesa es mantenir certs compostos organolèptics com el diacetil i la 2,3-pentanodiona a concentracions molt baixes. Tenint en compte que aquests compostos (productes secundaris de la via de síntesi dels aminoàcids ramificats valina i isoleucina, figura 9) són substrats de la Bdh1p, es va fer la hipòtesi que la sobreexpressió de l'enzim en una soca industrial cervesera acceleraria el procés d'eliminació d'aquests compostos en la fabricació de cervesa.

El primer pas que es va desenvolupar per testar la nostra hipòtesi va ser sobreexpressar la Bdh1p en vectors seleccionables per geneticina. Es va obtenir un resultat positiu esperançador quan es va realitzar la fermentació de most industrial amb la soca SID que contenia el vector centromèric pRSMXY0 que sobreexpressava la Bdh1p. Aquesta soca presentava nivells inferiors de diacetil i 2,3-pentanodiona respecte la soca control, nivells baixos que es mantingueren al llarg de tota la fermentació. Això ens va servir com a punt de partida per poder-nos plantejar modificar genèticament la soca de llevat industrial de manera que la sobreexpressió de l'enzim no es perdés amb el temps i les diferents generacions.

S'ha utilitzat un mètode de modificació genètica de soques industrials adaptat de l'aplicació presentada per Güldener i cols. (1996), que aprofita el sistema de recombinació Cre-*loxP* del bacteriòfag P1. Hem aconseguit expressar de manera permanent la Bdh1p sota el control del promotor fort del gen *ADH1* en la soca industrial SID (Figures 68 i 69). La construcció, a més, es troba organitzada correctament, de manera que en la seqüenciació es distingeixen totes les seqüències originals: l'extrem 5' del *locus URA3*, la regió del vector pUG6 que conté una seqüència *loxP* que no s'elimina després de la recombinació, el promotor de l'*ADH1*, el gen *BDH1*, el terminador *ADH1* i l'extrem 3' del *locus URA3* (Figura 67). En la soca modificada només queda una

seqüència aliena al llevat que és la regió de la seqüència *loxP*. Aquest fet és rellevant en un possible context d'alguna aplicació posterior per a la indústria destinada al consum humà. En aquest protocol de modificació es coneix la seqüència i l'origen de la regió de 34 parells de bases (*loxP*) que es conserven en la soca final, així com també es coneix l'origen d'aquesta seqüència i les condicions en que s'ha introduït en el llevat. Aquestes soques modificades expressen la *Bdh1p* de manera estable, sense perdre la intensitat de l'expressió durant la fermentació de most industrial (Figura 71).

L'avantatge del nou protocol aquí utilitzat és la direccionalitat de la integració en el genoma, doncs es pot insertar en qualsevol *locus* que es desitgi. A més, el pas d'integració del casset d'expressió en la soca de laboratori ens ha servit de control en un ambient genètic controlat, doncs moltes soques industrials són poliploides i poden provenir de fusions d'espècies diferents (Boulton i Quain, 2001).

Hem comprovat que l'expressió de la *Bdh1p* en les soques que porten integrat el casset d'expressió al seu genoma és menor que en les mateixes soques que l'expressen en vectors, tant en la soca de laboratori com en la soca industrial SID. Si comparem l'expressió del gen *BDH1* entre les soques S288C[pRSMXY0] i SCU60 veiem que la diferència en l'expressió pot estar afectada pel context cromosòmic on es troba. Quan l'expressió es realitza en el vector, el promotor del gen *ADH1* no té cap altra seqüència de DNA en posició 5', en canvi, la soca modificada es troba en el context del gen *URA3*, el promotor del qual no s'ha modificat. És ben conegut que la regulació de l'expressió gènica en llevat (i en eucariotes en general) conté, a més dels elements reguladors de les regions més properes a l'inici de la transcripció, elements reguladors en *cis* (Hinnebusch, 1992). En el cas del gen *URA3*, la seva expressió es veu activada en condicions d'escassetat de pirimidines al medi mitjançant l'activador Ppr1p (Flynn i Reece, 1999), situació que no es presenta quan ens trobem en medis rics. Es podria hipotetitzar que la regulació del gen *URA3* afecta l'expressió de la *Bdh1p* sota el control del promotor fort *ADH1*, doncs l'expressió disminueix quan integrem el casset d'expressió en el genoma de les dues soques. Aquesta repressió no es detecta quan l'expressió es fa en vectors sense la influència de les seqüències reguladores gèniques. És clar que el context genètic de cada soca influeix en l'expressió dels diferents gens. Hem comprovat que a més de les diferències d'expressió del gen *BDH1* esmentades abans, també trobem diferències d'expressió segons la soca. Així, l'expressió de la

Bdh1p era menor en tots els casos (vectors i integració) quan es realitzava en la soca SID respecte la soca de laboratori S288C.

L'objectiu de modificar soques de llevat cerveser per eliminar el diacetil produït durant la fermentació ja s'havia intentat per diferents mètodes i amb diferents enzims. Així, Mithieux i Weiss (1995) van integrar múltiples còpies del gen *ILV5* amplificades per PCR al seu mateix *locus*. Goossens i cols. (1991 i 1993) van utilitzar un vector integratiu per sobreexpressar el gen *ILV5*, però necessitaven mantenir la pressió selectiva per no perdre'l al llarg de les generacions. Altres aproximacions realitzades per introduir DNA en soques industrials cerveseres han estat integrar el gen bacterià que codifica per l' α -acetolactat descarboxilasa en el *locus* del DNA ribosòmic (Fuji i cols., 1990, i Blomqvist i cols., 1991, Yamano i cols., 1994a i b), o en el *locus ADH1* (Onnela i cols., 1996), per recombinació homòloga. En aquests últims casos la seqüència introduïda era bacteriana tot i que la recombinació no deixés restes de vectors en el llevat modificat.

5.2 L'expressió de la Bdh1p en la soca industrial SID no disminueix els nivells de diacetil i 2,3-pentanodiona durant la fermentació de most de 15^oP.

S'ha estudiat l'acumulació de diacetil, 2,3-pentanodiona (VDKs) i acetoïna durant la fermentació de most industrial de 15^oP amb diferents soques. En cap d'elles però, hi ha hagut variacions importants dels nivells d'aquests compostos.

El comportament de les soques modificades durant la fermentació de most va ser diferent, tant per la soca de laboratori com per la industrial. En ambdós casos les soques modificades presentaven una floculació retardada respecte les respectives soques control (Figures 70 i 72). En canvi, en les S288C i SCU60 no canviava ni la producció d'alcohol ni la taxa de disminució de l'extracte aparent (Figura 70). Per la soca SIDU60.4 la taxa de producció d'alcohol i de consum de sucres era més lenta tot i que s'arribés al mateix punt final que la soca control sense modificar SID (Figura 72). Però, cap de les dues soques modificades presentaven nivells de VDKs ni d'acetoïna diferents a les soques control. S'ha descrit que la floculació depèn de molts factors, ja siguin extracel·lulars o genètics. El principal factor proposat és l'absència de glucosa, sucrosa i maltosa en el medi, per tant quan es consumeixen els sucres del most s'indueix la floculació de les cèl·lules al fons del tanc de fermentació en el cas de les soques cerveseres tipus *lager* (Verstrepen i cols., 2003). En el nostre cas, sembla que la

soca SIDU60.4 té tendència a consumir els sucres més lentament (disminució més lenta de l'extracte aparent, figura 72) i aquest fet podria explicar el retard en la floculació que s'observa per aquesta soca.

L'expressió de la Bdh1p és constant en presència de most industrial, com a mínim en la soca SCU60 (Figura 71), i en aquesta soca l'activitat específica de la Bdh1p és similar a la que trobem en la soca SID[pRSMXY0]. Però mentre que una petita disminució de VDKs s'observa en les fermentacions de la soca SID[pRSMXY0], no hi ha variació en les de la SIDU60.

Hi ha diferents factors que poden explicar el poc efecte que ha tingut la sobreexpressió de la Bdh1p, en aquest cas, sobre els nivells de les VDKs. En primer lloc la baixa expressió assolida en les soques modificades i en segon lloc les pròpies característiques cinètiques de la Bdh1p. Ni el diacetil ni la 2,3-pentanodiona no saturen l'enzim i per tant la seva activitat amb aquests substrats és major a mida que augmenta la seva concentració. És possible que els nivells màxims que s'assoleixen durant la fermentació de most de 15°P, aproximadament $\sim 5,6 \mu\text{M}$ pel diacetil, siguin insuficients per a una efectiva acció de l'enzim que no s'arriba a saturar amb aquest substrat. Però tenint en compte els resultats positius obtinguts amb la soca que sobreexpressava l'enzim mitjançant vectors, cal pensar que els nivells d'expressió de l'enzim són els determinants per produir una disminució de les VDKs durant la fermentació. Els nivells d'activitat específica de la Bdh1p en la soca SID[pRSMXY0] són molt més alts que en la SIDU60 (1,82 U/mg *vs.* 0,2 U/mg respectivament). Probablement si s'haguessin assolit nivells d'expressió en la soca de llevat modificada similars als que vam obtenir mitjançant el vector pRSMXY0, es podria haver aconseguit disminuir les VDKs durant la fermentació de most.

Es pot concloure que la sobreexpressió de la Bdh1p en la soca de llevat industrial no ha disminuït significativament els nivells de diacetil, 2,3-pentanodiona o acetoïna durant la fermentació de most industrial. Però l'objectiu plantejat ens ha permès posar a punt un sistema de modificació genètica de soques de llevat industrial sense incloure cap element genètic aliè (excepte la seqüència *loxP* de 34 pb), que es pot aplicar a qualsevol altre projecte, com per exemple el de sobreexpressar altres enzims implicats en el metabolisme del diacetil.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1) S'ha clonat el gen *YAL060W* de *Saccharomyces cerevisiae* i s'ha identificat l'activitat 2,3-butanodiol deshidrogenasa (activitat BDH) del seu producte gènic en extractes de llevat. El gen s'ha anomenat *BDH1* i la proteïna Bdh1p.

2) L'anàlisi de la seqüència proteica de la Bdh1p l'identifiquen com a membre de la superfamília enzimàtica les alcohol deshidrogenases/reductases de cadena mitja (MDR), dins de la família de les poliol deshidrogenases (PDH). La longitud de la seva cadena polipeptídica (382 aminoàcids) i la posició de glicines en posicions importants pel plegament proteic són característiques de les MDR. Els tres lligands del zinc catalític són Cys39 i His73, i el tercer lligand podria ser Glu74 o Glu 173. L'enzim també presenta 4 cisteïnes que poden unir un segon àtom de Zn, a més del residu Glu221, que donaria especificitat envers el NAD(H) en preferència sobre el NADP(H). Com a diferència característica, la Bdh1p, presenta una inserció de 14 residus entre les cisteïnes d'unió al zinc estructural. Aquesta és la primera MDR amb activitat butanodiol deshidrogenasa caracteritzada d'un organisme eucariota.

3) S'ha purificat fins a la homogeneïtat la Bdh1p de *S. cerevisiae*. És un enzim de 82.000 Da format per dues subunitats de 41.000 Da. Presenta un pI de 6,9, és inestable en solució i s'estabilitza amb glicerol.

4) La Bdh1p presenta una de les activitats específiques (968 U/mg) més altes dins els enzims coneguts amb activitat butanodiol deshidrogenasa (BDH). El millor substrat és l'acetoïna amb una eficiència catalítica de $21.700 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. El millor substrat per a la oxidació és el (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol. Els seus substrats contenen grups diol en posició 1,2 o 2,3, preferint els secundaris i de 4 carbonis, així com els compostos que contenen grups dicetones o hidroxicetones contigus. En aquest aspecte, no difereix de la resta de BDH descrites, encara que siguin d'altres famílies enzimàtiques com les SDR.

5) L'enzim Bdh1p és estereoespecífic per a la reducció de grups cetona a grups alcohol en configuració *R*, i per a la oxidació de grups alcohol en configuració *R*. A més, l'activitat depèn de la configuració en que es troba el grup contigu essent major si està en configuració *R*.

6) Diacetil i 2,3-pentanodiona, compostos organolèptics importants produïts durant la producció de cervesa, són substrats de la Bdh1p, però no saturen l'enzim.

7) S'ha detectat un altre enzim amb activitat diacetil reductasa en homogenats de llevat que s'ha identificat com l'alcohol deshidrogenasa II (o Adh2p). L'Adh2p és activa amb diacetil i 2,3-pentanodiona, però no ho és amb l'acetoïna o el 2,3-butanodiol. L'activitat amb aquests compostos és entre 25 i 50 vegades menor que la d'oxidació de l'etanol.

8) La reacció de l'Adh2p amb el diacetil i la 2,3-pentanodiona també és estereoespecífica, però al contrari de la Bdh1p, la reducció d'un dels grups carbonil del diacetil resulta en la formació de l'alcohol en configuració *S*.

9) La Bdh1p s'expressa preferentment en absència de glucosa, així la seva activitat augmenta quan la glucosa s'esgota del medi. L'expressió màxima de la Bdh1p s'assoleix quan s'afegeix 2,3-butanodiol al medi, tot i que no sigui una bona font de carboni.

10) La deleció del gen *BDH1* elimina l'activitat acetoïna reductasa dels homogenats de *S. cerevisiae*, indicant que la Bdh1p és la major responsable de la reducció de l'acetoïna a 2,3-butanodiol. La deleció del gen *YAL061W* disminueix l'activitat acetoïna reductasa i diacetil reductasa, en canvi la deleció del gen *ADH2* només disminueix l'activitat diacetil reductasa.

11) La Bdh1p és responsable de la reducció de l'acetoïna, sintetitzada per la piruvat descarboxilasa durant la fermentació, a l'isòmer (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol. Durant la fermentació es sintetitza un 70,1% de *R*-acetoïna i un 29,9 % de la *S*-acetoïna. El 2,3-butanodiol s'acumula al llarg del temps en proporcions de 80,7% (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol, 18,7% de *meso*-2,3-butanodiol i 0,6% de (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol. Ni la deleció del gen *ADH2*, ni el *YAL061W* afecten al patró d'acumulació de 2,3-butanodiol o acetoïna, indicant que no participen en el metabolisme d'aquests compostos en les condicions de creixement assajades.

12) Amb l'objectiu d'accelerar l'eliminació de diacetil i 2,3-pentanodiona (VDKs), compostos amb propietats organolèptiques desagradables, durant la producció de cervesa, s'ha aconseguit sobreexpressar la Bdh1p en una soca de llevat industrial

cerveser mitjançant dos tipus de vectors: centromèric i multicòpia. L'expressió en aquesta soca és menor que la obtinguda en la soca de laboratori S288C.

13) La soca industrial que sobreexpressa la Bdh1p mitjançant el vector centromèric pRSMXY0 produeix nivells significativament més baixos de VDKs que la soca control al llarg de la fermentació. En canvi la soca de sobreexpressió de la Bdh1p en el vector multicòpia pAAY0RMX només presenta nivells de VDKs més baixos al final de la fermentació.

14) S'ha aconseguit modificar genèticament una soca industrial cervesera i la soca de laboratori S288C de manera estable introduint, per recombinació homòloga, el gen *BDH1* sota el control del promotor fort del gen *ADH1* en el *locus URA3*. Aquestes soques presenten nivells d'expressió de la Bdh1p menors que les corresponents soques que l'expressen des de vectors.

15) L'anàlisi de la cervesa jove produïda amb les soques modificades indica que no s'ha aconseguit disminuir els nivells de VDKs i acetoïna acumulats durant la fermentació.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

A

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389-3402.

Ammerer, G. (1983). Expression of genes in yeast using the *ADC1* promoter. *Methods in Enzymology*, **101**, 192-201.

Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M. and Adler, L. (1997). The two isoenzymes for yeast NADH⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *The EMBO Journal*, **16**, 2179-2187.

B

Bakker, B.M., Bro, C., Kötter, P., Luttk, M.A.H., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T. (2000). The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **182 (17)**, 4730-4737.

Bakker, B.M., Overkamp, K.M., van Maris, A.J.A., Kötter, P., Luttk, M.A.H., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**, 15-37.

Bandfield, M.J., Salvucci, M.E., Baker, E.N. and Smith, C.A. (2001). Crystal structure of the NADP(H)-dependent ketose reductase from *Bemisia argentifolii* at 2.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **306**, 239-250.

Becker, D.M. and Lundblad, V. (1994). Introduction of DNA into yeast cells. In: Current Protocols in Molecular Biology 2 (Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., eds.), pp. 13.7.1-13.7.2, John Wiley and Sons, Inc.

Berben, G., Du Mont, J., Egilliquet, V., Bolle, P.-A. and Hilger, F. (1991). The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **7**, 475-477.

Björkqvist, S., Ansell, R., Adler, L. and Lidén, G. (1997). Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63 (1)**, 128-132.

Blázquez, M. (1998). *Tesina de llicenciatura* (UAB): Tècniques de separació de les ribonucleases de plasma humà: activitat ribonucleasa latent activable per rHMB.

Blomqvist, K., Suihko, M., Knowles, J. and Penttila, M.E. (1991). Chromosomal integration and expression of two bacterial α -actolactate decarboxylase genes in brewer's yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, **57 (10)**, 2796-2803.

Blomqvist, K., Nikkola, M., Lehtovaara, P., Suihko, M., Airaksinen, U., Straby, K., Knowles, J. and Penttila, M.E. (1993). Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology*, **175**, 1392-1404.

Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.

Boulton, C. and Quain, D. (2001). *Brewing yeast and fermentation* (Blackwell Science Ltd, ed.) Blackwell Science Ltd., Oxford, U.K.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.

C

Camarasa, C., Grivet, J.-P. and Dequin, S. (2003). Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology*, **149**, 2669-2678.

Chen, G.C. and Jordan, F. (1984). Brewer's yeast pyruvate decarboxylase produces acetoin from acetaldehyde: a novel tool to study the mechanism of steps subsequent to carbon dioxide loss. *Biochemistry*, **23**, 3576-3582.

Ciriacy, M. (1975). Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADHII. *Molecular and General Genetics*, **138 (2)**, 157-164.

Ciriacy, M. (1976). Cis-dominant regulatory mutations affecting the formation of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADHII) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, **145 (3)**, 327-333.

