



Caracterització fenotípica de soques de
Saccharomyces cerevisiae amb major
producció d'alcohols superiors aromàtics

Universitat Rovira i Virgili

Treball fi de grau, Biotecnologia

Autora: **Dària Ferré Alañá**

Tutora: Maria Jesús Torija Martínez

ÍNDEX

RESUM	3
INTRODUCCIÓ.....	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
Metabolisme del nitrogen	6
Objectiu	10
MATERIALS I MÈTODES	12
Selecció de soques	12
Tipificació de llevats.....	12
Preparació de l'inòcul	13
Condicions de fermentació	13
Seguiment de la fermentació.....	13
Determinació de compostos.....	14
RESULTATS i DISCUSSIÓ.....	16
Seguiment fermentació	16
Tipificació de llevats.....	18
Producció de compostos	19
Caracterització vi final.....	24
Creixement filamentós	25
a. Formació de pseudo-hifes	25
b. Creixement invasiu	28
CONCLUSIONS	30
REFERÈNCIES.....	31
AUTOAVALUACIÓ	36
ANNEXOS	37

DADES DEL CENTRE

L'estudi realitzat s'ha dut a terme als laboratoris de la Universitat Rovira i Virgili del Campus Sescelades, al grup d'investigació de Biotecnologia Enològica, a càrrec de la Dra. M^a Jesús Torija Martínez.

El grup consta de diferents vies d'investigació, bàsicament relacionades amb els microorganismes involucrats en la producció d'un vi, els llevats i els bacteris làctics. Concretament, jo m'he incorporat a la línia d'investigació de llevats, on es treballa en el desenvolupament de tècniques per la identificació i quantificació d'aquests microorganismes al llarg de la fermentació, estudi de les interaccions entre llevats *Saccharomyces* i *no-Saccharomyces* estudi de diferents estratègies microbiològiques per la reducció de l'etanol en vins, la producció de compostos bioactius per part dels llevats, principalment enfocat en la síntesi de melatonina, entre d'altres.

A més, com el grup està integrat a la Facultat d'Enologia, té a la seva disposició les instal·lacions del celler Mas dels Frares i on es fan fermentacions experimentals per tal d'augmentar el coneixement i fer-ne diversos estudis.

RESUM

Saccharomyces cerevisiae és un fong unicel·lular molt utilitzat en la recerca biotecnològica. En aquest estudi es caracteritza fenotípicament dues soques millorades de *S. cerevisiae* (B i C) que provenen totes dues de la mateixa soca parental (A). Aquestes soques, produeixen una elevada quantitat d'alcohols superiors aromàtics; concretament de 2-feniletanol (2-PheOH) i de triptòfol (TrpOH) i tirosol (TyrOH), respectivament. S'han fet diferents estudis de fermentació per valorar la seua cinètica de creixement en dos mosts diferents (un amb concentracions estàndard i l'altre amb condicions elevades dels precursors dels alcohols aromàtics (5x)). També s'ha fet un seguiment del creixement filamentós, per veure si una major síntesi d'alcohols aromàtics fa que hi hagi un canvi de comportament, donat que són classificats com a molècules quòrum sensing. A més, també s'ha fet la determinació de la melatonina, un compost que deriva del Triptòfan i que recentment, s'ha relacionat en llevats.

S'ha obtingut una major producció de 2-PheOH en totes dues soques, i de TrpOH en B i de TyrOH en C, estant la síntesi d'aquests alcohols especialment augmentada en el most amb 5x de precursors. La presència de 2-PheOH, aporta aromes de rosa al vi, millorant les característiques organolèptiques. No s'ha detectat presència de melatonina i en quant al creixement filamentós s'ha vist que totes les soques formen pseudo-hifes en medis amb baix nitrogen i envaeixen.

Així doncs, es pot concloure que les soques millorades poden tenir aplicacions enològiques interessants degut a la possible millora del seu perfil organolèptic, especialment important en vins blancs i rosats.

INTRODUCCIÓ

Saccharomyces cerevisiae

a. Característiques

Saccharomyces cerevisiae és un fong eucariota unicel·lular utilitzat com a organisme model degut a les seues característiques intrínseques; així com la seua facilitat de creixement i manipulació, amb un genoma relativament petit i que ja es troba totalment seqüenciat. Es reproduïx asexualment per gemmació i és capaç de filamentar per tal de recuperar nutrients (Wendland i Philippsen, 2001; Verstrepen i Klis, 2006; Cullen i Sprague, 2012).