Ciriacy, M. (1997). Chapter 12: Alcohol dehydrogenases. In: *Yeast Sugar Metabolism. Biochemistry, genetics, biotechnology and applications* (Zimmermann, F.K. and Entian, K.-D., eds.), pp. 213-223, Technomic Publishing CO., Inc.

Clayton, R.A., White, W., Ketchum, K.A. and Venter, J.C. (1997). The first genome from the third domain of life. *Nature*, **387**, 459-462.

Conway, T., Sewell, G.W., Osman, Y.A. and Ingram, L.O. (1987). Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*, **169**, 2591-2597.

D

Deng, W.-L., Chang, H.-Y. and Peng, H.-L. (1994). Acetoin catabolic system of *Klebsiella pneumoniae* CG43: sequence, expression, and organization of the *aco* operon. *Journal of Bacteriology*, **176**, 3527-3535.

Denis, C.L. and Young, E.T. (1983). Isolation and characterization of the positive regulatory gene *ADR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **3**, 360-370.

Denis, C.L., Ferguson, J. and Young, E.T. (1983). mRNA levels for the fermentative alcohol dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* decrease upon growth on a nonfermentable carbon source. *The Journal of Biological Chemistry*, **258 (2)**, 1165-1171.

Dickinson, F.M. and Dack, S. (2001). The activity of yeast ADH I and ADH II with long-chain alcohols and diols. *Chemico-Biological Interactions*, **130-132**, 417-423.

Drewke, C., Ciriacy, M. (1988). Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **950 (1)**, 54-60.

Drewke, C., Thielen, J., Ciriacy, M. (1990). Ethanol formation in *adh0* mutants reveals the existence of a novel acetaldehyde-reducing activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **172 (7)**, 3909-3917.

Drum, D.E., Li, T.-K. and Vallee, B.L. (1969). Considerations in evaluating the zinc content of horse liver alcohol dehydrogenase preparations. *Biochemistry*, **8 (9)**, 3783-3791.

E

Ebisuzaki, K. and Guzman Barros, E.S. (1957). Yeast alcohol dehydrogenase II. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **69**, 555-564.

EBC, European Brewing Convention (1998). Procediments de l'empresa S.A. Damm actualitzats segons la normativa europea. Protocols utilitzats: 4.5.1., 8.3, 9.4 i 9.24.2.

Edwards, K.J., Barton, J.D., Rossjohn, J., Thorn, J.M., Taylor, G.L. and Ollis, D.L. (1996). Structural and sequence comparisons of quinone oxidoreductase, ξ -crystallin, and glucose and alcohol dehydrogenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **328 (1)**, 173-183.

Eklund, H., Nordström, B., Zeppezauer, E., Söderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., Söderberg, B.O., Tapia, O., Brändén, C.-I. and Åkeson, Å. (1976). Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **102**, 27-59.

Eklund, H. and Brändén, C.-I. (1987). Alcohol dehydrogenase. In: *Biological Macromolecules and Assemblies* (Jurnak, F.A. and McPherson, A. eds.), pp. 73-142, John Wiley and Sons, Inc., London.

F

Falstenstein, J. (1989). PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, **5**, 164-166.

Fernández, M.R., Biosca, J.A., Norin, A., Jörnvall, H. and Parés, X. (1995). Class III alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: structural and enzymatic features differ toward the human/mammalian forms in a manner consistent with functional needs in formaldehyde detoxication. *FEBS Letters*, **370 (1-2)**, 23-26.

Fernández, M.R. (1998). Estudios funcionales y estructurales de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona.

Fernández, M.R., Biosca, J.A. and Parés, X. (2003). S-nitrosoglutathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localisation. *Cellular and Molecular Life Science*, **60**, 1013-1018.

Flikweert, M.T., van der Zanden, L., Janssen, W.M.TH., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T. (1996). Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast*, **12**, 247-257.

Flikweert, M.T., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T. (1997). Metabolic responses of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* to glucose excess. *Applied and Environmental Microbiology*, **63 (9)**, 3399-3404.

Flynn, P.J. and Reece, R.J. (1999). Activation of transcription by metabolic intermediates of the pyrimidine biosynthetic pathway. *Molecular and Cellular Biology*, **19 (1)**, 882-888.

Ford, G. and Ellis, E.M. (2002). Characterization of Ypr1p from *Saccharomyces cerevisiae* as a 2-methylbutyraldehyde reductase. *Yeast*, **19**, 1087-1096.

Fuji, T., Kondo, K., Shimizu, F., Sone, H., Tanaka, J.-I. and Inoue, T. (1990). Application of a ribosomal DNA integration vector in the construction of a brewer's yeast having α -actolactate decarboxylase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, **56 (4)**, 997-1003.

G

Gancedo, C. and Serrano, R. (1989). Energy-yielding metabolism. In: *The Yeasts*. Vol. 3. Metabolism and Physiology of Yeasts (Rose, A.H. and Harrison, J.S., eds.), pp. 205-259, Academic Press, New York.

Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62** (2), 334-361.

Ganzhorn, A.J., Green, D.W., Hershey, A.D., Gould, R.M., and Plapp, B.V. (1987). Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. Amino acid residue 294 and substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, **262** (8), 3754-3761.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Nature*, **274**, 563-567.

González, E., Fernández, M.R., Larroy, C., Solà, L., Pericàs, M.A., Parés, X. and Biosca, J.A. (2000). Characterization of a (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060*W* gene product. Disruption and induction of the gene. *The Journal of Biological Chemistry*, **275** (46), 35876-35885.

González, E., Fernández, M.R., Larroy, C., Parés, X. and Biosca, J.A. (2001). Characterization and functional role of *Saccharomyces cerevisiae* 2,3-butanediol dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions*, **130-132**, 425-434.

Gosh, D., Sawicki, M., Pletnev, V., Erman, M., Ohno, S., Nakajin, S. and Duax, W.L. (2001). Porcine carbonyl reductase: structural basis for a functional monomer in short chain dehydrogenases/reductases. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 18457-18463.

Goossens, E., Debourg, A., Villanueva, K.D. and Masschelein, C.A. (1991). Decreased diacetyl production by site directed integration of the *ILV5* gene into chromosome XIII of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Brewery Convention. Proceedings of the Congress*, **23rd**, 289-296.

Goossens, E., Debourg, A., Villanueva, K.D. and Masschelein, C.A. (1991). Decreased diacetyl production in lager brewing yeast by integration of the *ILV5* gene. *European Brewery Convention. Proceedings of the Congress*, **24th**, 251-258.

Griffin, D.R., Gainer, J.L. and Carta, G. (2001). Asymmetric ketone reduction with immobilized yeast in hexane: biocatalyst deactivation and regeneration. *Biotechnology Progress*, **17**, 304-310.

Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J.H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, **24** (13), 2519-2524.

H

Hardwick, B.C., Donley, J.R. and Bishop Jr., G. (1976). The interconversion of vicinal diketones and related compounds by brewer's yeast enzymes. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **34**, 65-67.

Heidlas, J. and Tressl, R. (1990a). Purification and characterization of a (*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, **154**, 267-273.

Heidlas, J. and Tressl, R. (1990b). Purification and properties of two oxidoreductases catalysing the enantioselective reduction of diacetyl and other ketones from baker's yeast. *European Journal of Biochemistry*, **188**, 165-174.

Hinnebusch, A.G. (1992). General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular and Cellular*

Biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Volume 2. Gene Expression. (Jones, E.W., Pringle, J.R. and Broach, J.R., eds.), pp. 319-414, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

Hoffman, C.S. (1997). Preparation of yeast DNA, RNA, and proteins. Preparation of yeast DNA. In: Current Protocols in Molecular Biology 2 (Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., eds.), pp. 13.11.1-13.11.4, John Wiley and Sons, Inc.

Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272.

Hohmann, S. (1997). Chapter 11: Pyruvate Decarboxylases. In: Yeast Sugar Metabolism. Biochemistry, genetics, biotechnology and applications (Zimmermann, F.K. and Entian, K.-D., eds.), pp. 187-211, Technomic Publishing CO., Inc.

Huang, M., Oppermann, F.B. and Steinbüchel, A. (1994). Molecular characterization of the *Pseudomonas putida* 2,3-butanediol catabolic pathway. *FEMS Microbiology Letters*, **124**, 141-150.

Huang, M., Oppermann, F.B. and Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway. *Journal of bacteriology*, **181 (12)**, 3837-3841.

Hummel, W. (1997). New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **58**, 145-184.

I

Iborra, F.J., Renau-Piqueras, J., Portolés, M., Boleda, M.D., Guerri, C. and Parés, X. (1992). Immunocytochemical and biochemical demonstration of formaldehyde dehydrogenase (class III alcohol dehydrogenase) in nucleus. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **40**, 1865-1878.

J

Jensen, D.E., Belka, G.K. and Du Bois, G.C.S. (1998). S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemical Journal*, **331 (Pt 2)**, 659-668.

Johansson, K., El-Ahmad, M., Kaiser, C., Jörnvall, H., Eklund, H., Höög, J.-O. and Ramaswamy, S. (2001). Crystall structure of sorbitol dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions*, **130-132**, 351-358.

Jones, R.P. (1989). Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, **11**, 130-153.

Jörnvall, H., Persson, B. and Jeffery, J. (1987). Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry*, **167 (2)**, 195-201.

Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffery, J. and Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, **34 (18)**, 6003-6013.

Julià, P. (1987). Caracterització dels isoenzims de l'alcohol deshidrogenasa de rata. Tesi Doctoral, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona.

K

Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H. and Persson, B. (2002a). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 4409-4417.

Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H. and Persson, B. (2002b). Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: a large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes. *Protein Science*, **11**, 636-641.

Karlsson, C. and H., Höög, J.-O. (1993). Zinc coordination in mammalian sorbitol dehydrogenase: replacement of putative zinc ligands by site-directed mutagenesis. *European Journal of Biochemistry*, **216**, 103-107.

Karlsson, C., Jörnvall, H. and Höög, J.-O. (1995). Zinc binding of alcohol and sorbitol dehydrogenases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **372**, 397-406.

Krüger, N., Oppermann, F.B., Lorenzl, H. and Steinbüchel, A. (1994). Biochemical and molecular characterization of the *Clostridium magnum* acetoin dehydrogenase enzyme system. *Journal of Bacteriology*, **176**, 3614-3630.

L

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Larroy, C., Fernández, M.R., González, E., Parés, X. and Biosca, J.A. (2002a). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochemical Journal*, **361 (Pt 1)**, 163-172.

Larroy, C., Parés, X. and Biosca, J.A. (2002b) Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family. *European Journal of Biochemistry*, **269 (22)**, 5738-5745.

Legeay, O., Ratomahenina, R. and Galzy, P. (1989). Study of diacetyl reductase in a polyploid brewing strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**, 531-532.

Leskovac, V., Trivić, S. and Peričin, D. (2002). The three zinc-containing alcohol dehydrogenases form baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, **2**, 481-494.

López, J.M., Thoms, B. and Rehbein, H. (1975). Acetoin degradation in *Bacillus subtilis* by direct oxidative cleavage. *European Journal of Biochemistry*, **57**, 425-430.

Louis-Eugene, S., Ratomahenina, R. and Galzy, P. (1988). Enzymatic reduction of diacetyl by a strain of *Saccharomyces uvarum*. *Folia Microbiologica*, **33**, 38-44.

M

MacWilliam, I.C. (1968). Wort composition – a review. *Journal of the Institute of Brewing*, **74**, 38-54.

Magonet, E., Hayen, P., Delforge, D., Delaive, E. and Remacle, J. (1992). Importance of the structural zinc atom for the stability of yeast alcohol dehydrogenase. *Biochemical Journal*, **287**, 361-365.

Michnick, S., Roustán, J.-L., Remize, F., Barre, P. and Dequin, S. (1997). Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast*, **13**, 783-793.

Mithieux, S.M. and Weiss, A.S. (1995). Tandem integration of multiple *ILV5* copies and elevated transcription in polyploid yeast. *Yeast*, **11**, 311-316.

Mortimer, R.K. and Johnston, J.R. (1986). Genealogy of principal strains of the Yeast Genetic Stock Center. *Genetics*, **113**, 35-43.

Murphy, C.A., Large, P.J., Wadforth, C., Dack, S.J. and Boulton, C.A. (1996). Strain-dependent variation in the NADH-dependent diacetyl reductase activities of lager- and ale- brewing yeasts. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **23**, 19-22.

N

Neish, A.C. (1950). Note on the stereoisomers of 2,3-butanediol produced by yeast. *Canadian Journal of Research in Biology*, **28**, 660-661.

Nevoigt, E. and Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, **21**, 231-241.

Nissen, T.L., Schulze, U., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1997). Flux distribution in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **143**, 203-218.

Nissen, T.L., Anderlund, M., Nielsen, J., Villadsen, J. and Kielland-Brandt, M.C. (2001). Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. *Yeast*, **18**, 19-32.

Norbeck, J., Pålman, A.-K., Akhtar, N., Bloomberg, A. and Adler, L. (1996). Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 13875-13881.

Nordling, E., Jörnvall, H. and Persson, B. (2002). Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modelling. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 4267-4276.

O

Onnela, M.-L., Suihko, M.-L., Penttilä, M. and Keränen, S. (1996). Use of a modified alcohol dehydrogenase, *ADH1*, promoter in construction of diacetyl non-producing brewer's yeast. *Journal of Biotechnology*, **49**, 101-109.

Oppermann, F.B., Steinbüchel, A. and Schlegel, H.G. (1988). Utilization of methylacetoin by the strict anaerobe *Pelobacter carbinolicus* and consequences for the catabolism of acetoin. *FEMS Microbiology Letters*, **55**, 47-52.

Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B. and Jörnvall, H. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions*, **143-144**, 247-253.

P

Page, R.D.M. (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, 357-358.

Paquin, C.E. and Williamson, V.M. (1987). Homology of *Saccharomyces cerevisiae ADH4* to an iron-activated alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Molecular and General Genetics*, **209**, 374-381.

Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, **85**, 2444-2448.

Peralba, J.M., Cederlund, E., Crosas, B., Moreno, A., Julià, P., Martínez, S.E., Persson, B., Farrés, J., Parés, X. and Jörnvall, H. (1999). Structural and enzymatic properties of a gastric NADP(H)-dependent and retinal-activie alcohol dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 26021-26026.

Pereira, R.S. (1995). Baker's yeast: some biochemical aspects and their influence in biotransformations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **55**, 123-132.

Pereira, R.S., Pavão, F. and Oliva, G. (1998). The use of molecular modelling in the understanding of configurational specificity (R or S) in asymmetric reactions catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* or isolated dehydrogenases. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **178**, 27-31.

Persson, B., Zigler, J.S. and Jörnvall, H. (1994). A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including ζ -crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductases, enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. *European Journal of Biochemistry*, **226**, 15-22.

Persson, B., Krook, M. and Jörnvall, H. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **372**, 383-395.

Priefert, H., Hein, S., Krüger, N., Zeh, K., Schmidt, B. and Steinbüchel, A. (1991). Identification and molecular characterization of the *Alcaligenes eutrophus* H16 *aco* operon genes involved in acetoin catabolism. *Journal of Bacteriology*, **173**, 4056-4071.

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

Q

Querol, A., Fernández-Espinar, M.T., del Olmo, M. and Barrio, E. (2003). Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, **86**, 3-10.

R

Rahner, A., Schöler, A., Marten, E., Gollwitzer, B. and Schüller, H.-J. (1996). Dual influence of the yeast Cat1p (Snf1p) protein kinase on carbon source-dependent transcriptional activation of gluconeogenic genes by the regulatory gene *CAT8*. *Nucleic Acids Research*, **24**, 2331-2337.

Ramaswamy, S., Kratzer, D.A., Hershey, A.D., Rogers, P.H., Arnone, A., Eklund, H. and Plapp, V. (1994). Crystallization and preliminary crystallographic studies of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase I. *Journal of Molecular Biology*, **235** (2), 777-779.

Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M. and Entian, K.-D. (1997). Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Molecular and Cellular Biology*, **17**, 2505-2510.

Reid, M.F., and Fewson, C.A. (1994). Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Critical Reviews in Microbiology*, **20**, 13-56.

Remize, F., Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M., Barre, P. and Dequin, S. (1999). Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 143-149.

Remize, F., Andrieu, E. and Dequin, S. (2000). Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the cytosolic Mg²⁺ and mitochondrial K⁺ acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3151-3159.

Richard, P., Toiveri, M.H. and Penttilä, M. (1999). Evidence that the gene *YLR070c* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. *FEBS Letters*, **457** (1), 135-138.

Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A. and Piña, J.E. (1997). Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Archives of Medical Research*, **28**, 453-471.

Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Villalobos-Molina, R., Pardo, J.P. and Piña, J.E. (2003). Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *European Journal of Biochemistry*, **270**, 3309-3334.

Robertson, E.F., Dannelly, H.K., Mallory, P.J. and Reeves, H.C. (1987). Rapid isoelectrofocusing in a vertical polyacrilamide minigel system. *Analytical Biochemistry*, **167**, 290-294.

Romano, P., Suzzi, G., Mortimer, R., and Polsinelli, M. (1995). Production of high levels of acetoin in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts is a recessive trait. *Journal of Applied Bacteriology*, **78**, 169-174.

Romano, P., Suzzi, G., Brandolini, V., Menziani, E. and Domizio, P. (1996). Determination of 2,3-butanediol in high and low acetoin producers of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts by automated multiple development (AMD). *Letters in Applied Microbiology*, **22**, 299-302.

Romano, P., Paraggio, M. and Turbanti, L. (1998). Stability in by-product formation as a strain selection tool of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 336-341.

Romano, P., Palla, G., Caligiani, A., Brandolini, V., Maietti, A. and Salzano, G. (2000). Evaluation of stereoisomers of 2,3-butanediol and acetoin to differentiate *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* wine strains. *Biotechnology Letters*, **22**, 1947-1951.

Romano, P., Granchi, L., Caruso, M., Borra, G., Palla, G., Fiore, C., Ganucci, D., Caligiani, A. and Brandolini, V. (2003). The species-specific ratios of 2,3-butanediol and acetoin isomers as a tool to evaluate wine yeast performance. *International Journal of Food Microbiology*, **86**, 163-168.

Rose, M., Winston F. and Hieter, P. (1990). Methods in yeast genetics. A laboratory course manual. (Maryliz M. Dickerson, Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Rossell, A., Valencia, E., Parés, X., Fita, I., Farrés, J. and Ochoa, W.F. (2003). Crystal structure of the vertebrate NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADH8). *Journal of Molecular Biology*, **330**, 75-85.