És el principal responsable de fermentació, convertint els sucres a etanol i diòxid de carboni. Així doncs, té una gran importància en la indústria alimentària així com en la fabricació del pa, la cervesa i el vi.

b. Cinètica de creixement

Sota condicions òptimes, els llevats creixen seguint una corba sigmoidea característica. Consta de diferents fases, així com la fase lag, l'exponencial i l'estacionària (Figura 1). En la fase lag no hi ha un creixement, és quan els llevats s'adapten a les condicions del medi. Un cop superada aquesta fase, entren en creixement exponencial on el temps per a doblar la població és de 90 minuts (temps generacional), aproximadament. Finalment,

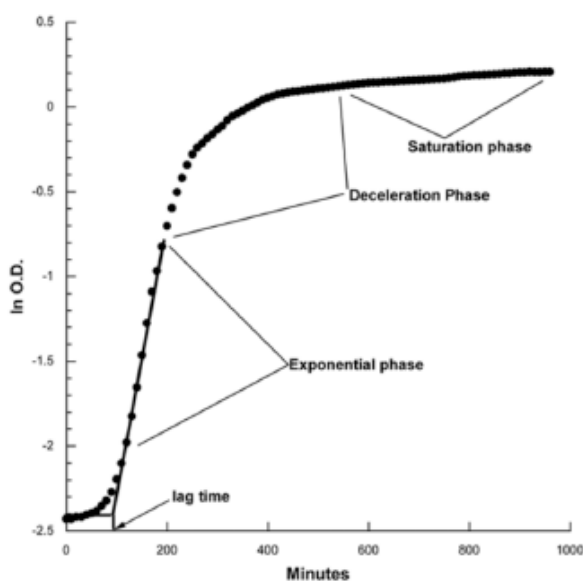


Figura 1. Corba de creixement en llevats (Hall et al., 2014).

quan els recursos s'estan acabant, els llevats entren en fase estacionària i finalment, moren per la manca de recursos.

c. Millora de llevats

Per tal de fer millora de llevats, es poden utilitzar diverses tècniques, les quals es classifiquen en dos grans grups: tècniques OMG, quan el que s'obté es considera un organisme modificat transgènicament, i tècniques no-OMG.

Dintre del primer grup, es troben les tècniques d'enginyeria genètica, on es produeix una alteració del material genètic per inserció, modificació o deleció de gens de manera molt dirigida. Una de les tècniques que s'està començant a utilitzar per modificar llevats vínics és la tècnica del CrisprCas9, una tècnica molt innovadora i que resulta molt ràpida, específica (Czarnek i Bereta, 2016) i assequible per molts laboratoris. Tot i així, els aliments, i particularment el vi, no pot ser produït a partir d'OMG. La comercialització i consum d'aquests OMG depèn del país i en el cas d'Europa, està estrictament prohibit la comercialització de llevats modificats genèticament, per l'elaboració de vins.

Per tant, per la millora de llevats vínics, s'ha d'utilitzar tècniques no-OMG, en què els procediments es basen en tècniques de millora tradicionals. Exemples de tècniques no-OMG podrien ser la hibridació o la recombinació sexual, la mutagènesi o l'evolució, entre d'altres.

En concret, l'evolució es basa en el canvi de condicions al medi, de manera que es generen unes situacions d'estrès en el llevat, en aquest cas. Així doncs, s'indueix a l'aparició d'un conjunt de mutacions que l'han fet resistents a les condicions específiques. Es consideren soques evolucionades passades les 200-300 generacions, en què tenen unes característiques diferents i unes noves adaptacions (Chen i Nielsen, 2016).

En canvi, en aquest estudi s'han utilitzat les soques que han sofert mutació espontània a partir del cultiu en medis lleugerament tòxics, però no són soques evolucionades estrictament. Per aquest motiu, es parla de soques mutades espontàniament (Chen i Nielsen, 2016).

Un cop induïda la mutació, es seleccionen aquells individus mutants que, de manera aleatòria, han canviat un o més gens del seu genoma per aconseguir una nova combinació genòmica més eficaç per la característica buscada. En aquest treball, es van utilitzar

soques amb mutació espontània que produïen major quantitat d'alcohols superiors aromàtics (2-PheOH, TyrOH i TrpOH).

Metabolisme del nitrogen

Els llevats utilitzen una gran varietat de fonts de nitrogen, entre elles, els aminoàcids. Aquests han de ser internalitzats a partir de les permeases de la membrana. Un cop dins la cèl·lula, segueixen diferents rutes biosintètiques: desaminació per tal de generar amoni o transaminació per formar glutamat (Godard et al., 2007) o glutamina. A més, hi ha diversos estudis que han afirmat que l'addició d'aminoàcids externs incrementa la presència de permeases a la membrana (Ljungdahl, 2009).