Rossmann, M.G., Moras, D., and Olsen, K.W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, **250**, 194-199.

Roustan, J.L. and Sblayrolles, J.-M. (2002a). Modification of the acetaldehyde concentration during alcoholic fermentation and effects on fermentation kinetics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **93(4)**, 367-375.

Roustan, J.L. and Sblayrolles, J.-M. (2002b). Impact of the addition of electron acceptors on the by-products of alcoholic fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 142-152.

Russell, D.W., Smith, M., Williamson, V.M. and Young, E.T. (1983). Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene. *The Journal of Biological Chemistry*, **258**, 2674-2682.

Ruzheinikov, S.N., Burke, J., Sedelnikova, S., Baker, P.J., Taylor, R., Bullough, P.A., Muir, N.M., Gore, M.G. and Rice, D.W. (2001). Glycerol dehydrogenase: structure, specificity, and mechanism of a family III polyol dehydrogenase. *Structure*, **9**, 789-802.

S

Sakurai, M., Tohda, H., Kumagai, H. and Giga-Hama, Y. (2004). A distinct type of alcohol dehydrogenase, *adh4+*, complements ethanol fermentation in an *adh1*-deficient strain of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Research*, **4**, 649-654.

Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual (Third Edition). (Argentine, J., Irwin, N., Janssen, K.A., Curtis, S., Zieler, M., Dickerson, M., Sialiano, I., McInerny, N. and Schaefer, S., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Samuel, D. (1996). Investigation of ancient egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. *Science*, **273**, 488-490.

Sarthy, A.V., Schopp, C. and Idler, K.B. (1994). Cloning and sequence determination of the gene encoding sorbitol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **140 (1)**, 121-126.

Schwarz, J.g. and Hang, Y.D. (1994). Purification and characterisation of diacetyl reductase from *Kluyveromyces marxianus*. *Letters in Applied Microbiology*, **18**, 272-276.

Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulations of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.

Smania, A.M. and Aragaña, C.E. (1997). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a bovine butanediol dehydrogenase. *Gene*, **197 (1-2)**, 231-238.

Steensma, H.Y. (1997). Chapter 18: From pyruvate to acetyl-coenzyme A and Oxaloacetat. In: Yeast Sugar Metabolism. Biochemistry, genetics, biotechnology and applications (Zimmermann, F.K. and Entian, K.-D., eds.), pp. 339-357, Technomic Publishing CO., Inc.

Storms, R.K., Wang, Y., Fortin, N., Hall, J., Vo, D.H., Zhong, W.-W., Downing, T., Barton, A.B., Kaback, D.B., Su, Y. and Bussey, H. (1997). Analysis of a 103 kbp cluster homology region from the left end of *Saccharomyces crevisiae* chromosome I. *Genome*, **40**, 151-164.

Sun, H.-W. and Plapp, B.V. (1992). Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family. *Journal of Molecular Evolution*, **34**, 522-535.

Suomalainen, H. and Ronkainen, P. (1968). Mechanism of diacetyl formation in yeast fermentation. *Nature*, **220**, 792-793.

T

Takusagawa, Y., Otagiri, M., Ui, S., Ohtsuki, T., Mimura, A., Ohkuma, M. and Kudo, T. (2001). Purification and characterization of L-2,3-butanediol dehydrogenase of *Brevibacterium saccharolyticum* C-1012 expressed in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **65 (8)**, 1876-1878.

Thompson, J.D. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequences weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choices. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.

Thukral, S.K., Eisen, A. and Young, E.T. (1991). Two monomers of yeast transcription factor ADR1 bind a palindromic sequence symmetrically to activate *ADH2* expression. *Molecular and Cellular Biology*, **11 (3)**, 1566-1577.

Tittel, V.D. and Radler, F. (1979). Über die bildung von 2,3-butandiol bei *Saccharomyces cerevisiae* durch acetoin-reduktase. *Monatsschrift Für Brauerei*, **79**, 260-267.

Treco, D. A. (1990). Basic techniques in yeast genetics. In: Current Protocols in Molecular Biology 2 (Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., eds.), pp. 13.1.1-13.1.7, John Wiley and Sons, Inc.

U

Ui, S., Okajima, Y., Mimura, A., Kanai, H., Kobayashi, T. and Kudo, T. (1997). Sequence analysis of the gene for and characterization of D-acetoin forming *meso*-2,3-butanediol dehydrogenase of

Klebsiella pneumoniae expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **83**, 32-37.

Ui, S., Otagiri, M., Ohtsuki, T., Mimura, A., Dohmae, N., Takio, K., Ohkuma, M. and Kudo, T. (1998). Cloning, expression and nucleotide sequence of the L-2,3-butanediol dehydrogenase gene from *Brevibacterium saccharolyticum* C-1012. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **86**, 290-295.

Ui, S., Mimura, A., Ohkuma, M. and Kudo, T. (1999). Formation of a chiral acetoinic compound from diacetyl by *Escherichia coli* expressing *meso*-2,3-butanediol dehydrogenase. *Letters in Applied Microbiology*, **28**, 457-460.

V

Van Dijken, J.P. and Scheffers, W.A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**, 199-224.

Van Iersel, M.F.M., Brower-Post, E., Rombouts, F.M. and Abee, T. (2000). Influence of yeast immobilization on fermentation and aldehyde reduction during the production of alcohol-free beer. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 602-607.

Van Loon, A.P. and Young, E.T. (1986). Intracellular sorting of alcohol dehydrogenase isoenzymes in yeast: a cytosolic location reflects absence of an amino-terminal targeting sequence for the mitochondrion. *EMBO Journal*, **5** (1), 161-165.

Verduyn, C., Breedveld, G.J., Scheffers, W.A. and Van Dijken, J.P. (1988a). Purification and properties of dihydroxyacetone reductase and 2,3-butanediol dehydrogenase from *Candida utilis* CBS 621. *Yeast*, **4**, 127-133.

Verduyn, C., Breedveld, G.J., Scheffers, W.A. and Van Dijken, J.P. (1988b). Metabolism of 2,3-butanediol in yeasts. *Yeast*, **4**, 135-142.

Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H. and Delvaux, F.R. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61**, 197-205.

Visser, W., Van der Baan, A.A., Batenburg-van der Vegte, W., Scheffers, W.A., Krämer, R. and Van Dijken, J.P. (1990). Involvement of mitochondria in the assimilatory metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* cultures. *Microbiology*, **140**, 3039-3046.

W

Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793-1808.

Wach, A., Brachat, A., Rebischung, C., Steiner, S., Pokorni, K., Heesen, S. and Philippsen, P. (1998). Chapter 5: PCR-based gene targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast Gene Analysis* (Brown & Tuite, eds.) pp.: 67-81. Academic Press, San Diego.

Wahlbom, C.F. and Hahn-Hägerdal, B. (2002). Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, **78** (2), 172-178.

Walther, K. and Schüller, H.-J. (2001). Adr1 and Cat8 synergistically activate the glucose-regulated alcohol dehydrogenase gene *ADH2* of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **147**, 2037-2044.

Webster, T.D. and Dickson, R.C. (1983). Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of *Tn903*. *Gene*, **26** (2-3), 243-252.

Wehner, E.P., Rao, E. and Brendel, M. (1993). Molecular structure and genetic regulation of *SFA*, a gene responsible for resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*, and characterization of its protein product. *Molecular and General Genetics*, **237 (3)**, 351-358.

Williamson, V.M. and Paquin, C.E. (1987). Homology of *Saccharomyces cerevisiae ADH4* to an iron-activated alcohol dehydrogenase from *Zymomonas Mobilis*. *Molecular and General Genetics*, **209**, 374-381.

Wills, C. and Jörnvall, H. (1979). The two major isozymes of yeast alcohol dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, **99 (2)**, 323-331.

Winston, F., Dollard, C. and Ricupero-Hovasse, S.L. (1995). Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast*, **11**, 53-55.

Y

Yamano, S., Kondo, K., Tanaka, J. and Inoue, T. (1994b). Construction of a brewer's yeast having α -acetolactate decarboxylase gene from *Acetobacter aceti* ssp. *xylinum* integrated in the genome. *Journal of Biotechnology*, **32**, 173-178.

Yamano, S., Tomizuka, K., Tanaka, J. and Inoue, T. (1994a). High level expression of α -acetolactate decarboxylase gene from *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* in brewing. *Journal of Biotechnology*, **37**, 45-48.

Young, E.T. and Pilgrim, D. (1985). Isolation of *ADH3*, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **5**, 3024-3034.

Young, E.T., Kachervosky, N. and Van Ripper., K. (2002). Snf1 protein kinase regulates Adr1 binding to chromatin but not transcription activation. *The Journal of Biological Chemistry*, **277 (41)**, 38095-38103.

Young, E.T., Dombek, K.M., Tachibana, C. and Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 i Cat8. *The Journal of Biological Chemistry*, **278 (28)**, 26146-26158.

ANNEX

ANNEX

1. Composició del DropOut Mix 10x per el creixement de *S. cerevisiae* en medi mínim suplementat (SMM).

La taula conté un llistat dels elements necessaris per al creixement del llevat on hi ha les concentracions de les solucions mare per cadascun i el volum que s'ha d'afegir a un litre de medi SD. També podem veure la concentració final en el medi:

Taula 22

Composició del DropOut Mix 10x per afegir al medi mínim suplementat (SMM)

Constituent	Concentració solució mare (g/100ml)	Volum solució mare per 1 litre de medi (ml)	Concentració final en el medi (mg/l)
Hemisulfat d'adenina	0,2 ^a	10	20
Uracil	0,2 ^a	10	20
L-Triptòfan	1	2	20
L-Histidina	1	2	20
L-Arginina	1	2	20
L-Metionina	1	2	20
L-Tirosina	0,2	15	30
L-Leucina	1	3	30
L-Isoleucina	1	3	30
L-Lisina	1	3	30
L-Fenilalanina	1 ^a	5	50
L-Àcid glutàmic	1 ^a	10	100
L-Àcid aspàrtic	1 ^{a,b}	10	100
L-Valina	3	5	150
L-Treonina	4 ^{a,b}	5	200
L-Serina	8	5	400

^aConservar a temperatura ambient.

^bAfegir després d'autoclavar el medi.

2. Soques utilitzades.

2.1 Genotip de les soques modificades.

A continuació es presenten els genotips de les soques utilitzades en la present tesi doctoral, ja siguin soques de laboratori o industrials.

Taula 23
Genotip de les soques modificades utilitzades

Soca	Genotip
WV36-405	<i>MATα ade-2 ura3-53 trp1 adh1Δ adh2ΔHIII adh3 adh4::TRP1</i>
BJ5459	<i>MATα ura3-52 trp1 lys2-801 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL</i>
FY834	<i>MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ</i>
EG2	<i>MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ bdh1::TRP1</i>
FY61	<i>MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ yal061w::KanMX4</i>
FY6160	<i>MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ yal061w::KanMX4 bdh1::TRP1</i>
FYA2	<i>MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ adh2::HIS3</i>
EGA2	<i>MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ bdh1::TRP1 adh2::HIS3</i>
S288C	<i>MATα mal gal2</i>
SCUK60	<i>MATα mal gal2 BDH1::KanMX4 2xloxP</i>
SCU60	<i>MATα mal gal2 BDH1::loxP</i>
SID	Cervesera tipus <i>lager</i>
SIDUK60	Cervesera tipus <i>lager</i> BDH1::KanMX4 2xloxP
SIDU60	Cervesera tipus <i>lager</i> BDH1::loxP

2.2 Soques i vectors.

A continuació es presenta una relació de les soques transformades utilitzades amb el vector que contenen, si el vector és multicòpia o centromèric, el mètode de selecció i el tipus de promotor.

Taula 24
Soques i vectors utilitzats

Nom de la soca	Vector	Còpies per cèl·lula	Selecció	Promotor
WV36-405[pYES2]	pYES2	multicòpia	uracil	<i>GAL1</i>
WV36-405[pYES2- <i>BDH1</i>]	pYES2- <i>BDH1</i>	multicòpia	uracil	<i>GAL1</i>
BJ5459[pYES2]	pYES2	multicòpia	uracil	<i>GAL1</i>
BJ5459[pYES2- <i>BDH1</i>]	pYES2- <i>BDH1</i>	multicòpia	uracil	<i>GAL1</i>
S288C[pRSMX]	pRSMX	centromèric	geneticina	<i>ADH1</i>
S288C[pRSMXY0]	pRSMXY0	centromèric	geneticina	<i>ADH1</i>
SID[pRSMX]	pRSMX	centromèric	geneticina	<i>ADH1</i>
SID[pRSMXY0]	pRSMXY0	centromèric	geneticina	<i>ADH1</i>
SID[pAAMX]	pAAMX	multicòpia	geneticina	<i>ADH1</i>
SID[pAAY0RMX]	pAAY0RMX	multicòpia	geneticina	<i>ADH1</i>
SCUK60[pSH47]	pSH47	multicòpia	uracil	<i>GAL1</i>
SIDUK60[pSH47-ZEO]	pSH47-ZEO	multicòpia	pleomicina	<i>GAL1</i>

2.3 Mapes de vectors utilitzats.

A la figura 74 es presenta els mapes d'alguns dels vectors utilitzats en la Tesi.

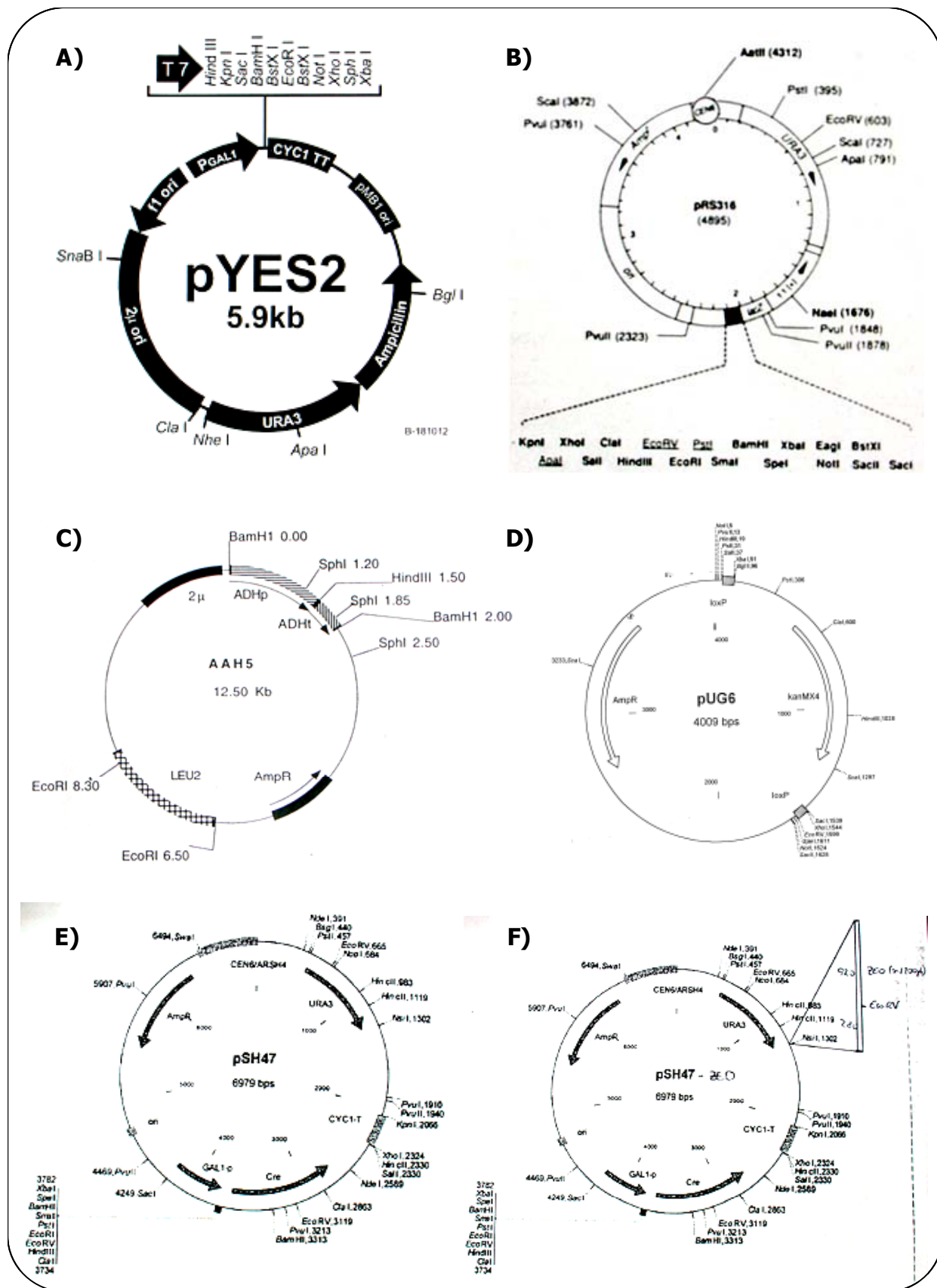


Figura 74: Esquema d'alguns dels vectors utilitzats en la Tesi. A) pYes2, B) pRS316, C) pAAH5, D) pUG6, E) pSH47 i F) pSH47-ZEO.

3. Estructura dels diferents substrats de la Bdh1p.

A continuació es presenten les estructures dels diferents isòmers de l'acetoïna i del 2,3-butanodiol, així com l'estructura del diacetil i la 2,3-pentanodiona.