S'ha vist però, que no tots els aminoàcids són bones fonts de nitrogen pel creixement dels llevats. Per exemple, la glutamina i l'asparagina són classificades com bones fonts i per contra, l'arginina, alanina, aspartat i glutamat no ho són (Henschke i Jiranek, 1993). A més, els llevats també tenen la capacitat de reprimir la captació d'aquestes fonts de nitrogen, quan al medi hi ha una bona font de nitrogen, mitjançant el mecanisme anomenat sistema de repressió catabòlica per nitrogen (NCR) (Henschke i Jiranek, 1993; Magasanik i Kaiser, 2002; Minehart i Magasanik, 1992; Ter Schure et al., 2000). La fermentació alcohòlica és un gran exemple de NCR.

En aquest treball, s'estudia la síntesi d'alcohols aromàtics que provenen principalment dels aminoàcids aromàtics (Triptòfan (Trp), Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe)) i la via implicada és la *via d'Ehrlich*.

a. Via Ehrlich

Els aminoàcids representen una de les fonts principals de nitrogen assimilable, juntament amb l'amoni. La via d'Ehrlich és utilitzada pels llevats per adquirir el nitrogen dels aminoàcids quan les fonts preferides no estan disponibles (situacions baixes d'amoni) (Ehrlich, 1907).

Tenen lloc diverses reaccions (Figura 2), per tal de degradar els aminoàcids i convertir-los en alcohols superiors. Primer, té lloc una reacció de transaminació per l'acció dels gens *ARO8* i *ARO9*, el grup amino resultant s'utilitza per produir glutamat i l' α -ceto àcid continua la transformació. La segona reacció és una descarboxilació amb l'acció dels gens *ARO10*, *PDC6*, *PDC5* i *PDC1*. Finalment, l'aldehid resultant segueix dos vies depenent de l'enzim implicat. Si actua l'alcohol deshidrogenasa es forma els alcohols superiors i si actua l'aldehid deshidrogenasa acaba formant un àcid.

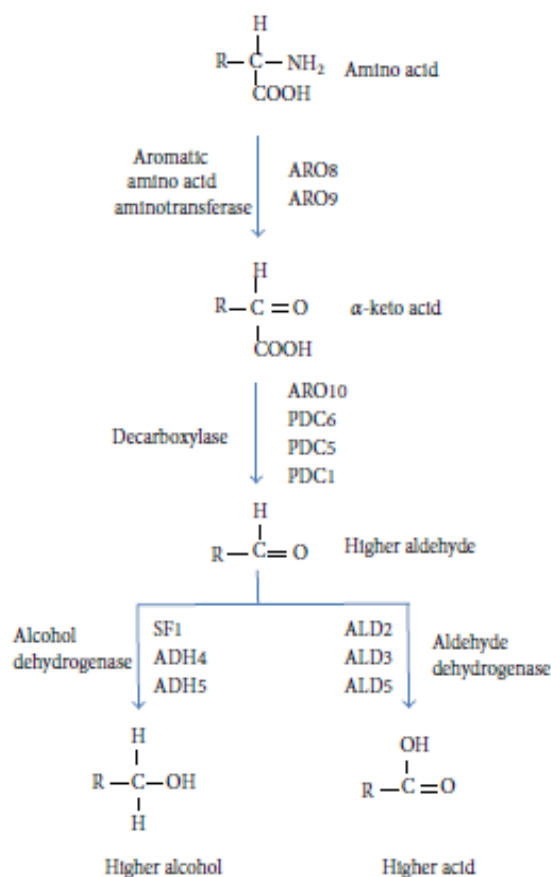


Figura 2. Via d'Ehrlich. (Mas et al., 2014)

S'ha vist en Avbelj et al., (2015) que una producció elevada dels alcohols superiors derivats d'aminoàcids aromàtics (2-PheOH, TyrOH i TrpOH) està correlacionada en una sobreexpressió dels gens *ARO8*, *ARO9* i *ARO10*. Concretament, s'ha vist que el TrpOH té un comportament d'estimulació automàtica, de manera que es retroalimenta positivament i en conseqüència, s'activa l'expressió d'*ARO9* i *ARO10* (Chen i Fink, 2006).

b. Síntesi d'alcohols superiors

Els alcohols superiors derivats dels aminoàcids aromàtics, tenen un impacte positiu en les característiques organolèptiques del vi final (Taula 1). S'ha vist que, augmentant la concentració d'aminoàcids aromàtics (Tyr, Trp i Phe) al most, també augmenta la producció dels alcohols derivats: TyrOH, TrpOH i 2-PheOH, respectivament (Hernández-Orte et al., 2002; Bordiga et al., 2016). Aquests alcohols són altament utilitzats en menjars i begudes, i el 2-PheOH especialment, ja que s'usa en la indústria de la cosmètica degut al seu aroma de rosa (Fabre et al. 1998).