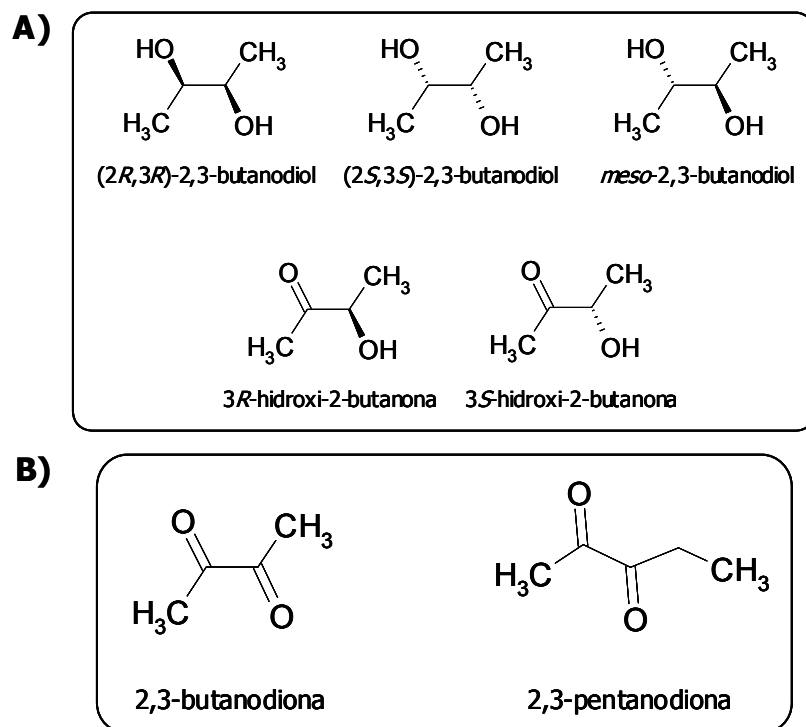


FIGURA 75: Estructura dels diferents substrats de la Bdh1p.

A) Isòmers del 2,3-butanodiol i de l'acetoïna (3-hidroxi-2-butanona).

B) Estructura del diacetil (2,3-butanodiona) i de la 2,3-pentanodiona.

4. Articles.

Del treball experimental realitzat s'han publicat dos articles en revistes científiques internacionals.



ELSEVIER

Chemico-Biological Interactions 130–132 (2001) 425–434

Chemico-Biological
Interactions

www.elsevier.com/locate/chembiont

Characterization and functional role of *Saccharomyces cerevisiae* 2,3-butanediol dehydrogenase

Eva González, M. Rosario Fernández, Carol Larroy,
Xavier Parés *, Josep A. Biosca

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences,
Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

Abstract

Using a conserved sequence motif, a new gene (*YAL060W*) of the MDR family has been identified in *Saccharomyces cerevisiae*. The expressed protein was a stereospecific (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase (BDH). The best substrates were (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol for the oxidation and (3*R*/3*S*)-acetoin and 1-hydroxy-2-propanone for the reduction reactions. The enzyme is extremely specific for NAD(H) as cofactor, probably because the presence of Glu223 in the cofactor binding site, instead of the highly conserved Asp223. BDH is inhibited competitively by 4-methylpyrazole with a K_i of 34 μ M. Yeast could grow on 2,3-butanediol or acetoin as a sole energy and carbon sources, and a 3.6-fold increase in BDH activity was observed when cells were grown in 2,3-butanediol, suggesting a role of the enzyme in 2,3-butanediol metabolism. However, the disruption of the *YAL060W* gene was not lethal for the yeast under laboratory conditions, and the disrupted strain could also grow in 2,3-butanediol and acetoin. This suggests that other enzymes, in addition to BDH, can also metabolize 2,3-butanediol in yeast. © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Butanediol dehydrogenase; Yeast; Acetoin

* Corresponding author. Tel.: +34-93-5813026; fax: +34-93-5811264.

E-mail address: xavier.pares@uab.es (X. Parés).

0009-2797/01/\$ - see front matter © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

PII: S0009-2797(00)00282-9

1. Introduction

After completion of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA sequence [1], the analysis of the whole genome revealed that almost 60% of its ORFs had no experimentally determined function [2]. This opened the possibility to investigate the existence of new genes of the MDR family in yeast, with the aim of looking for enzymes with still unknown functional roles. In a previous work [3], the consensus pattern GHEXXGXXXXX[GA]XX[IVAC] found in the medium-chain zinc-containing ADH family [4–6], was used as input sequence in the BLAST (National Center for Biotechnology Information, NIH) program to search for ORF in the *S. cerevisiae* Genome Database (SGD). The search yielded five genes of unknown function that could be members of the NAD-dependent, Zn-containing medium-chain alcohol dehydrogenases [3]. Among those, we studied *YAL060W*. The gene was overexpressed on the WV36–405 *S. cerevisiae* strain (ADH deficient strain) and the specificity of the expressed enzyme was analyzed in the yeast homogenates. The best substrate for the enzyme was (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol. The product from the *YAL060W* gene was, therefore, a 2,3-butanediol dehydrogenase (BDH), which was also confirmed by kinetic analysis. The enzyme was subsequently purified to homogeneity [3] and their molecular properties were studied. We concluded that the native BDH was a homodimer composed of two subunits of M_r 41 000.

In the present report, we have further investigated the kinetic properties of yeast BDH. Moreover, the discovery of this new activity in *S. cerevisiae* has provided the opportunity to study the physiological role of BDH in this organism. This has been carried out by comparison of the growth features of the wild-type strain with those of an isogenic strain, but with the *YAL060W* gene disrupted, using different compounds as a carbon and energy sources in the culture medium.

2. Materials and methods

2.1. Cloning and purification of *S. cerevisiae* BDH

The *YAL060W* gene was cloned in the multicopy vector pYes2 (Invitrogen, Carlsbad, USA). The protease deficient yeast strain BJ5459 (*MATa*, *ura3*–52, *trp1*, *lys2*–801, *leu2*Δ1, *his3*Δ200, *pep4*::*HIS3*, *prb1*Δ1.6R, *can1*, *GAL*) [7], provided generously by Dr Benjamí Piña (CSIC, Barcelona, Spain), was used to overexpress and purify the *YAL060W* gene product [3].

2.2. Enzyme assays

Enzyme activities were measured spectrophotometrically [8]. The steady-state kinetic constants were determined at 25°C with 33 mM sodium pyrophosphate pH 8, and 5 mM NAD, for the oxidation reactions, and with 33 mM sodium phosphate, pH 7, 0.5 mM NADH, for the reduction reactions. One unit of activity (U) corresponds to 1 μmol NAD(H) formed per minute.

2.3. Disruption of the *YAL060W* gene

The disruption of the *YAL060W* gene was carried out by one-step gene replacement [9] with the *TRP1* gene as described previously [3]. FY834 (*MAT α* , *his3 Δ 200*, *ura3–52*, *leu2 Δ 1*, *lys2 Δ 202*, *trp1 Δ 63*) [10] was the parental strain of EG2 and EG3, both being isogenic with FY834, except for the gene *YAL060W* that was disrupted in EG2 and EG3.

2.4. Yeast growth in 2,3-butanediol and acetoin cultures

All yeast strains (FY834, EG2 and EG3) were grown in rich medium (YP) containing 1% yeast extract, 2% peptone and a carbon source. Carbon sources were added to YP medium once sterilized. The final concentrations used were 0.5 and 2% glucose, 0.5 and 3% 2,3-butanediol (mixture of isomers), and 0.5% acetoin. All cultures were grown at 30°C and 270 rpm.

3. Results

3.1. Analysis of the stability of BDH

Yeast BDH was purified to homogeneity as reported previously [3]. In initial experiments, performed with a protease competent yeast strain, we observed that in the cell homogenates, BDH lost 30% of its activity when incubated at 4°C during 2 h (in 20 mM sodium phosphate, pH 6.8 with 5 mM DTT). We studied, then, several buffer conditions and yeast strains to improve the stability of BDH. We found that pH, and DTT and glycerol concentrations were important for maintaining BDH activity. Therefore, we decided to use the yeast strain BJ5459, a protease-deficient and galactose inducible strain, to overexpress and purify BDH. Moreover, 0.5 mM DTT and 30% glycerol were employed in all buffers of the purification and storage of the enzyme [3]. Finally, buffers at pH close to neutrality were used throughout the purification and in experiments with purified BDH.

3.2. Substrate specificity and kinetic properties

BDH catalyzed the oxidation of several 1,2 and 2,3 diols, showing a higher activity for secondary alcohols (as 2,3-butanediol) than for primary alcohols (such as 1,2-butanediol), with a maximum of activity towards (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol [3]. BDH could oxidize *meso*-2,3-butanediol, although showing less activity than with the (2*R*,3*R*) isomer. No activity was found with the (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol stereoisomer.

The (3*R*/3*S*)-acetoin was the best substrate in the reduction reaction, followed by diacetyl (2,3-butanedione) and 1-hydroxy-2-propanone. Other substrates were hydroxyacetone, methylglyoxal, dihydroxyacetone and 2,3-pentanedione. As for the oxidation reactions, the four-carbon substrates were also preferred in the reduction reactions.

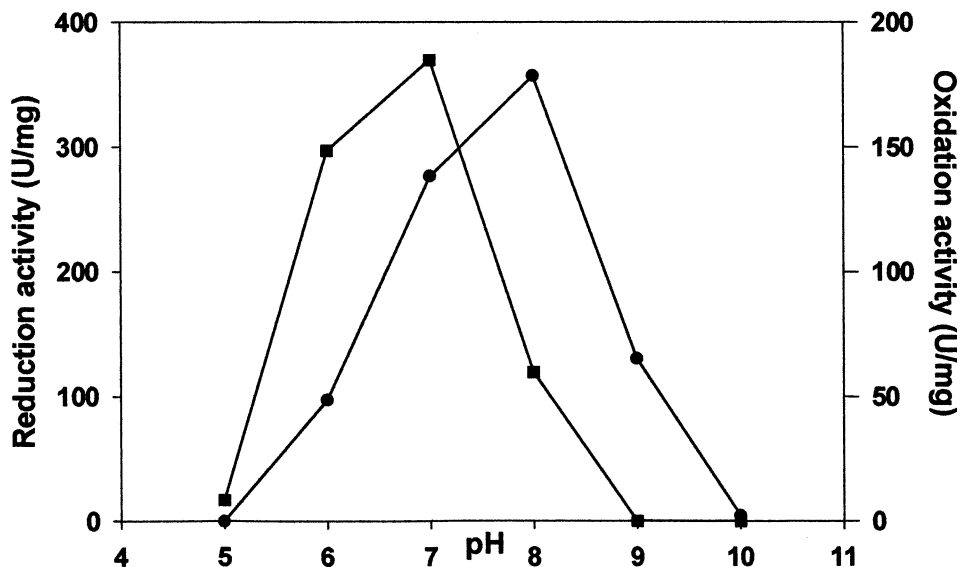


Fig. 1. Effect of pH on the activity of yeast (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase. The enzymatic activities were measured using 0.1 M sodium acetate pH 5.0, 33 mM sodium phosphate (pH 6.0–7.0), 33 mM sodium pyrophosphate pH 8.0, and 0.1 M glycine (pH 9.0–11.0). Reduction activity (-■-) was measured with 10 mM (3*R*/3*S*)-acetoin and 0.2 mM NADH. Oxidation activity (-●-) was measured with 10 mM (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and 1.2 mM NAD.

The rate of the enzymatic reactions was affected by the pH of the assay buffer. The pH optima for the oxidation of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and for the reduction of (3*R*/3*S*)-acetoin were 8 and 7, respectively, (Fig. 1). For the reduction reaction, enzymatic activity was found only between pH 6 and 8, while oxidation activity was detected between pH 6 and 9.

We determined the kinetic parameters for the best substrates, for which BDH displayed saturation kinetics (Table 1). The catalytic efficiency constant, k_{cat}/K_m ,

Table 1
Kinetic constants of yeast (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase^a

Variable substrate	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ ·min ⁻¹)
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-butanediol	14 ± 5	78 180 ± 1275	5580 ± 1725
NAD	0.55 ± 0.03		
(3 <i>R</i> /3 <i>S</i>)-Acetoin	4.5 ± 0.5	98 340 ± 3995	21 850 ± 2580
1-Hydroxy-2-propanone	14.5 ± 1.5	33 330 ± 2790	2300 ± 300
NADH	0.055 ± 0.005		

^a Alcohol oxidation activities were measured in 33 mM sodium pyrophosphate pH 8.0 with 5 mM NAD. Ketone reduction activities were measured in 33 mM sodium phosphate pH 7.0 with 0.2 mM NADH. NAD and NADH kinetics were performed with 120 mM (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and 50 mM (3*R*/3*S*)-acetoin, respectively.

was greater for the reduction of (3*R*/3*S*)-acetoin than for the oxidation of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol. Moreover, the K_m for NADH was 10-fold lower than that for NAD. Therefore, the enzyme could preferentially function as a reductase rather than as a dehydrogenase. For the reduction reaction, kinetic constants could also be determined for 1-hydroxy-2-propanone. In contrast, diacetyl and 2,3-pentanedione, although substrates for BDH, did not saturate the enzyme.

Activity measurements with (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol as the variable substrate and 5 mM NAD, in 33 mM sodium pyrophosphate pH 8.0, measured in the presence of 4-methylpyrazole (in a concentration range 0.1–0.5 mM) as inhibitor, resulted in a competitive inhibition, with an inhibition constant of 34 μ M.

3.3. Cofactor specificity

In order to determine the cofactor specificity of BDH, we assayed the activity with different concentrations of NAD(H) and NADP(H). We used an enzyme sample with an activity of 71.8 U ml⁻¹, with 5 mM NAD and 120 mM (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, at pH 8.0, and the enzymatic activity was assayed at identical conditions but with NADP instead of NAD, in a concentration range 0.1–5 mM. In all cases, the measured activity was less than 0.1% of the original activity. For the reduction reaction, an enzymatic sample with 114 U ml⁻¹, in 50 mM (3*R*/3*S*)-acetoin, 0.2 mM NADH, at pH 7.0, was used. Less than 0.7% activity was detected when the cofactor was changed to NADPH, in a concentration range 0.07–1 mM. Therefore, BDH from *S. cerevisiae* is extremely specific for NAD(H).

3.4. Disruption of the *YAL060W* gene

The disruption of the *YAL060W* gene was confirmed by PCR of genomic DNA of the mutant cells (EG2 and EG3) [3], by isoelectrofocusing analysis, and by measurement of the (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase activity of the corresponding yeast extracts. When mutant cells were grown on 2% glucose, the BDH activity of the homogenates was undetectable, whereas the wild-type strain showed an activity of 0.23 U mg⁻¹ protein. Isoelectrofocusing showed no (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase activity band in the disrupted strains as opposed to the one shown by the wild-type strain (Fig. 2). The disruption of the gene was not lethal for *S. cerevisiae* under laboratory conditions.

3.5. Growth on 2,3-butanediol and acetoin

All yeast strains used in this study, wild-type (FY834) and the *YAL060W* disrupted mutants (EG2 and EG3), could grow on 2,3-butanediol (mixture of (2*R*,3*R*), (2*S*,3*S*) and meso isomers) as well as on acetoin as a sole energy and carbon sources. Fig. 3A shows the growth curves in 0.5% glucose for the wild-type (FY834) and the mutant strain (EG2). The growth rate for both strains in this medium was approximately 0.2 h⁻¹. When the same strains were grown on 0.5% 2,3-butanediol, the growth rate was 0.06 h⁻¹ (Fig. 3B). The growth rates were

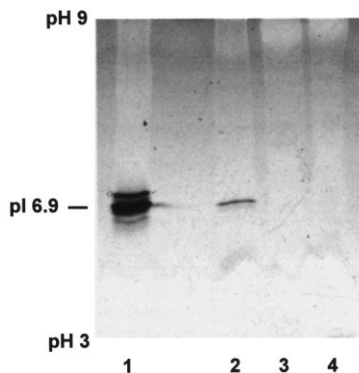


Fig. 2. Analysis of the disruption of the *YAL060W* gene from *S. cerevisiae*. Isoelectrofocusing (pH 3–9) was performed according to a reported method [19]. The BDH band was visualized by activity staining with 0.5 M (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol. (1) Crude extract (54 μg protein) of FY834 α [pYes2-*YAL060W*] cells grown in 2% galactose; (2) crude extract (54 μg protein) of FY834 α cells grown in 3% 2,3-butanediol; (3–4) crude extracts (54 μg protein) of the *YAL060W* disrupted yeast strains, EG2 and EG3, grown in 3% 2,3-butanediol.

approximately the same when they were grown on 3% 2,3-butanediol (not shown). When wild-type cells were grown in 3% 2,3-butanediol and broken up in the exponential phase of growth, an induction of 3.6-fold in the BDH specific activity (0.91 U mg^{-1}) was observed as compared with the cells grown in 2% glucose (0.25 U mg^{-1}).

Wild-type and mutant strains were able to grow in 0.5% acetoin with comparable growth rates (0.13 h^{-1} , Fig. 3B). No butanediol dehydrogenase activity was observed in the mutant strain when grown in glucose, but a significant activity of 0.35 U mg^{-1} was measurable when grown on 3% 2,3-butanediol (FY834 wild-type displayed 0.91 U mg^{-1} under comparable conditions). EG2 did not show any (3*R*/3*S*)-acetoin reductase activity when grown on glucose, 2,3-butanediol or acetoin, while the wild-type strain showed 2.1 and 2.3 U mg^{-1} when grown in 2% glucose and 3% 2,3-butanediol, respectively.