La síntesi de 2-PheOH aporta aromes de rosa, de fruita fresca i de mel (Swiegers et al., 2005); és per això, que resulta un alcohol d'interès per a la indústria enològica, en canvi, el TyrOH i TrpOH s'han descrit com a molècules antioxidants i com a inductors de la son, respectivament (Cornford et al., 1981; Giovannini et al., 1999) i també milloren positivament les característiques del vi final.

Taula 1. Característiques dels diferents alcohols aromàtics. Adaptació de Waterhouse et al. (2016)

¹. Monagas et al., (2007)

Alcohol superior aromàtic	Aminoàcid precursor	Descripció d'aroma	Llindar d'aroma (mg/L)	Llindar de producció	Altres propietats
2-PheOH	Fenilalanina	Floral, rosa	14	10-180	
TyrOH	Tirosina	Cera d'abelles		1-48	Amarg
TrpOH	Triptòfan			10 ¹	Amarg

Aquests alcohols aromàtics, a més de contribuir positivament a les característiques organolèptiques també s'han descrit com a molècules de *quòrum sensing*.

- **Quòrum sensing**

En un ecosistema habiten una gran quantitat de microorganismes i per tant, és necessària una coordinació entre aquests. L'activitat de quòrum sensing està relacionada en la secreció de molècules que seran reconegudes per altres microorganismes i per tant, afectarà el seu comportament.

S'ha vist també que en el cas dels llevats, controlen la densitat poblacional i els canvis morfològics, entre d'altres. (Wendland i Philippsen, 2001; Verstrepen i Klis, 2006; Cullen i Sprague, 2012; González, 2018b). Un exemple de molècules quòrum-sensing són els alcohols superiors derivats dels aminoàcids aromàtics. Aquests, s'acumulen quan els nutrients són limitants i semblen tenir rols de senyalització que afecten al creixement del llevat. Per tant, *S. cerevisiae* té un canvi de comportament responnent als seus subproductes metabòlics, els alcohols aromàtics (Dickinson et al., 2003).

S'ha vist que un increment d'aquests es relaciona amb un augment de la capacitat de la formació de pseudo-hifes en *S. cerevisiae* (Chen i Fink, 2006; Dickinson et al., 2003). Concretament, la producció de 2-PheOH promou la invasió en agar (Pu et al., 2014).

- Creixement filamentós

El creixement filamentós és un comportament típic de fongs que respon a estímuls extracel·lulars, principalment, els nutrients. El creixement filamentós agrupa dos comportaments que pot tenir el propi llevat: la formació de pseudo-hifes (Figura 3) i el creixement invasiu. En la formació de pseudo-hifes, s'inclouen els canvis morfològics que impliquen la reorganització global dels processos cel·lulars per produir un nou tipus de cèl·lula. (Figura 4).

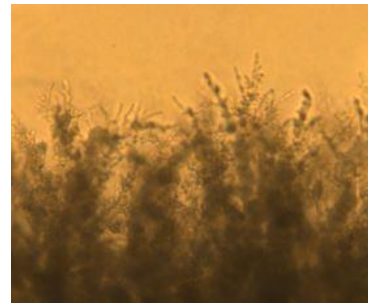


Figura 3. Formació de pseudo-hifes en *S. cerevisiae*

Les cèl·lules alteren el seu patró de gemmació, estenent la fase G2, sent més allargades i quedant unides entre si a través de la formació de pseudo-hifes (figura 3).

En canvi, el creixement invasiu és la capacitat que té el llevat en envair, penetrar, als substrats sòlids, com ara l'agar.

Com ja s'ha comentat anteriorment, hi ha diversos estudis que han relacionat una presència d'alcohols superiors derivats dels aminoàcids aromàtics amb l'increment d'aquest creixement filamentós, en situacions limitants de nitrogen. (Chen i Fink, 2006; Dickinson et al., 2003).

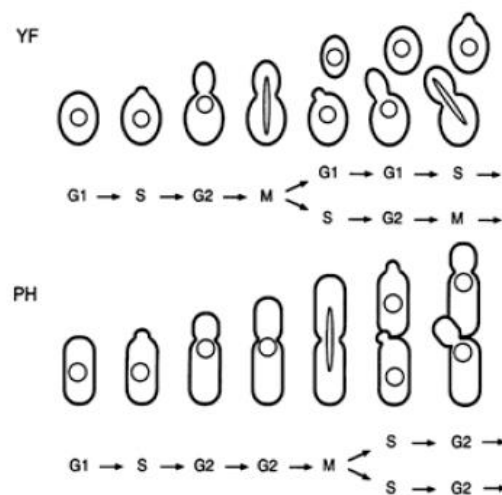


Figura 4. Model que compara cicles cel·lulars en un creixement normal de gemmació (YF) i en un creixement amb formació de pseudo-hifes (PH). G1, S, G2 i M corresponen a diferents fases del cicle cel·lular. (Kron et al., 1994)

c. Síntesi de compostos indòlics

Durant la fermentació alcohòlica, a partir dels aminoàcids aromàtics, a més de la formació dels alcohols aromàtics corresponents, també hi ha síntesi d'una sèrie de compostos indòlics com ara la serotonina i la melatonina. Aquests, deriven del triptòfan i són molècules bioactives.