4. Discussion

4.1. Structural and kinetic features of yeast BDH

The complete genome sequences of different organisms recently reported, provide the opportunity of detecting new enzymes and functions, by homology to well characterized enzyme families. Using a consensus sequence found in the Zn-containing enzymes of the MDR family, we detected several putative genes of the family, with still unknown function, in the genome of *S. cerevisiae*. Among them, the *YAL060W* gene was overexpressed and its protein product purified and characterized. It encoded a (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase, with strict spe-

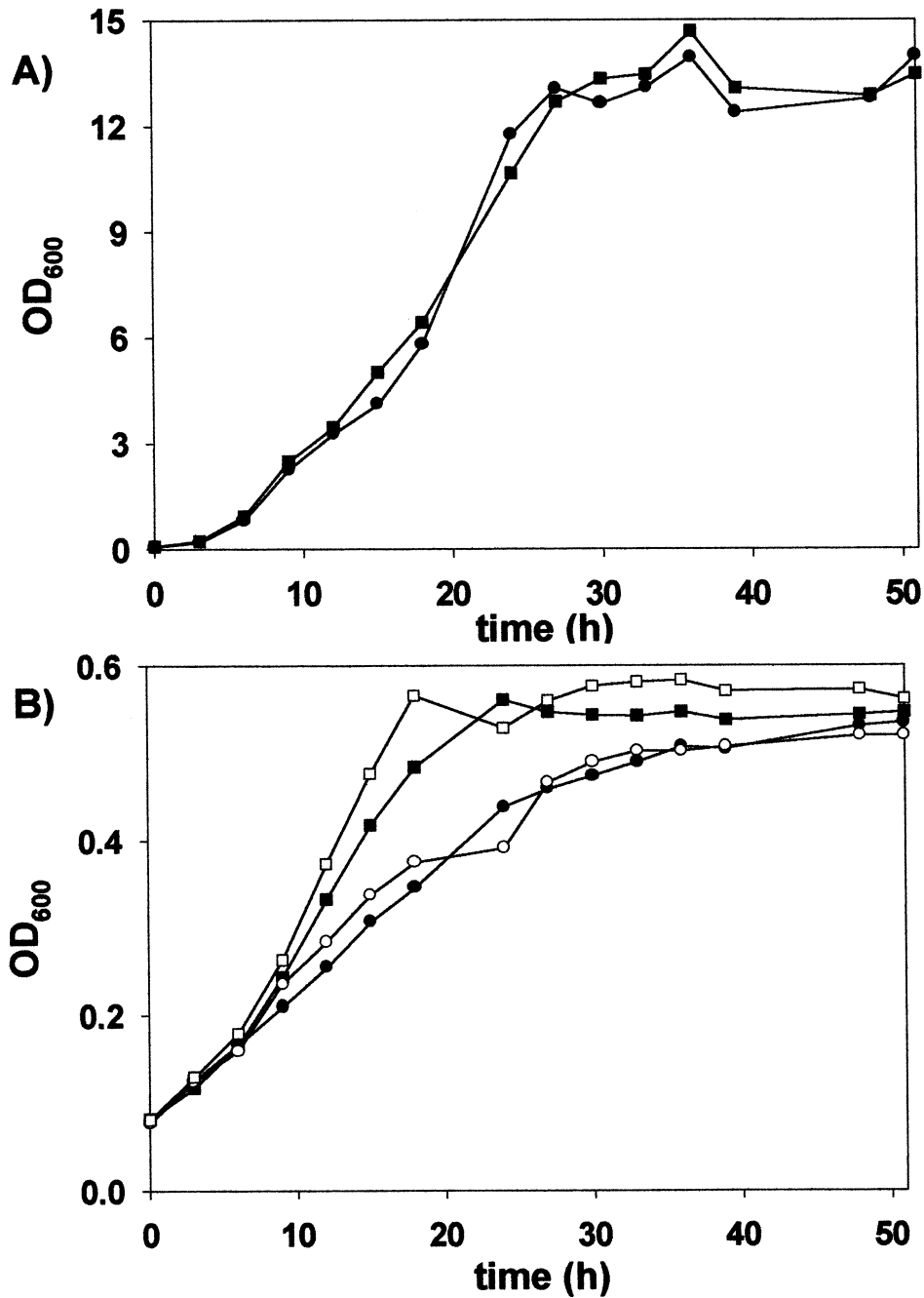


Fig. 3. Growth kinetics of *S. cerevisiae* in presence of 2,3-butanediol and acetoin. (A) FY834 wild-type (●) and disrupted EG2 (■) strains were grown in rich medium containing 0.5% glucose. (B) The same strains were grown on 0.5% 2,3-butanediol and 0.5% acetoin. FY834 strain grown on 2,3-butanediol (●) and acetoin (■). EG2 strain grown on 2,3-butanediol (○) and acetoin (□).

cificity towards the OHs of carbons in *R* configuration. BDH is a novel protein of the MDR superfamily, that shares sequence similarities with other MDR members. As discussed previously, [3], the sequence analysis revealed that BDH exhibits the ligands of the catalytic Zn and also the four Cys, putative ligands of the structural Zn. Interestingly, yeast BDH shows a gap between residues 127–144 (according to horse ADH numeration), which is typical of tetrameric ADHs. However, we have well demonstrated that yeast BDH is a dimeric enzyme. Its sequence also shows the residues conserved in the coenzyme-binding domain (Rossmann fold) [11].

The kinetic constants shown in Table 1 indicate that the best substrate for BDH is (3*R*/3*S*)-acetoin, showing the highest k_{cat}/K_m ratio. The low K_m for NADH (ten fold lower than for NAD) may also support a physiological role in the reduction direction. The enzyme is competitively inhibited by 4-methylpyrazole, a property in common with many MDR, ethanol-active, alcohol dehydrogenases. BDH is a protein highly specific for NAD(H) as cofactor. Thus, a negligible activity was found when NADP or NADPH were used as cofactors. It is known that position 223 (according to HLADH numeration) is important in the discrimination between NAD(H) and NADP(H). Most NAD-dependent MDR enzymes possess an Asp at this position and, although their activity is higher with NAD, they are, in general, also able to accept NADP as cofactor. In contrast, NADP-dependent MDR enzymes have a Gly, Ser or Thr at this position. No other characterized enzymes, except BDH from *Pseudomonas putida* [12] and the present BDH from *S. cerevisiae*, have a Glu residue at this position. Probably the longer, negatively charged side chain of Glu enhances the repulsion and the steric hindrance with the extra phosphate of NADP, making the enzyme exclusively dependent of NAD.

Other yeast 2,3-butanediol dehydrogenases have been purified and characterized in *S. cerevisiae* [13], *Candida utilis* [14] and *Candida salmanticensis* [15], but they show kinetic and molecular properties different from those of the BDH here characterized. Moreover, since no sequences were reported for these proteins, it is not possible to make a complete comparison with this novel BDH.

4.2. Growth of *S. cerevisiae* strains in 2,3-butanediol and acetoin

During normal alcoholic fermentation from glucose, yeast produces 2,3-butanediol, at a concentration of about 1 mM. This compound derives from the reduction of the physiological intermediates diacetyl (2,3-butanedione) and acetoin (3-hydroxy-2-butanone) [16], and constitutes a mixture of approximately 67% (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, and 33% *meso*-2,3-butanediol. Since acetoin formed by pyruvate decarboxylase consists of 64–77% of (3*R*)-acetoin and 23–36% of (3*S*)-acetoin [17], yeast BDH may account, according to its stereospecificity, for the entire formation of the 2,3-butanediol found during the fermentation, from the reduction of acetoin.

The *S. cerevisiae* wild-type strain FY834 can grow in 2,3-butanediol as a sole carbon source. It was described previously [15] that other yeast species from the *Candida*, *Hansenula* or *Picchia* genera could also grow on 2,3-butanediol. For the *S. cerevisiae* strain FY834, growth rates on 0.5 and 3% 2,3-butanediol are 0.05 and 0.06 h⁻¹, respectively. These values are similar to those found for *C. salmanticensis*,

although most of species of *Picchia* or *Hansenula* have higher growth rates, varying from 0.11 to 0.23 h⁻¹. Therefore, metabolism of 2,3-butanediol may exhibit differences among yeast species.

BDH shows a 3.6-fold induction when the wild-type strain is grown in 2,3-butanediol (in comparison to the growth in glucose), supporting a role in 2,3-butanediol metabolism. However, other enzymatic systems are able to oxidize this diol compound in yeast. Thus, the disrupted *YAL060W* strains also show a 2,3-butanediol dehydrogenase activity when they grew in 2,3-butanediol. This activity was absent when the disrupted strains grew in glucose. In contrast to the BDH here characterized, the induced enzyme could not reduce acetoin.

We have also shown that *S. cerevisiae* can grow on acetoin as carbon source (Fig. 3B). The growth rates were similar for the wild-type and mutant strains in media containing 0.5% acetoin, and twice the growth rates found when the strains were grown in 2,3-butanediol. It may be hypothesized that, to support yeast growth, 2,3-butanediol has to be oxidized to acetoin, either by BDH or by an alternative 2,3-butanediol dehydrogenase activity.

Many prokaryotes have a multienzyme complex, acetoin dehydrogenase, that can transform acetoin into acetaldehyde and acetyl-CoA, which can enter the glyoxylate and tricarboxylic acid cycles, and can, thus, support growth. These multienzymatic complexes, similar to pyruvate dehydrogenase, have been found in *Bacillus subtilis*, *P. putida* and *Clostridium magnum* [12,18]. In the case of *P. putida*, the acetoin dehydrogenase components are part of an inducible operon that also contains the *P. putida* butanediol dehydrogenase (the prokaryotic counterpart to yeast BDH). The presence in yeast of an enzymatic system able to anabolize acetoin, although not known yet, is supported by the capacity of *S. cerevisiae* to grow in acetoin and 2,3-butanediol as carbon sources.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica (PB98-0855 and PB96-1167) and the Commission of the European Union (BIO4-CT97-2123).

References

- [1] A. Goffeau, B.G. Barrell, H. Bussey, R.W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J.D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E.J. Louis, H.W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, S.G. Oliver, Life with 6000 genes, *Science* 274 (1996) 545–567.
- [2] D. Botstein, S.A. Chervitz, J.M. Cherry, Yeast as a model organism, *Science* 277 (1997) 1259–1260.
- [3] E. Gonzalez, M.R. Fernández, C. Larroy, L. Solà, M.A. Pericàs, X. Parés, J.A. Biosca, Characterization of a (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* *YAL060W* gene product. Disruption and induction of the gene, *J. Biol. Chem.* (2000), in press.
- [4] B. Persson, J. Hallborn, M. Walfridsson, B. Hahn-Hälgerdal, S. Keränen, M. Penttilä, H. Jörnvall, Dual relationships of xylitol and alcohol dehydrogenases in families of two protein types, *FEBS Lett.* 324 (1993) 9–14.

- [5] H. Jörnvall, in: B. Jansson, J. Jörnvall, U. Rydberg, L. Terenius, B.L. Vallee (Eds.), *Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1994, pp. 221–229.
- [6] M.F. Reid, C.A. Fewson, Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases, *Crit. Rev. Microbiol.* 20 (1994) 13–56.
- [7] E.W. Jones, Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*, *Methods Enzymol.* 194 (1991) 428–453.
- [8] M.R. Fernández, J.A. Biosca, D. Torres, B. Crossas, X. Parés, A double residue substitution in the coenzyme-binding site accounts for the different kinetic properties between yeast and human formaldehyde dehydrogenases, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 37869–37875.
- [9] R.J. Rothstein, One-step gene disruption in yeast, *Methods Enzymol.* 101 (1983) 202–211.
- [10] F. Winston, C. Dollard, S.L. Ricupero-Hovasse, Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C, *Yeast* 11 (1995) 53–55.
- [11] H. Sun, B.V. Plapp, Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family, *J. Mol. Evol.* 34 (1992) 522–535.
- [12] M. Huang, F.B. Oppermann, A. Steinbüchel, Molecular characterization of the *Pseudomonas putida* 2,3-butanediol catabolic pathway, *FEMS Microbiol. Lett.* 124 (1994) 141–150.
- [13] Heidlas, R. Tressl, Purification and characterization of a (*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Arch. Microbiol.* 154 (1990) 267–273.
- [14] C. Verduyn, G.J. Breedveld, W.A. Scheffers, J.P. Van Dijken, Purification and properties of dihydroxyacetone reductase and 2,3-butanediol dehydrogenase from *Candida utilis* CBS 621, *Yeast* 4 (1988a) 127–133.
- [15] C. Verduyn, G.J. Breedveld, W.A. Scheffers, J.P. Van Dijken, Metabolism of 2,3-butanediol in yeasts, *Yeast* 4 (1988b) 135–142.
- [16] P. Liebs, H.-C. Wolter, M. Krüger, *Nahrung* 13 (1969) 455–459.
- [17] G. Chao-Chen, F. Jordan, Brewer's yeast pyruvate decarboxylase produces acetoin from acetaldehyde: a novel tool to study the mechanism of steps subsequent to carbon dioxide loss, *Biochemistry* 23 (1984) 3576–3582.
- [18] M. Huang, F.B. Oppermann-Sanio, A. Steinbüchel, Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 3837–3841.
- [19] E.F. Robertson, H.K. Dannelly, P.J. Malloy, H.C. Reeves, Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system, *Anal. Biochem.* 167 (1987) 290–294.

Characterization of a (2*R*,3*R*)-2,3-Butanediol Dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060*W* Gene Product

DISRUPTION AND INDUCTION OF THE GENE*

Received for publication, April 11, 2000, and in revised form, July 28, 2000
Published, JBC Papers in Press, August 9, 2000, DOI 10.1074/jbc.M003035200

Eva González‡, M. Rosario Fernández‡, Carol Larroy‡, Lluís Solà§, Miquel A. Pericàs§,
Xavier Parés‡¶, and Josep A. Biosca‡

From the ‡Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (Barcelona) and the §Unitat de Recerca en Síntesi Asimètrica, Departament de Química Orgànica, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

The completion of the *Saccharomyces cerevisiae* genome project in 1996 showed that almost 60% of the potential open reading frames of the genome had no experimentally determined function. Using a conserved sequence motif present in the zinc-containing medium-chain alcohol dehydrogenases, we found several potential alcohol dehydrogenase genes with no defined function. One of these, YAL060*W*, was overexpressed using a multicopy inducible vector, and its protein product was purified to homogeneity. The enzyme was found to be a homodimer that, in the presence of NAD⁺, but not of NADP, could catalyze the stereospecific oxidation of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol ($K_m = 14$ mM, $k_{cat} = 78,000$ min⁻¹) and *meso*-butanediol ($K_m = 65$ mM, $k_{cat} = 46,000$ min⁻¹) to (3*R*)-acetoin and (3*S*)-acetoin, respectively. It was unable, however, to further oxidize these acetoin to diacetyl. In the presence of NADH, it could catalyze the stereospecific reduction of racemic acetoin ((3*R*/3*S*)-acetoin; $K_m = 4.5$ mM, $k_{cat} = 98,000$ min⁻¹) to (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and *meso*-butanediol, respectively. The substrate stereospecificity was determined by analysis of products by gas-liquid chromatography. The YAL060*W* gene product can therefore be classified as an NAD-dependent (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase (BDH). *S. cerevisiae* could grow on 2,3-butanediol as the sole carbon and energy source. Under these conditions, a 3.5-fold increase in (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase activity was observed in the total cell extracts. The isoelectric focusing pattern of the induced enzyme coincided with that of the pure BDH (pI 6.9). The disruption of the YAL060*W* gene was not lethal for the yeast under laboratory conditions. The disrupted strain could also grow on 2,3-butanediol, although attaining a lesser cell density than the wild-type strain. Taking into consideration the substrate specificity of the YAL060*W* gene product, we propose the name of BDH for this gene. The corresponding enzyme is the first eukaryotic (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase characterized of the medium-chain dehydrogenase/reductase family.

One of the tasks left after the completion of the various genome projects is to ascertain the function of the sequenced genes. When the *Saccharomyces cerevisiae* genome project was finished, it was found that ~60% of the potential open reading frames of the genome had no defined function (1). One way of finding the biological role of each gene is to study its pattern of expression. A systematic effort has been performed in *S. cerevisiae* by means of DNA microarrays. The study of the temporal program of the gene expression accompanying the metabolic shift from fermentation to respiration has yield useful information on virtually every gene of this yeast (2). Another approach is to use consensus sequences of well characterized protein families to reveal close relatives, previously uncharacterized, in the sequenced genomes.

The alcohol dehydrogenase (ADH)¹ superfamily catalyzes the reversible oxidation of alcohols to aldehydes or ketones and can be grouped in at least three enzyme families: medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR), short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), and iron-activated alcohol dehydrogenases (3, 4). Since most of the enzymes belonging to the MDR family contain one or two Zn²⁺ ions/subunit, they are also known as Zn²⁺-containing medium-chain ADHs.

S. cerevisiae has seven genes coding for MDR enzymes with known function: *ADH1* codes for the fermentative enzyme responsible for ethanol production from acetaldehyde and NADH, and it is produced in large amounts in glucose-grown cells (5). *ADH2* encodes the glucose-repressible isozyme (ADHII) that converts the ethanol accumulated under anaerobic conditions to acetaldehyde and allows the yeast to grow with ethanol as the carbon source (6–8). *ADH3* codes for ADHIII, the mature form of which is located in mitochondria (9) and which is also repressed by glucose. *ADH5* codes for an ADH with a 76% sequence identity to the ADHI isozyme (10). *SFA1* encodes the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (class III alcohol dehydrogenase) (11–13), which is a ubiquitous enzyme expressed in prokaryotes and eukaryotes with a formaldehyde detoxication role. *SOR1* codes for a sorbitol dehydrogenase, which is induced in cells grown in the presence of sorbitol (14). Finally, *YLR070C* has recently been shown to code for a xylitol dehydrogenase (15). The *ADH4* gene (16) codes for ADHIV, which is considered a member of the “iron-activated” ADH family (17).

In this work, we have used a conserved sequence motif found

* This work was supported by Grants PB98-0855 and PB96-1167 from the Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica and Grant BIO4-CT97-2123 from the Commission of the European Union. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-93-581-3026; Fax: 34-93-581-1264; E-mail: xavier.pares@uab.es.

¹ The abbreviations used are: ADH, alcohol dehydrogenase; MDR, medium-chain dehydrogenase/reductase; SDR, short-chain dehydrogenase/reductase; PCR, polymerase chain reaction; BDH, (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase; GLC, gas-liquid chromatography.

in the Zn²⁺-containing medium-chain ADH (the zinc-containing ADH signature) (18–20) to look for possible uncharacterized ADH genes in the yeast genome. One of the genes found with unknown function, *YAL060W*, was overexpressed in a yeast ADH-deficient strain, and the protein was purified to homogeneity and characterized. The enzyme was found to be a dimer that oxidized reversibly and stereospecifically (2R,3R)-2,3-butanediol and *meso*-2,3-butanediol to (3R)-acetoin and (3S)-acetoin, respectively. Although other (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenases have been described, this would be, to our knowledge, the first characterized eukaryotic protein with this specificity and known sequence belonging to the family of zinc-containing medium-chain ADHs.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Restriction enzymes and T4 DNA ligase were from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). *Vent* polymerase was from New England Biolabs Inc. (Beverly, MA). DNA oligomers were synthesized and purified by Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Chemicals were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), Aldrich, or Sigma and were of the highest quality available. Hydroxylapatite Bio-Gel HT was from Bio-Rad; Cibacron blue 3GA-agarose was from Sigma; and the Superdex 200 HR 10/30 column was from Amersham Pharmacia Biotech.

Search for Zinc-containing Alcohol Dehydrogenases in *S. cerevisiae*

The consensus pattern GHEXXGXXXX(GA)XX(IVAC), found in the zinc-containing medium-chain ADH family (18–20), was used as the input sequence in the BLAST program (NCBI, National Institutes of Health) to search for open reading frames in the *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database. This sequence contains a histidine that is the second ligand of the catalytic zinc and several glycines that are important for structural reasons in the substrate-binding domain of these enzymes (21). Multiple sequence alignments were generated using ClustalW Version 1.7 software (22) in combination with TreeView Version 1.6.1 (23) to study phylogenies.

Yeast and Bacterial Strains, Plasmids, and Media

Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA) was used for cloning procedures. The yeast ADH-deficient strain WV36-405 (*MATa*, *ade2*, *ura3-52*, *trp1*, *adh1Δ*, *adh2Δ*, *adh3*, *adh4::TRP1*) (24), constructed by Dr. Wolfgang Vogel (Institut für Strahlenbiologie, Neuherberger, Germany) and generously provided by Dr. Silvia Atrian (Universitat de Barcelona), was used to search for the function of the *YAL060W* gene product. Because of its low background in alcohol oxidation reactions, this strain is useful in ascertaining potentially new ADH genes. The yeast strain FY834α (*MATα*, *his3Δ200*, *ura3-52*, *leu2Δ1*, *lys2Δ202*, *trp1Δ63*) (25), used in the *S. cerevisiae* genome project, was used here to amplify the *YAL060W* gene by PCR. The cell growth in the presence of 2,3-butanediol, and the levels of 2,3-butanediol dehydrogenase activity in the homogenates were studied in both yeast strains (WV36-405 and FY834α). The protease-deficient yeast strain BJ5459 (*MATa*, *ura3-52*, *trp1*, *lys2-801*, *leu2Δ1*, *his3Δ200*, *pep4::HIS3*, *prb1Δ1.6R*, *can1*, *GAL*) (26), generously provided by Dr. Benjamí Piña (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain), was used to overexpress and purify the *YAL060W* gene product.

The inducible *E. coli*-yeast shuttle vector pYes2 (carrying the promoter and upstream activating sequences of *GAL1*) from Invitrogen (Carlsbad, CA) was used to clone and overexpress the *YAL060W* gene in yeast strains WV36-405 and BJ5459. *E. coli* cells were grown at 37 °C in LB medium supplemented with 50 μg/ml ampicillin to select for the desired plasmid constructs. Yeast strains WV36-405 and BJ5459 were grown at 30 °C in synthetic complete medium lactriourairl supplemented with 2% galactose to allow for the selection and induction of the yeast transformed with the pYes2 constructs. The medium used to grow the yeast in 2,3-butanediol contained 1% yeast extract (Difco), 2% peptone, and 0.5 or 3% 2,3-butanediol isomers (mixture of (2R,3R)-2,3-butanediol, (2S,3S)-2,3-butanediol, and *meso*-2,3-butanediol).

Subcloning Methods

All DNA manipulations were performed under standard conditions as described (27).

Amplification of *YAL060W*—Yeast genomic DNA was isolated from yeast strain FY834α by standard methods (28), and the *YAL060W* gene was amplified by PCR using the oligonucleotide 5'-GGGGTACCAAT-TATGAGAGCTTTGGCATATTTC-3', which hybridizes at the 5'-end of the gene and carries a *KpnI* restriction site, and the oligonucleotide 5'-GCGGAATTCCTTACTTTCATTTCCACCGTGATTGTTAG-3', which hybridizes at the 3'-end and carries an *EcoRI* restriction site. The amplification initiated with a "hot start," which was followed by five cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 57 °C, and 90 s of extension at 72 °C. This initial phase was followed by 25 more cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C, and 90 s of extension at 72 °C at the end. The PCR mixture contained 1 unit of *Vent* DNA polymerase, 1 μM each primer, 200 μM each dNTP, and 2 mM MgSO₄.

Construction of pYes2-*YAL060W*—To construct the *YAL060W* expression vector under the control of the *GAL1* promoter, the gel-purified PCR product obtained above was digested with *KpnI* and *EcoRI* and ligated to the pYes2 vector digested with the same restriction enzymes. Both chains of the plasmid construct, pYes2-*YAL060W*, were sequenced (Oswel Research Products, Southampton, UK) to verify that there were no mutations introduced by PCR and that the construct was correct.

Construction of Yeast Strains WV36-405(pYes2), WV36-405(pYes2-*YAL060W*), BJ5459(pYes2), and BJ5459(pYes2-*YAL060W*)—Yeast strains WV36-405 and BJ5459 were grown in rich medium and transformed with the pYes2 and pYes2-*YAL060W* vectors following the method of Ito *et al.* (29), and the transformants were selected on SC-Ura plates (28).

Disruption of the *YAL060W* Gene—The disruption of the *YAL060W* gene was carried out by one-step gene replacement (30) with the *TRP1* gene. The starting point was plasmid pYes2-*YAL060W*, containing the coding region of *YAL060W* that was digested with *MluNI*. This digestion removed ~360 base pairs of the *YAL060W* coding region and was followed by the insertion of the *TRP1* gene. The *TRP1* gene, which was obtained by digesting the YDp-W vector (31) with *BamHI*, was subcloned into the *MluNI* site mentioned above after making blunt ends. This construct was digested with *KpnI* and *EcoRI*, resulting in a linear fragment containing the *TRP1* gene flanked by homologous regions of the *YAL060W* gene. This fragment was introduced into the yeast haploid strain FY834α by the lithium acetate method (29), and after homologous recombination, the coding region of *YAL060W* was disrupted with the *TRP1* gene. The yeast cells that had incorporated the *TRP1* gene were selected by growing in Wikerham's medium supplemented for all auxotrophs except for tryptophan. The disruption of the *YAL060W* gene in several transformants was confirmed by PCR of the genomic DNA and by enzyme activity in the homogenates of the resulting yeast strains.

Enzyme Assays

Enzyme activities were determined spectrophotometrically by measuring the change in absorbance at 340 nm and 25 °C corresponding to the oxidation of NADH ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) or the reduction of NAD⁺. The purification of the *YAL060W* gene product was followed by measuring the activity with 120 mM (2R,3R)-2,3-butanediol and 4 mM NAD⁺ in 33 mM sodium pyrophosphate (pH 8). To determine the steady-state kinetic constants, the enzyme assays were carried out with the pH 8 buffer and 5 mM NAD⁺ for the oxidation reactions, and with 33 mM sodium phosphate (pH 7) 0.2 mM NADH for the reduction reactions. After adding 20–50 μl of enzyme solution, the reaction was started by the addition of the substrate. One unit of activity corresponds to 1 μmol of NAD(H) formed/min. The initial velocities were measured in duplicate at eight different substrate concentrations, and the kinetic constants were calculated using the nonlinear regression program Enzfitter (Elsevier/Biosoft). All reported values are expressed as the mean ± S.E. of at least three separate experiments.

Enzyme Purification

(2R,3R)-2,3-Butanediol dehydrogenase (BDH) was purified from yeast strain BJ5459(pYes2-*YAL060W*), and all the purification steps were carried out at 4 °C. The cells (34 g) were suspended in 34 ml of buffer A (20 mM potassium phosphate (pH 6.8) containing 30% glycerol and 0.5 mM dithiothreitol) and broken up with glass beads 0.5 mm in diameter. The lysate was centrifuged at 29,000 × *g* for 1 h, and the supernatant was applied to a hydroxylapatite Bio-Gel HT column (10.5 × 2 cm) equilibrated with buffer A. After washing the column with 250 ml of the same buffer, the enzyme was eluted with a linear gradient of 20–600 mM potassium phosphate (pH 6.8) containing 30% glycerol and 0.5 mM dithiothreitol in a 400-ml total volume. The active fractions were pooled; concentrated in an Amicon concentrator, which also served

for changing the buffer to buffer A; and applied to a Cibacron Blue 3GA-agarose column (11.5 × 2.4 cm) equilibrated with buffer A. After washing the column with buffer (330 ml), a linear gradient of NADH (0–250 μM in 200 ml) was applied. After washing again with buffer A (185 ml), the enzyme was eluted with a linear gradient of 0–2 M NaCl in 700 ml of buffer. The active fractions were pooled and applied to a Superdex 200 HR 10/30 gel filtration column equilibrated with 50 mM sodium phosphate (pH 7), 0.15 M NaCl, and 30% glycerol. The column was eluted at a flow rate of 0.2 ml/min with the equilibration buffer. The purified enzyme was concentrated and stored at –80 °C.

Molecular Mass Determinations

The relative mass of the native enzyme was determined by size exclusion chromatography at 22 °C on a Superdex 200 HR 10/30 column. The column was connected to a high performance liquid chromatography apparatus (Waters) and was equilibrated with 2 volumes of 50 mM sodium phosphate (pH 7), 0.15 M NaCl, and 30% glycerol. The column was run at a flow rate of 0.2 ml/min. The molecular mass was estimated by comparison with the elution of protein standards. The molecular mass was also determined by native gradient polyacrylamide gel electrophoresis, in which proteins were visualized by silver staining. The submolecular structure of the enzyme was studied under denaturing conditions by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (32) and silver staining.

Other Electrophoretic Methods

Isoelectric focusing was performed according to a reported method (33). The pI of the YAL060W gene product was determined by comparison with known standards (isoelectric focusing calibration kit, Amersham Pharmacia Biotech). The BDH activity was visualized by incubating the gel at pH 8.6 with 0.5 M (2R,3R)-2,3-butanediol, 0.6 mM NAD⁺, 5-methylphenazine methosulfate (0.1 mg/ml), and nitro blue tetrazolium chloride (0.2 mg/ml).

Gas-Liquid Chromatography

GLC analyses were performed in a Shimadzu GC-14B gas chromatograph equipped with a chiral column (Supelco β-DEX™ 120, 30-m length, 0.25-mm inner diameter), helium as the carrier gas (2.4 ml/min), and a flame ionization detector (275 °C). The following temperature program was used: isotherm at 75 °C for 8 min, 2 °C/min ramp to 85 °C, and isotherm at 85 °C. A standard mixture of 40 mM (3R/3S)-acetoin, 7.5 mM (2S,3S)-2,3-butanediol, 9.5 mM (2R,3R)-2,3-butanediol, and 7 mM *meso*-2,3-butanediol was prepared by dissolving the pure compounds in 30 mM sodium phosphate buffer (pH 7). One volume of the standard mixture was extracted with 1 volume of ethyl acetate, and 1 μl of the organic phase was applied to the chiral column. This extraction protocol was repeated three times, showing that the recovery of the compounds was >70% after the first extraction and that the relative percentages of the recovered compounds were similar for each extraction step. The reagents and products of the enzymatic reaction mixtures were extracted with ethyl acetate before the analysis by GLC.

RESULTS

Search for Zinc-containing Alcohol Dehydrogenases in S. cerevisiae—The search performed with the BLAST program found the following genes of unknown function that could be members of the NAD⁺-dependent, zinc-containing medium-chain alcohol dehydrogenases: YDL246C, which codes for a protein nearly identical (>99% identity) to the product of the SOR1 gene (sorbitol dehydrogenase), and YAL060W and YAL061W, two adjacent genes classified as genes coding for proteins with similarity to alcohol/sorbitol dehydrogenases. Two other genes, YMR318C and YCR105W, also belong to the yeast MDR family, although they have been found to code for NADP(H)-dependent enzymes (see below).

A multiple sequence alignment performed with these five gene products, together with the seven dehydrogenases of known function (mentioned in the Introduction), was used to generate a phylogenetic tree based on the neighbor-joining method of Saitou and Nei (34) with 1000 bootstraps. The topology of the tree with the zinc-containing MDR enzymes from yeast (Fig. 1B) shows three main groups. Yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is in the first group, whereas the second group (formed by enzymes active with

polyol substrates) is composed of two subgroups: BDH (the product of the YAL060W gene; active with 2,3-butanediol) and Yal061p (with 51% identity to BDH and of unknown function) are in the first subgroup, whereas xylitol dehydrogenase, sorbitol dehydrogenase, and Ydl246p (active with sugars) are in the second. The third group is composed of two subgroups: the first one clusters the ethanol-active enzymes ADHI, ADHII, ADHIII, and ADHV, whereas the second is composed of two NADP(H)-dependent cinnamyl-alcohol dehydrogenases (Ycr105p and Ymr318p, showing 64% identity) recently characterized in our laboratory.² Among the several previously uncharacterized MDR enzymes from yeast, we describe in this work the results found with YAL060W.

Homologous Overexpression and Purification of the YAL060W Gene Product—Sequencing demonstrated that the construct for overexpressing the YAL060W gene was correct. To easily follow the purification of the corresponding enzyme, we needed to find a specific substrate. The sequence of the enzyme was similar (>30% sequence identity) to different alcohol and sorbitol dehydrogenases. Thus, to avoid interferences with related activities, we used an alcohol dehydrogenase-deficient strain (WV36-405) to transform with a multicopy inducible vector carrying the YAL060W gene. The activity toward several alcohols was measured in the corresponding homogenate, whereas the same strain transformed with the same plasmid without insert served as a control. The best substrate for the overexpressed enzyme was (2R,3R)-2,3-butanediol. The (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase-specific activity of the homogenate of the WV36-405 strain carrying the expression vector pYes2-YAL060W was 130 times higher than that of the homogenate of the control strain (10.9 versus 0.08 units/mg). The product from the YAL060W gene was therefore a 2,3-butanediol dehydrogenase, which was later confirmed by kinetic analysis (see below). We designated the enzyme BDH.

When BDH was overexpressed in yeast strain WV36-405, we found that 30% of the activity of BDH was lost from the lysate fraction after 2 h at 4 °C (in 20 mM potassium phosphate (pH 6.8) with 5 mM dithiothreitol). The initial activity was retained, however, in the presence of the same extraction buffer containing 30% glycerol. We decided therefore to overexpress and purify the enzyme from a protease-deficient yeast strain (BJ5459) using 30% glycerol in the buffers of all the purification steps. In addition, we had to develop a rapid protocol to purify the enzyme. Essentially, the homogenate was fractionated with a hydroxylapatite column, followed by dye-ligand chromatography and gel filtration chromatography. Table I shows the results of a typical purification experiment starting with 34 g of BJ5459(pYes2-YAL060W) cells. A major step in purification was the dye-ligand chromatography. The efficiency of this step was due, in part, to the strong binding of BDH to the column. An NADH gradient did not elute the enzyme, but eliminated other dehydrogenases. High ionic strength was needed to elute BDH. After the gel filtration step, the resulting enzyme was homogeneous, as detected by a single band upon SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and native polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 2C). This last chromatographic step was also important to eliminate NADH, which otherwise would inhibit the oxidative reactions. The increase in specific activity after the gel filtration chromatography (Table I) is mostly a consequence of the NADH elimination since the preparation was already free from extraneous proteins after the dye-ligand chromatography (Fig. 2C). The pure enzyme was stable when kept at –80 °C with 30% glycerol for >1 month.

² C. Larroy, M. R. Fernández, E. González, X. Parés and J. A. Biosca, manuscript in preparation.

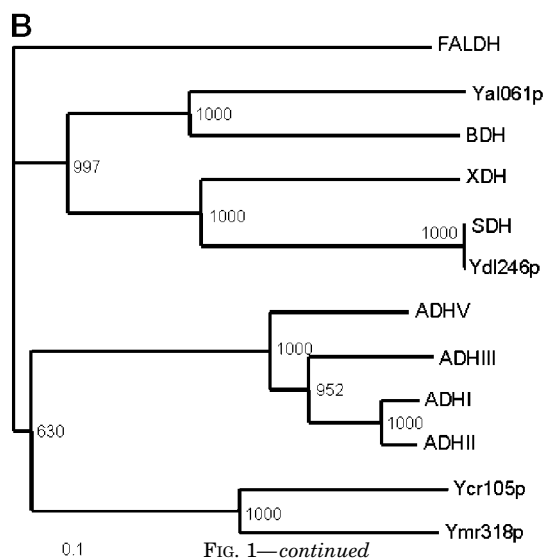


FIG. 1—continued

TABLE I

Purification of yeast (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase

Activity was measured with 120 mM (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and 5 mM NAD in 33 mM sodium pyrophosphate (pH 8.0)

Step	Protein mg	Total activity units	Specific activity units/mg	Purification -fold	Yield %
Crude extract	218	5427	25	1	100
Hydroxylapatite	15	3799	253	10	70
Cibacron blue 3GA-agarose	0.76	493.3	647	26	9
Gel filtration	0.15	148	968	39	2.7

hydrogenase was obtained (Fig. 2*B*). Given the close isoelectric points of BDH (pI 6.9) and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (pI 6.7) (35) and the known molecular mass (80,000 Da) of yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, this technique also supports a molecular mass of ~80,000 Da for the native BDH. Analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed a protein band of ~41,000 Da (Fig. 2*C*), consistent with the predicted molecular mass of the BDH protein sequence (41,530 Da). We conclude that the native BDH is a homodimer composed of two subunits with molecular masses of 41,000 Da.

Substrate Specificity and Kinetic Properties—BDH catalyzed the oxidation of several 1,2- and 2,3-diols (Table II), showing a higher activity for secondary alcohols (such as 2,3-butanediol) than for primary alcohols (such as 1,2-butanediol), with a maximum of activity toward (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol. (2*S*,3*S*)-2,3-Butanediol was neither a substrate of the enzyme nor an inhibitor for the oxidation of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol. (100 mM (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol did not inhibit the oxidation of 15 mM (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol.) BDH could oxidize *meso*-2,3-butanediol, although showing less activity than with the 2*R*,3*R*-isomer. The enzyme could not oxidize (3*R*/3*S*)-acetoin (a racemic mixture of (3*R*)- and (3*S*)-3-hydroxy-2-butanone), glycerol, sorbitol, or xylitol.

Either α -diketo groups or vicinal hydroxyketo functions were required as structural elements of the compounds that were substrates for the reduction reaction. Thus, (3*R*/3*S*)-acetoin was the best substrate in the reduction reaction, followed by diacetyl (2,3-butanedione). Other substrates were hydroxyacetone, methylglyoxal, dihydroxyacetone, and 2,3-pentanedione. As in the oxidation reactions, the four-carbon length substrates were also preferred in the reduction reactions.