Concretament, la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) és una amina sintetitzada a partir del triptòfan (Reiter, 1991) que s'ha vist que té certa activitat antioxidant i està relacionada en el ritme circadià i altres activitats beneficioses per la memòria (Larson et al., 2006) i com a molècula reguladora del creixement. Recentment però, s'ha associat com a molècula protectora de l'estrès oxidatiu i la radiació UV durant la fermentació i per tant, implicada també en *S. cerevisiae* (Vázquez et al., 2017; Vázquez et al., 2018 Bisquert et al., 2018). De fet, tot i que s'havia detectat en vins, no ha estat fins els últims anys que s'ha associat directament amb la síntesi del propi llevat durant la fermentació alcohòlica (Rodríguez-Naranjo et al., 2011; Rodríguez-Naranjo et al., 2012; Vigentini et al., 2015).

Durant el procés de fermentació, *S. cerevisiae* produeix petites quantitats de melatonina i els punts on destaca més la seua producció és entre el primer i el segon dia de fermentació (Rodríguez-Naranjo et al. 2012; Vigentini et al, 2015). A més, la presència del precursor (triptòfan) és també molt important per incrementar la síntesi de melatonina (Sprenger et al., 1999).

La melatonina es considera una molècula ubiqua ja que està descrita en diversos organismes, incloent els bacteris, plantes, insectes i fongs, entre d'altres (Harderland i Poeggeler, 2003).

Objectiu

L'objectiu d'aquest estudi és la caracterització fenotípica de dos soques de *Saccharomyces cerevisiae* del *Australian Wine Research Institute* (AWRI); AWRI_B i AWRI_C. Aquestes soques han estat seleccionades perquè produeixen una major quantitat de 2-PheOH respecte la soca parental (A), i de TrpOH i TyrOH, respectivament (Cordente et al., 2018).

Les dues soques són mutants espontanis de la soca parental, A, que van créixer en un medi amb presència d'anàlegs tòxics de la fenilalanina (o-fluoro-fenilalanina, OFP i p-fluoro-fenilalanina, PFP). Aquests mutants espontanis es van comparar amb els mutants obtinguts en el mateix medi però després d'haver sofert un tractament de mutagènesi amb EMS, i es va comparar que els mutants espontanis proporcionaven una major producció dels compostos d'interès.

Per tal d'aconseguir l'objectiu, s'ha fet un estudi del comportament d'aquestes soques en condicions fermentatives en un most sintètic (Beltran et al., 2004), amb dos concentracions dels precursors d'aquests alcohols, els aminoàcids aromàtics (1x, la concentració estàndard i 5x, amb una concentració 5 vegades superior), i es va fer un seguiment de la fermentació, així com un estudi de la producció dels alcohols superiors derivats dels aminoàcids aromàtics, així com altres compostos, com la melatonina. A més, també s'ha fet un estudi del seguiment del creixement filamentós, per estudiar si té implicacions en el canvi morfològic del llevat, tant a nivell d'invasió de l'agar com de formació de pseudo-hifes.

Per últim, s'ha fet una caracterització del vi final obtingut en les dos fermentacions per tal de comparar si hi ha diferències significatives. Es quantificarà l'etanol, el glicerol, àcid màlic i àcid acètic, entre d'altres; es vol veure si hi ha diferències entre els diferents tipus de most i soques.

MATERIALS I MÈTODES

Selecció de soques

En aquest treball s'han utilitzat tres soques de *S. cerevisiae*: A, B i C, proporcionades pel *Australian Wine Research institute* (AWRI). Les dues últimes són mutants espontanis de la soca A.

Per seleccionar aquests mutants (Cordente et al., 2018), la soca parental A es va cultivar en YPD [2% (w/v) peptona, 1% (w/v) extracte de llevat, 2% (w/v) glucosa] durant 3 hores. A continuació, $2 \cdot 10^8$ cèl·lules van ser cultivades en plaques amb YPD [2% (w/v) peptona, 1% (w/v) extracte de llevat, 2% (w/v) glucosa, 2% (w/v) agar] suplementades amb anàlegs tòxics de la fenilalanina; 2 % d'OFP (o-fluoro-fenilalanina) (w/v) i 1% d'PFP (p-fluoro-fenilalanina) (w/v) i incubades a 30°C. Aquestes concentracions dels anàlegs tòxics de fenilalanina, indueixen a l'aparició de mutants espontanis. La soca parental A és capaç de créixer a una concentració de 0.05 % (w/v) d'OFP i 0.02% (w/v) de PFP (Cordente et al., 2018).