The enzyme specifically required NAD(H), which could not

be substituted by NADP(H). Thus, the activity displayed with NADP(H) was <1% of the activity with NAD(H) (at 5 mM oxidized cofactors and 1 mM reduced cofactors) with (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and (3*R*/3*S*)-acetoin, respectively.

The rate of the enzymatic reactions was affected by the pH of the assay buffer. The pH optima for the oxidation of 10 mM (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and for the reduction of 10 mM (3*R*/3*S*)-acetoin were 8 and 7, respectively. We tried to determine the kinetic parameters for all the best substrates assayed for BDH (Table II). However, only (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, *meso*-2,3-butanediol, and 1,2-butanediol for the oxidation and (3*R*/3*S*)-acetoin for the reduction saturated the enzyme (Table III). The catalytic efficiency constant (k_{cat}/K_m) was greater for the reduction of (3*R*/3*S*)-acetoin than for the oxidation of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol. Moreover, the K_m for NADH was 10-fold lower than that for NAD. Therefore, the enzyme would preferentially function as a reductase rather than as a dehydrogenase.

Stereospecificity of BDH—Some experiments were carried out to unambiguously demonstrate the specificity of the enzyme in the oxidation-reduction processes of the 2,3-butanediol/acetoin interconversion. In the first place, we developed a GLC analytical system able to efficiently separate substrates and products of the reaction. The retention times of the substrates and products were as follows: (3*R*)-acetoin, 9.9 min; (3*S*)-acetoin, 10.6 min; (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol, 26.6 min; (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, 27.9 min; and *meso*-2,3-butanediol, 31.1 min (Fig. 3*A*). With respect to the oxidation reaction, when *meso*-2,3-butanediol was incubated in the presence of BDH and NAD⁺ (Fig. 3*C*), (3*S*)-acetoin was the only product detected. This acetoin resulted from the selective oxidation of the alcohol function at the *R*-carbon of the *meso*-diol. No (3*R*)-acetoin was detected, which would arise from the oxidation of the *S*-carbon, confirming the extremely high specificity (>99.9% enantiomeric excess) of the enzyme for carbons possessing an *R*-configuration. On the other hand, when (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol was treated under the same reaction conditions (Fig. 3*B*), (3*R*)-acetoin was, as expected, the only product obtained. Moreover, the absence of (3*S*)-acetoin among the products of this reaction provides additional information: no racemization occurred at all under the employed experimental conditions. Concerning the reduction process, when a racemic mixture of (3*R*/3*S*)-acetoin was incubated in the presence of BDH and NADH (Fig. 3*D*), a completely enantioselective reduction of the carbonyl groups leading to an *R*-alcohol took place. Thus, a product mixture of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol (arising from (3*R*)-acetoin) and *meso*-2,3-butanediol (arising from (3*S*)-acetoin) was obtained. Although both acetoin were substrates for the enzyme, the *R*-isomer was considerably more reactive since the final reaction mixture was enriched in the (3*S*)-acetoin (Fig. 3*D*) as compared with the initially identical concentrations of both isomers. Controls, performed for all experiments at identical conditions, but without BDH, showed no significant conversion (<3%) to the corresponding products.

Growth on 2,3-Butanediol—The wild-type FY834 α yeast strain could grow on 2,3-butanediol (mixture of 2*R*,3*R*-, 2*S*,3*S*-, and *meso*-isomers) as the sole energy and carbon source, with growth rates of 0.06 and 0.05 h⁻¹ at 3 and 0.5% 2,3-butanediol, respectively. The extract of FY834 α cells harvested at its late exponential phase had specific activities for the oxidation of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol of 0.25 units/mg of protein for a culture grown on 2% glucose and of 0.93 units/mg for a culture grown on 3% 2,3-butanediol. When these extracts were analyzed on an isoelectric focusing gel and stained by activity with (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and NAD⁺, a clear induction of the enzyme was observed (Fig. 4). The maximum cell densities reached with the FY834 α yeast strain were 1.2×10^8 cells/ml when it was grown

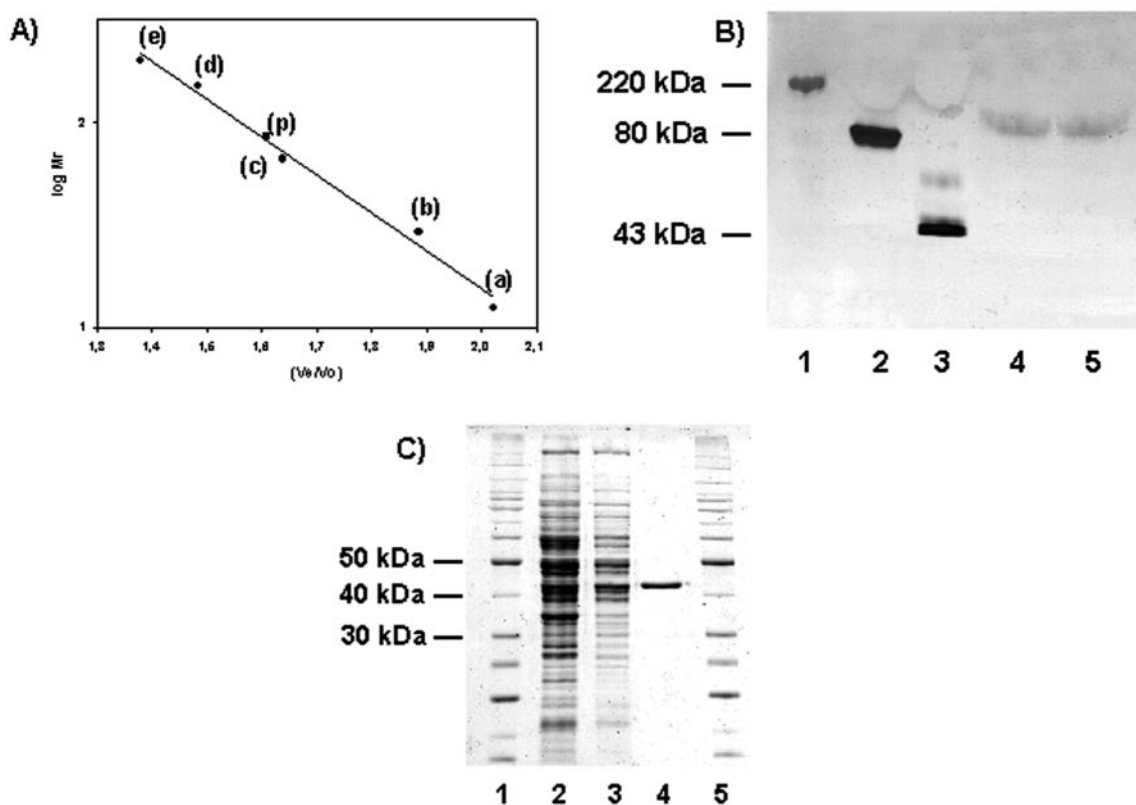


FIG. 2. Determination of the molecular properties of yeast (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase. *A*, size exclusion chromatography on a Superdex 200 HR 10/30 column. *a*, cytochrome *c* (12.4 kDa); *b*, carbonic anhydrase (29 kDa); *c*, bovine serum albumin (66 kDa); *d*, yeast alcohol dehydrogenase (150 kDa); *e*, β -amylase (200 kDa); *p*, BDH. *B*, native gradient polyacrylamide gel (8–25%) stained with silver salts. Lane 1, 0.4 μ g of catalase (220 kDa); lane 2, 0.4 μ g of yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (80 kDa); lane 3, 0.4 μ g of ovalbumin (43 kDa); lanes 4 and 5, 0.07 μ g of BDH. *C*, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the active fractions obtained after each purification step of yeast BDH. The proteins were revealed by silver staining. Lanes 1 and 5, molecular mass standards; lane 2, crude extract (10 μ g of protein); lane 3, hydroxylapatite chromatography (5 μ g); lane 4, Cibacron blue 3GA-agarose chromatography (1 μ g).

on 2% glucose and 1.2×10^7 cells/ml when it was grown on 2,3-butanediol.

Disruption of the YAL060W Gene—The disruption of the YAL060W gene was confirmed by PCR of genomic DNA from the transformed strains (Fig. 5) and by isoelectric focusing analysis and measurement of the (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase activity of the corresponding yeast extracts. Thus, the size of the PCR band resulting from the selective amplification of the genomic YAL060W locus with two primers that hybridize in the coding region of YAL060W was longer in the disrupted strain than in the wild type. This is due to the fact that the size of the TRP1 gene introduced is longer than the 360-base pair fragment eliminated from the coding region of YAL060W (Fig. 5). Moreover, isoelectric focusing analysis showed no (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase activity band in the disrupted strains as opposed to the one shown by the wild-type strain (data not shown). The disruption of the gene was not lethal for *S. cerevisiae*, although the cell density attained in the stationary phase by the disrupted strain grown on 2,3-butanediol (mixture of isomers) was half of the density attained by the wild-type strain.

DISCUSSION

The YAL060W gene product, BDH, exhibits the characteristic properties of an MDR enzyme (Fig. 1). Thus, as indicated in the multiple alignment of Fig. 1A, it shows a suitable chain length and has 13 amino acids highly conserved in the MDR family. These are distributed in three clusters: one in the substrate-binding domain (Gly⁶⁶, Gly⁷¹, Gly⁷⁷, Gly⁸⁶, and Val⁸⁰); another in the coenzyme-binding domain (Gly¹⁹², Gly²⁰¹, Gly²⁰⁴, and Gly²³⁶), with numbering according to the

numbering of horse liver ADH); and a third involved in the binding of the catalytic zinc (Cys⁴⁶ and His⁶⁷, putative ligands of the catalytic zinc, and Asp⁴⁹ and Glu⁶⁸, which are considered “second sphere ligands,” interacting with the zinc ligands themselves). We believe that the third ligand of the catalytic zinc in BDH would be Glu¹⁷⁴. Thus, it can be aligned with Glu¹⁷⁴ from mammalian sorbitol dehydrogenase (which is known to be a ligand of the catalytic zinc) (36) and also with Glu¹⁷⁴ from the *Pseudomonas putida* 2,3-butanediol dehydrogenase, where it has also been assigned as the third ligand for the catalytic zinc (37). It is also aligned with Asp¹⁷⁴ in *E. coli* threonine dehydrogenase (38) and with Cys¹⁷⁴ in *S. cerevisiae* ADHI, *S. cerevisiae* FALDH, and horse liver ADH, which are the known ligands occupying the third position in the coordination sphere of the catalytic zinc in these enzymes (20).

There are two more relevant residues conserved in the alignment: Ser⁴⁸ and Glu²²³. Ser⁴⁸ is aligned with Ser/Thr⁴⁸ in the other medium-chain ADHs and could function in a proton relay system to facilitate removal of the proton from the alcohol (39). Glu²²³, like Asp²²³ of the other members of the medium-chain ADH family, would interact with the 2'- and 3'-hydroxyl groups of the adenosine ribose of the coenzyme and would importantly contribute to the discrimination between NAD(H) and NADP(H) (40–42). The present BDH and *P. putida* BDH are the first examples of NAD(H)-dependent medium-chain ADHs with Glu²²³ instead of Asp²²³. The Glu²²³ change, a residue bigger than Asp and therefore imposing additional steric hindrance to an extra phosphate, could contribute to the stronger NAD⁺ specificity of BDH (practically without activity with NADP) as compared with other MDR enzymes that, in general,

TABLE II

Substrate specificity of yeast (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase

Enzyme activity in the oxidation reactions was measured with 100 mM substrate and 5 mM NAD in 33 mM sodium pyrophosphate (pH 8.0). The activity toward (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol (830 units/mg of protein) was taken as 100%. Reduction activities were measured with 50 mM substrate and 0.2 mM NADH in 33 mM sodium phosphate (pH 7.0). The activity toward (3*R*/3*S*)-acetoin (1090-units/mg of protein) was taken as 100%. ND, <0.2% of the activity detected.

Substrate	Activity
	%
Oxidation	
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-Butanediol	100
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2,3-Butanediol	ND
<i>meso</i> -2,3-Butanediol	42.8
1,2-Butanediol	31.7
1,3-Butanediol	ND
1,4-Butanediol	ND
1,2-Pentanediol	2.7
1,2-Propanediol	16.9
(2 <i>R</i>)-Butanol	ND
Ethanol	ND
Glycerol	ND
Acetoin	ND
1,2-Pentanediol	2.7
Sorbitol	ND
Xylitol	ND
Reduction	
Acetoin	100
Glyceraldehyde	0.43
Glyoxal	ND
Methylglyoxal	23.5
1-Hydroxy-2-propanone	20.2
1,3-Dihydroxyacetone	9.4
Diacetyl	51.4
2,3-Pentanedione	8.7

TABLE III

Kinetic constants of yeast (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase

Alcohol oxidation activities were measured in 33 mM sodium pyrophosphate (pH 8.0) with 5 mM NAD. Ketone reduction activities were measured in 33 mM sodium phosphate (pH 7.0) with 0.2 mM NADH. NAD and NADH kinetic analyses were performed with 120 mM (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and 50 mM (3*R*/3*S*)-acetoin, respectively. NS, no saturation could be reached up to 100 mM diacetyl or up to 20 mM 2,3-pentanedione.

Variable substrate	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
	mM	min ⁻¹	mM ⁻¹ min ⁻¹
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-Butanediol	14 ± 5	78,000 ± 1300	5600 ± 2000
<i>meso</i> -2,3-Butanediol	65 ± 9	46,000 ± 2000	700 ± 100
1,2-Butanediol	57 ± 7	36,400 ± 800	640 ± 80
NAD	0.55 ± 0.03		
(3 <i>R</i> /3 <i>S</i>)-Acetoin	4.5 ± 0.5	98,000 ± 4000	21,700 ± 2600
Diacetyl	NS		
2,3-Pentanedione	NS		
NADH	0.055 ± 0.005		

have some activity with NADP(H).

Whereas several members of the zinc-containing medium-chain ADH family have two Zn²⁺ ions/subunit, others, such as mammalian sorbitol dehydrogenase, have only one (36). Although the alignment of BDH with the members of the medium-chain ADH family is reasonably good for the ligands of the catalytic zinc, it is more speculative in regard to the ligands for the so-called "structural zinc." The ligands for the structural zinc in the medium-chain ADHs are four cysteines located within a short-segment region. In the case of BDH, there are four cysteines aligned with the cysteines that typically act as the zinc ligands in medium-chain ADHs (Cys⁹⁷, Cys¹⁰⁰, Cys¹⁰³, and Cys¹¹¹). It is possible, then, that BDH could bind a second zinc, although the long insertion existing between Cys⁹⁷ and Cys¹⁰⁰ may interfere with the binding.

The phylogenetic tree generated from a multiple sequence

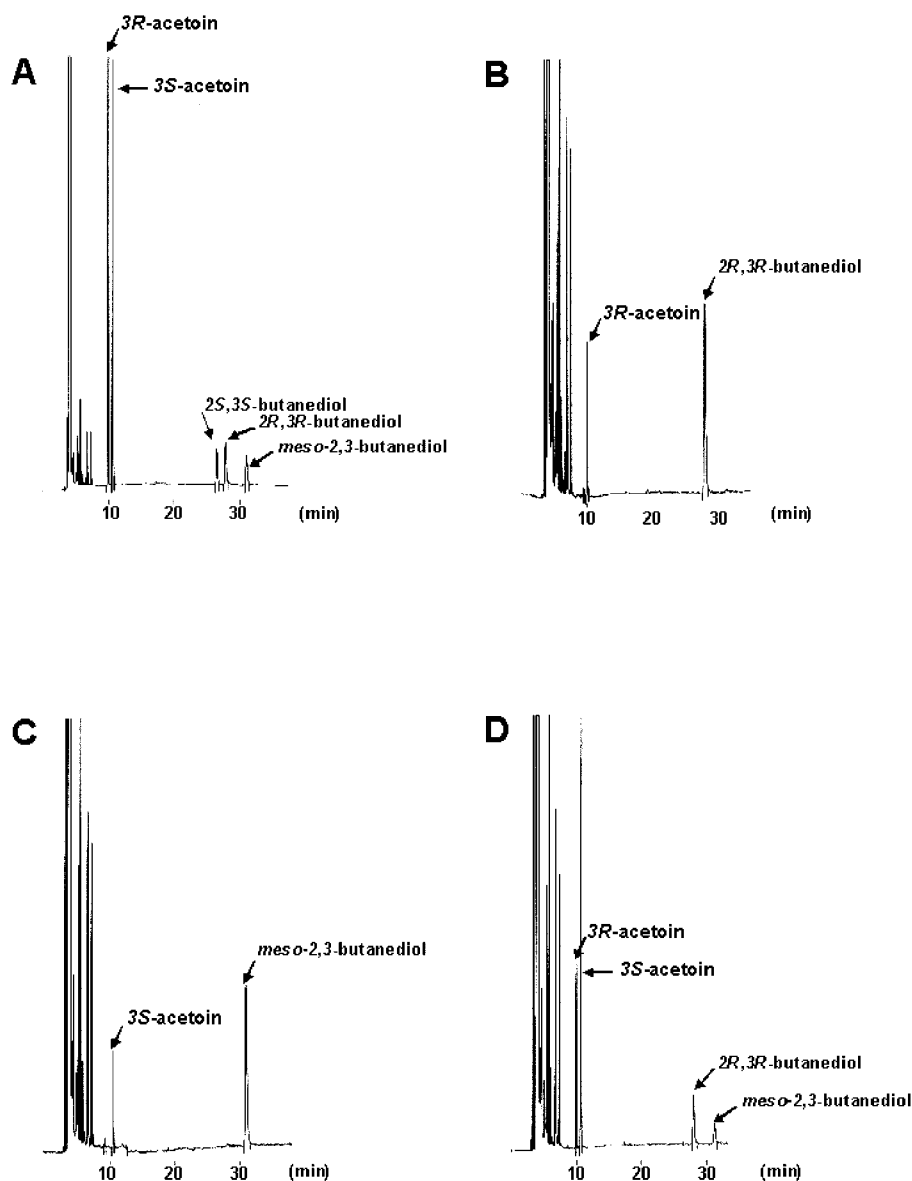
alignment of 12 MDR enzymes from *S. cerevisiae* containing the "zinc ADH signature" resulted in five subgroups. Whereas the clustering of the polyol MDR enzymes (xylitol dehydrogenase, sorbitol dehydrogenase, and its close homolog Yal246p in one subgroup and BDH and Yal061p in the other) is well supported (>95% bootstraps), the grouping of the two other clusters (the one comprising the ethanol-active enzymes (ADHI, ADHII, ADHIII, and ADHV) and the one with the putative cinnamyl-alcohol dehydrogenases (Ycr105p and Ymr318p)) is supported by only 63% of the bootstraps. Ycr105p has already been described as an MDR enzyme in a recent report (43).

The *S. cerevisiae* YAL060W gene product, BDH, catalyzes the NAD⁺-dependent oxidation of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and *meso*-2,3-butanediol to (3*R*)-acetoin and (3*S*)-acetoin, respectively, as well as the corresponding reverse reactions. A chiral column that could resolve the three 2,3-butanediol isomers and the two acetoin isomers was used to demonstrate the stereospecificity of the enzyme. The GLC profiles indicated that the oxidation of *meso*-2,3-butanediol yielded (3*S*)-acetoin (showing the specificity toward the secondary alcohol in *R*-configuration), whereas the reduction of (3*R*/3*S*)-acetoin yielded (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol (from (3*R*)-acetoin) and *meso*-2,3-butanediol (from (3*S*)-acetoin). This demonstrated that the reduction of the carbonyl from acetoin yielded also the *R*-configuration of the corresponding alcohol. It has also been shown that the rate of the reduction of the carbonyl depends on the configuration of the vicinal alcohol, being greater if it is in *R*-configuration than in *S*-configuration. This is also true for the oxidation reaction since the k_{cat} value for the oxidation of *meso*-2,3-butanediol is approximately two-thirds of the value found for the oxidation of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol. As many other 2,3-butanediol dehydrogenases, BDH can also reduce diacetyl to acetoin.

Other 2,3-butanediol dehydrogenases have been partially characterized in *S. cerevisiae* (44), *Candida utilis* (45, 46), and *Candida salmanticensis* (45), although their properties are different from those of the present enzyme. Thus, the molecular mass of the enzyme from *S. cerevisiae* is 140,000 Da, with a subunit molecular mass of 35,000 Da (44), whereas the molecular mass of the enzyme studied here is 81,800 Da, with a subunit molecular mass of 41,000 Da. Also, the specific activity given by the pure (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase previously isolated from *S. cerevisiae* was 20.25 units/mg, but was >900 units/mg in the present work (measured under similar conditions). Also, the present kinetic constants differ from those in the previous report. The specific activities and the kinetic constants of the enzymes with 2,3-butanediol dehydrogenase activity from *C. utilis* (45, 46) were also different from those of our enzyme. Moreover, the lack of sequence information for those enzymes precludes a complete comparison with the present BDH.

Most prokaryotic 2,3-butanediol dehydrogenases characterized so far in terms of their stereospecificity toward the different 2,3-butanediol isomers and corresponding acetoin (such as the ones from *Brevibacterium saccharolyticum*, *Klebsiella terrigena*, and *Klebsiella pneumoniae* (47–49)) have characteristics of the SDR family of enzymes. Only one known example in prokaryotes, the BDH from *P. putida*, corresponds to an MDR enzyme (37). It shows 36.5% identity (and 45.6% similarity) to BDH (Fig. 1 A), which represents the highest homology found for BDH to any related enzyme. Little is known of enzymes with BDH specificity in eukaryotes. The only reported eukaryotic BDH, a bovine butanediol dehydrogenase similar to that from *K. terrigena*, also belongs to the SDR family (50). Therefore, the present enzyme from *S. cerevisiae*, BDH, would be the

FIG. 3. GLC analyses of the substrates and products of reactions catalyzed by (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase. A, a standard mixture of 40 mM (3*R*/3*S*)-acetoin, 7.5 mM (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol, 9.5 mM (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, and 7 mM *meso*-2,3-butanediol in 100 mM sodium phosphate (pH 7) was extracted with ethyl acetate, and 1 μ l of the organic phase was inoculated in the GLC apparatus. B–D, shown are the products after the reaction catalyzed by 2 units of BDH with the following initial mixtures prepared at 40 mM concentrations: (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and NAD⁺ (B), *meso*-2,3-butanediol and NAD⁺ (C), and (3*R*/3*S*)-acetoin and NADH (D). All starting mixtures, including the standard, were dissolved in 100 mM sodium phosphate (pH 7) and were allowed to proceed for 24 h at room temperature. The final mixtures were extracted with ethyl acetate and analyzed by GLC as described under "Experimental Procedures."



first characterized eukaryotic MDR with demonstrated stereospecificity toward the 2,3-butanediol isomers (and corresponding acetoin).

During normal alcoholic fermentation from glucose, yeast produces 2,3-butanediol at a concentration of ~ 1 mM (51). This compound derives from the reduction of the physiological intermediates acetoin (3-hydroxy-2-butanone) and diacetyl (2,3-butanedione) (52) and constitutes a mixture of $\sim 67\%$ (2*R*,3*R*)-(-)-2,3-butanediol and 33% *meso*-2,3-butanediol (51), although a small percentage of (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol cannot be excluded. There is general agreement that acetoin, the precursor of 2,3-butanediol, is produced by yeast at least by three different mechanisms (53–56) (Fig. 6): 1) by the action of pyruvate decarboxylase, which catalyzes an aldol-type condensation reaction between two molecules of acetaldehyde; 2) by the addition of acetaldehyde to an intermediate formed between pyruvate and thiamin pyrophosphate in a reaction also catalyzed by pyruvate decarboxylase; and 3) by the action of α -acetolactate synthase on pyruvate, yielding α -acetolactate, which is decarboxylated to diacetyl and reduced to acetoin. Although it has been reported that *S. cerevisiae* does not have α -acetolactate decarboxylase, it still can produce diacetyl from α -acetolactate by spontaneous oxidative decarboxylation (57, 58). Moreover,

the yeast has at least two NADPH-dependent diacetyl reductases, which can reduce diacetyl to (3*R*)-acetoin and (3*S*)-acetoin (59).

In *P. putida*, the gene coding for 2,3-butanediol dehydrogenase is part of the acetoin dehydrogenase operon that allows this bacterium to grow on 2,3-butanediol (37). *S. cerevisiae* can also grow on 2,3-butanediol as the sole carbon and energy source, and the yeast shows a >3 -fold increase in BDH content when it grows in the presence of this compound. These data suggest that the enzyme reported here is needed in both, the fermentation giving 2,3-butanediol from acetoin, and under oxidation conditions allowing the yeast to use 2,3-butanediol as a carbon and energy source.

The fact that the strain with the *YAL060W* gene disrupted could still grow on 2,3-butanediol (mixture of isomers) indicates that *S. cerevisiae* has other enzymes that can metabolize 2,3-butanediol. We are currently using the *YAL060W*-disrupted yeast strain to study the induction of other genes by 2,3-butanediol.

A potential use of BDH would be in the synthesis of chiral acetoinic pure compounds (the three 2,3-butanediol and two acetoin isomers) and other related compounds. An enzyme already reported in this regard is (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol dehydro-

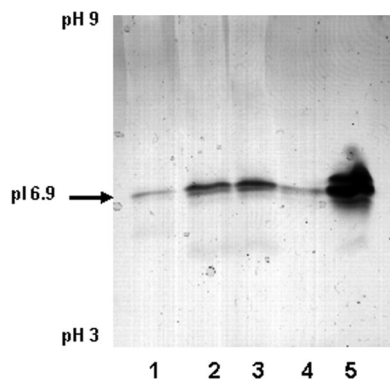


FIG. 4. Isoelectric focusing analysis (pH 3–9) of purified BDH and extracts of yeast strains grown on different carbon sources.

Lane 1, homogenate of FY834 α cells (38 μ g of protein) grown on 2% glucose (0.25 units/mg of protein); lanes 2 and 3, homogenates of FY834 α cells (48 μ g of protein) grown on 3% 2,3-butanediol (mixture of isomers; 0.93 units/mg of protein); lane 4, 0.02 μ g of purified BDH (968 units/mg of protein); lane 5, homogenate of yeast cells overexpressing BDH (WV36–405(pYes2-YAL060W); 48.3 μ g of protein) grown on 2% galactose (10.9 units/mg of protein). The cells were harvested in the mid-exponential phase, and the crude extracts were obtained by agitation with glass beads. Activity staining was performed with (2R,3R)-2,3-butanediol.

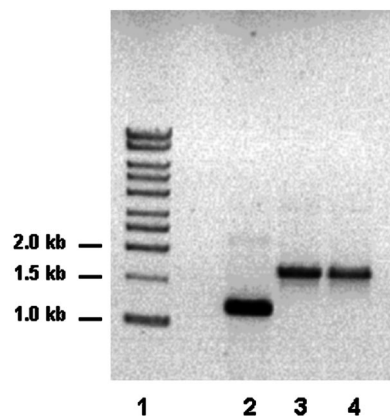


FIG. 5. Analysis of the disruption of the YAL060W gene from *S. cerevisiae*. Shown are the results from the agarose gel electrophoresis (0.7%) of genomic DNA from the FY834 α , EG2, and EG3 yeast strains (isogenic to FY834 α , except with *yal060w::TRP1*) amplified with two oligonucleotides that hybridize to YAL060W. Lane 1, molecular size standards (shown in kilobases (kb)); lane 2, PCR fragment obtained by the amplification of the YAL060W gene from FY834 α ; lanes 3 and 4, PCR fragments obtained by the amplification of the *yal060w*-disrupted gene (*yal060w::TRP1*) from EG2 and EG3.

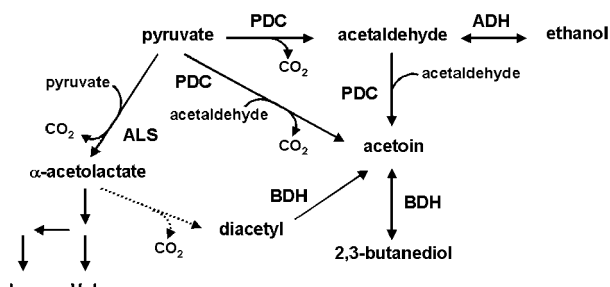


FIG. 6. Metabolic pathway for the formation of acetoin and 2,3-butanediol in yeast. Acetoin can be produced from acetaldehyde and pyruvate by the action of the thiamin pyrophosphate-dependent enzyme, pyruvate decarboxylase (PDC), located in the cytosol. It can also be formed by the reduction of diacetyl, arising from the spontaneous decarboxylation (broken arrow) of α -acetolactate produced by the mitochondrial enzyme α -acetolactate synthase (ALS). The diacetyl reduction reaction can be catalyzed by the NAD(H)-dependent enzyme BDH and by two NADP(H)-dependent diacetyl reductases (not shown in the pathway). 2,3-Butanediol arises from the reduction of acetoin by BDH.

genase from *Bacillus stearothermophilus* (60, 61), which has been used for the interconversion between (2S,3S)-2,3-butanediol and (3S)-acetoin and in the preparation of enantiomerically pure bicyclic octenols/octenones and heptenols/heptenones.

REFERENCES

- Botstein, D., Chervitz, S. A., and Cherry, J. M. (1997) *Science* **277**, 1259–1260
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R., and Brown, P. O. (1997) *Science* **278**, 680–686
- Jörnvall, H., Danielsson, O., Eklund, H., Helmqvist, L., Höög, J.-O., Parés, X., and Shafiqat, J. (1993) in *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* (Weiner, H., Crabb, D. W., and Flynn, T. G., eds) Vol. 4, pp. 533–544, Plenum Press, New York
- Persson, B., Zigler, J. S., Jr., and Jörnvall, H. (1994) *Eur. J. Biochem.* **226**, 15–22
- Bennetzen, J. L., and Hall, B. D. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 3018–3025
- Ciriacy, M. (1975) *Mol. Gen. Genet.* **135**, 157–164
- Wills, C., and Jörnvall, H. (1979) *Eur. J. Biochem.* **99**, 323–331
- Russell, D. W., Smith, M., Williamson, V. M., and Young, E. T. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 2674–2682
- Young, E. T., and Pilgrim, D. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3024–3034
- Feldmann, H., Aigle, M., Aljinovic, G., André, B., Baclet, M. C., Barthe, C., Baur, A., Becam, A. M., Biteau, N., Boles, E., et al. (1994) *EMBO J.* **13**, 5795–5809
- Wehner, E. P., Rao, E., and Brendel, M. (1993) *Mol. Gen. Genet.* **237**, 351–358
- Fernández, M. R., Biosca, J. A., Norin, A., Jörnvall, H., and Parés, X. (1995) *FEBS Lett.* **370**, 23–26
- Fernández, M. R., Biosca, J. A., Torres, D., Crossas, B., and Parés, X. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 37869–37875
- Sarthy, A., Schopp, C., and Idler, K. B. (1994) *Gene (Amst.)* **140**, 121–126
- Richard, P., Toirani, M. H., and Penttilä, M. (1999) *FEBS Lett.* **457**, 135–138
- Williamson, V. M., and Paquin, C. E. (1987) *Mol. Gen. Genet.* **209**, 374–381
- Drewke, C., and Ciriacy, M. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **950**, 54–60
- Persson, B., Hallborn, J., Walfridsson, M., Hahn-Hägerdal, B., Keränen, S., Penttilä, M., and Jörnvall, H. (1993) *FEBS Lett.* **324**, 9–14
- Jörnvall, H. (1994) in *Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse* (Jansson, B., Jörnvall, H., Rydberg, U., Terenius, L., and Vallee, B. L., eds) pp. 221–229, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland
- Reid, M. F., and Fewson, C. A. (1994) *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 13–56
- Sun, H., and Plapp, B. V. (1992) *J. Mol. Evol.* **34**, 522–535
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, J. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680
- Page, R. D. (1996) *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 357–358
- Atrian, S., González-Duarte, R., and Fothergill-Gilmore, L. A. (1990) *Gene (Amst.)* **93**, 205–212
- Winston, F., Dollard, C., and Ricupero-Hovasse, S. L. (1995) *Yeast* **11**, 53–55
- Jones, E. W. (1991) *Methods Enzymol.* **194**, 428–453
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Ausubel, F. H., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1991) *Current Protocols of Molecular Biology*, pp. 133.1–13.7.2, Greene Publishing/Wiley-Interscience, New York
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol.* **153**, 163–168
- Rothstein, R. J. (1983) *Methods Enzymol.* **101**, 202–211
- Berben, G., Dumant, J., Gilliquet, V., Bolle, P. A., and Hilger, F. (1991) *Yeast* **7**, 475–477
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Robertson, E. F., Dannelly, H. K., Malloy, P. J., and Reeves, H. C. (1987) *Anal. Biochem.* **167**, 290–294
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425
- Fernández, M. R. (1998) *Functional and structural studies of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from Saccharomyces cerevisiae. Cloning, detection and site-directed mutagenesis*. Ph.D. thesis, Universitat Autònoma de Barcelona
- Höög, J.-O., Karlsson, C., Eklund, H., Shapiro, R., and Jörnvall, H. (1993) in *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* (Weiner, H., Crabb, D. W., and Flynn T. G., eds) Vol. 4, pp. 439–450, Plenum Press, New York
- Huang, M., Oppermann, F. B., and Steinbüchel, A. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* **124**, 141–150
- Aronson, B., Somerville, R. L., Epperly, B. R., and Dekker, E. E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 5226–5232
- Eklund, H., Plapp, B. V., Samara, J. P., and Bränden, C.-I. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 14349–14358
- Jörnvall, H. (1977) *Eur. J. Biochem.* **16**, 25–40
- Ganzhorn, A. J., Green, D. W., Hershey, A. D., Gould, R. M., and Plapp, B. V. (1991) *J. Biol. Chem.* **262**, 3754–3761
- Plapp, B. V., Ganzhorn, A. J., Gould, R. M., Green, D. W., and Hershey, A. D. (1991) in *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* (Weiner, H., ed) pp. 241–251, Plenum Press, New York
- Wilkin, J. M., Soetaert, K., Stélandre, M., Buysens, P., Castillo, G., Demoulin, V., Bottu, G., Laneelle, M. A., Daffe, M., and De Bruyn, J. (1999) *Eur. J. Biochem.* **262**, 299–307
- Heidlas, J., and Tressl, R. (1990) *Arch. Microbiol.* **154**, 267–273
- Verduyn, C., Breeveld, G. J., Scheffers, A., and van Dijken, J. P. (1988) *Yeast* **4**, 135–142
- Verduyn, C., Breeveld, G. J., Scheffers, A., and van Dijken, J. P. (1988) *Yeast* **4**, 127–133
- Ui, S., Otogiri, M., Mimura, A., Dohmae, N., Takio, K., Ohkuma, M., and Kudo, T. (1998) *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 290–295

48. Ui, S., Okajima, Y., Mimura, A., Kanai, H., Kobayashi, T., and Kudo, T. (1997) *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 185–189
49. Blomqvist, K., Nikkola, M., Lehtovaara, P., Suihko, M., Airaksinen, U., Straby, K., Knowles, J., and Penttila, M. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 1392–1404
50. Smania, A. M., and Argaraña, C. E. (1997) *Gene (Amst.)* **197**, 231–238
51. Neish, A. C. (1950) *Can. J. Res.* **28B**, 660–661
52. Liebs, P., Wolter, H.-C., and Krüger, M. (1969) *Nahrung* **13**, 455–459
53. Chao-Chen, G., and Jordan, F. (1984) *Biochemistry* **23**, 3576–3582
54. Stivers, J. T., and Washabaugh, M. W. (1993) *Biochemistry* **32**, 13472–13482
55. Romano, P., and Suzzi, G. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.* **108**, 23–26
56. Tittel, D., and Radler, F. (1979) *Monatsschr. Brau.* **32**, 260–267
57. Suomalainen, H., and Ronkainen, P. (1968) *Nature* **220**, 792–793
58. Blomqvist, K., Suihko, M., Knowles, J., and Penttilla, M. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2796–2803
59. Heidlas, J., and Tressl, R. (1990) *Eur. J. Biochem.* **188**, 165–174
60. Giovannini, P. P., Medici, A., Bergamini, C. M., and Rippa, M. (1996) *Bioorg. Med. Chem.* **4**, 1197–1201
61. Giovannini, P. P., Hanau, S., Rippa, M., Bortolini, O., Fogagnolo, M., and Medici, A. (1996) *Tetrahedron* **52**, 1669–1676