Els mutants van aparèixer 3-4 dies després i llavors de realitzar diversos tests, es va obtenir B i C que produïen major quantitat de 2-PheOH, un alcohol aromàtic molt preuat en la indústria enològica. A més, també es va veure que eren capaces de produir algun altre alcohol aromàtic; en el cas de la soca B, el TrpOH i en el de C, el TyrOH.

Tipificació de llevats

Inicialment, es va fer una tipificació de les soques a estudiar i per observar si, en la mutació, ha hagut algun canvi a nivell de genoma.

Per a realitzar la tipificació de les tres soques utilitzades, es van inocular 10mL d'YPD durant tota la nit. Després es van centrifugar a 7800 rpm durant 5 minuts a temperatura ambient. Les cèl·lules es van rentar amb aigua destil·lada i es va extreure el DNA segons el protocol de Querol et al. (1992) (Annex 1). Després de l'extracció, es va quantificar la quantitat de DNA mitjançant el *nanoDrop* (Termofisher scientific, Bermen, Alemanya). Degut a l'elevada concentració obtinguda de l'extracció de DNA, es va 1:10 i es va dur a terme una PCR de la regió dels elements delta segons està descrit en Esteve et al. (1999) (Annex 2).

Després de la PCR, es va fer un gel d'agarosa [1.5% (w/v)] per comprovar els perfils obtinguts.

Preparació de l'inòcul

Les tres soques de *S. cerevisiae* (A, B i C) es van inocular amb 10mL YPD a 28 °C amb agitació. Després els cultius es van centrifugar a 7800 rpm durant 5 minuts. El pellet resultant es va inocular en 200mL de medi YNB a 140 mg N/L [2% (w/v) glucosa, 1.7% YNB w/o aminoàcids i amoni] durant 48h.

Condicions de fermentació

Les fermentacions s'han dut a terme en most sintètic, utilitzant la recepta descrita pel Beltran et al. (2004) amb algunes modificacions. La concentració de nitrogen assimilable (YAN) ha estat de 300 mg/L. Per estudiar la producció d'alcohols aromàtics (TyrOH, TrpOH i PheOH), s'han utilitzat dos concentracions d'aminoàcids aromàtics: la concentració estàndard (1x) i 5 vegades la concentració estàndard (5x). L'augment dels aminoàcids aromàtics es va compensar amb de la resta dels aminoàcids de manera que, la concentració final de nitrogen va acabar sent la mateixa.

Les fermentacions es van inocular a $2 \cdot 10^6$ cèl/mL a botelles de litre i es van repartir a tubs (*falcons*) de 50 mL. Les fermentacions es van fer per triplicat i es van utilitzar 20 tubs de 50 mL per cada rèplica, a 20°C sense agitació.

Es van analitzar diferents punts al llarg de la fermentació alcohòlica (0, 14, 24, 36, 48, 72, 96, 144 i 216h). En cada presa de mostra s'agafaven 3 tubs, en els quals s'analitzava la densitat, població total (OD a 600 nm) i població viable (ufc/mL), producció d'alcohols superiors i de melatonina (intra i extracel·lularment).

Cada mostra (10^9 cèl/mL) es va centrifugar a 7800 rpm durant 5 minuts a temperatura ambient. El sobrenedant es va guardar a -20°C per avaluar la concentració dels diferents compostos a nivell extracel·lulars. El *pellet*, es van rentar amb aigua destil·lada i es va guardar a -20°C fins el moment d'analitzar-lo.

Seguiment de la fermentació

El seguiment de la fermentació es fa per densitat, utilitzant el densímetre electrònic (30px, mettler Toledo, Espanya). La població de llevats es va mesurar cada dia, mitjançant la densitat òptica (OD_{A600nm}) i sembra de viables (UFC). La sembra de viables es va realitzar en plaques amb medi YPD [2% (w/v) peptona, 1% (w/v) extracte de llevat, 2% (w/v) glucosa, 2% (w/v) agar].

A més, al final de cada fermentació es va fer una tipificació de 20 colònies per tal de comprovar que no ha hagut contaminació d'altres microorganismes.

El vi final obtingut es va caracteritzar mitjançant la mesura de sucres residuals, àcid màlic, glicerol, àcid acètic i amoni determinat pel *Miura One Multianalyzer* usant els kits enzimàtics de *TDI and Biosystems S.A.* També es va quantificar l'etanol amb l'ebullòmetre (GAB sytem, Espanya).

Determinació de compostos

- Determinació d'alcohols superiors

Per a la quantificació d'alcohols superiors, la mostra extracel·lular es va diluir 1:10 en metanol (LC-MS, Sigma Aldrich, USA). Es deixa 10 minuts a 4°C i a continuació, es centrifuguen a 14000 rpm durant 5 minuts a 4°C. Es van fer dilucions seriades fins que es van trobar dins de la recta de quantificació. Després, les mostres van ser analitzades per cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses (HPLC-MS/MS).

Es va utilitzar un cromatògraf líquid de la sèrie 1200 i un espectròmetre de masses G6410 QqQ/MS (*Agilent technologies, Palo Alto, EUA*). La columna cromatogràfica era un Xbride Shield RP18 (150x2.1 mm i 3.5 µm de mida de les partícules). Les fases mòbils eren el 0.2% d'àcid acètic (99.7%, Sigma Aldrich, EUA) en aigua miliQ (dissolvent a) i ACN (dissolvent b). El flux era de 0.6 ml/min.

- Determinació de melatonina

Per a quantificar el contingut intracel·lular de melatonina, les mostres es van extreure mitjançant el protocol descrit per Gonzalez et al. (1997). Breument, s'addiciona 1mL de la solució bullint [HEPES 70mM, EtOH absolut], s'homogeneïtza amb la mostra i s'incuba a 80°C durant 3 minuts. A continuació, l'extracte es concentra per evaporació a 45°C al *SpeedVac* fins que el *pellet* quedi sec. Per últim s'afegeix 500µL de la solució 40% metanol i es centrifuga a 8000 rpm durant 10 minuts. El sobrenedant es transfereix als vials per a l'HPLC-MS/MS.

Per a la quantificació extracel·lular de melatonina, s'afegeix 500µL de metanol a 500µL de la mostra, es filtra (0.22µ) i es transfereix als vials.

Per a la quantificació de la melatonina es va utilitzar l'HPLC-MS/MS. Es va usar una columna *Agilent Zorbax Sb-Aq* de 150x2.1mm, 3.5 µM. La separació cromatogràfica va

tenir lloc per l'ús de dos solvents (a) aigua i (b) metanol, tots dos contenen 0.1% (v/v) d'àcid fòrmic. El perfil d'elució era 100% B (4 min) i 10% B (6 min). La temperatura d'anàlisi era 40°C. El flux era de 0.4 ml/ min. El volum d'injecció de 7 µL. La quantificació de melatonina es va realitzar usant la versió B0104 de l'anàlisi quantitatiu del programari *Agilent MassHunter WorkStation* mitjançant la comparació de les dades MS de transició 233/174 de la mostra i de la norma.

- **Determinació de la capacitat de filamentació**

En les tres soques es va estudiar la seua capacitat de filamentació, observant la formació de pseudo-hifes així com el creixement invasiu en diferents medis de cultiu. Com a control es van utilitzar les soques P24 i P5. P24 com a control negatiu (no forma pseudo-hifes en cap medi i en SLAD no envaeix) i P5 com a control positiu (forma pseudo-hifes en SLAD i envaeix en tots els medis) (González et al., 2018b).

Es va determinar el creixement filamentós en diferents medis de cultiu, amb variacions en la concentració de glucosa i nitrogen: SD – medi sintètic [1x YNB w/o aminoàcids o amoni, 2% (w/v) glucosa i 37mM (NH₄)₂SO₄ i 1% d'agar], SALG – medi sintètic baix en glucosa [1x YNB w/o aminoàcids o amoni, 0.5% (w/v) glucosa i 37mM (NH₄)₂SO₄ i 1% d'agar], i SLAD – medi sintètic baix en nitrogen [1x YNB w/o aminoàcids o amoni, 2% (w/v) glucosa i 50µM (NH₄)₂SO₄ i 1% d'agar] (González et al., 2018a).

Es fa un precultiu per a cada soca durant 24h en *minimal-medium* (MM) [(1x Yeast Nitrogen Base (YNB) (w/o) aminoàcids i amoni, 2% (w/v) glucosa i 10mM (NH₄)₂SO₄] a 28 °C en agitació (120 rpm) i després es sembra una gota de 10µL amb un OD_{A600nm}= 2 als diferents medis de cultiu d'estudi.

Les plaques sembrades s'incuben a 28°C durant 3, 5, 7 i 11 dies.

El creixement invasiu es va determinar mitjançant un rentat de placa (Roberts i Fink, 1994). Les colònies van ser fotografiades abans i després del rentat amb aigua destil·lada.

La formació de pseudo-hifes es va determinar mitjançant l'observació de la perifèria de les colònies abans del rentat (Gimeno, 1992). Les diferents morfologies es van fotografiar amb un microscopi (Ramn FT- IR) 10X.

RESULTATS i DISCUSSIÓ

Seguiment fermentació

Fermentació amb concentració estàndard d'aminoàcids aromàtics (1x)

En la fermentació 1X, la figura 5 mostra l'evolució de la densitat de les 3 soques de *S. cerevisiae*. La fermentació de la soca parental té un consum de sucre molt semblant a la soca C. En canvi, a la soca B li costa més començar la fermentació, de fet, no és fins les 48 hores on es comença a veure un increment en el consum del sucre. Després però, s'accelera la velocitat de fermentació de manera que totes tres soques acaben pràcticament al mateix punt.

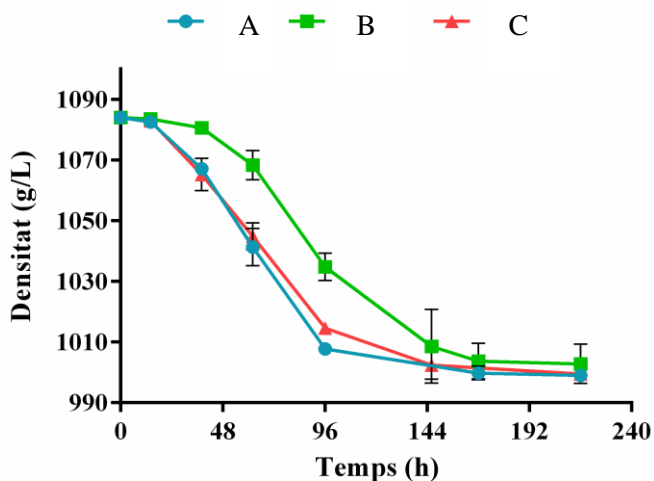


Figura 5. Evolució de la densitat durant la fermentació amb condicions estàndard d'aminoàcids aromàtics.

En canvi, a l'estudi on es van seleccionar aquestes soques (Cordente et al. 2018), es va observar un consum de sucres lleugerament més ràpid de la soca B respecte a la soca parental. Aquest canvi de comportament podria ser degut a les diferents condicions de fermentacions utilitzades, ja que en Cordente et al., (2018), es realitza una fermentació amb most de raïm Chardonnay (19 L) a 15°C, tenint fermentacions bastant més llargues (23 dies de fermentació), mentre que en aquest estudi, s'han realitzat amb most sintètic en petits volums (50 mL) i a temperatura elevada (22°C), resultant en fermentacions més ràpides (9 dies).

S'ha utilitzat most sintètic per tal de poder controlar les concentracions exactes i poder fixar la quantitat del precursor i d'aquesta manera, poder veure l'efecte que té en les fermentacions.

En quant a l'evolució de la població total (figura 6), B tarda unes hores més a entrar en fase exponencial, però finalment totes tres acaben amb la mateixa població final (10 OD).

Per últim, en la sembra de viables s'ha observat que en les primeres 24h hi ha un creixement significatiu i no és fins les 192h que hi ha una petita davallada fins al punt final de la fermentació (216h). S'adjunta taula als l'annex 3.

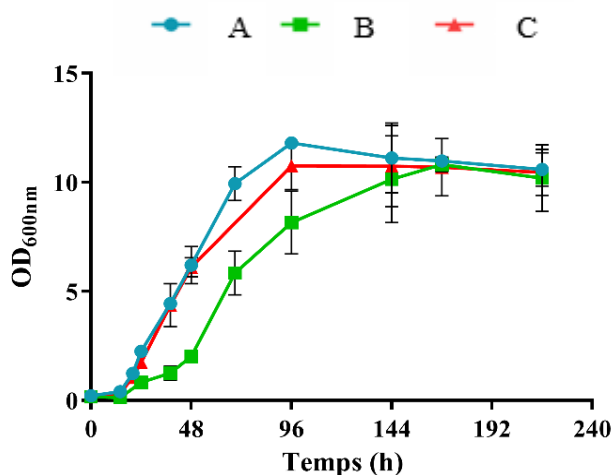


Figura 6. Evolució de la població total de llevats durant la fermentació amb condicions estàndards d'aminoàcids aromàtics.

Fermentació amb una elevada concentració d'aminoàcids aromàtics (5x)

A continuació, es mostren els resultats obtinguts en la fermentació on el most utilitzat té 5 vegades la concentració estàndard d'aminoàcids aromàtics. Com a l'anterior experiment, s'ha fet un seguiment de la densitat i de la població total i viables.

En quant al seguiment de la densitat (Figura 7), totes tres soques acaben a una densitat similar i és la B que es desvia una mica al temps 48h, degut al seu retard al creixement tal i com hem vist en la fermentació 1X, però totes tres soques acaben, aproximadament, al mateix valor de densitat (995g/L). Tot i així, la B continua fermentant una mica més lent que les altres dues soques, però sembla que la presència d'una quantitat major d'aminoàcids afavoreix el procés.

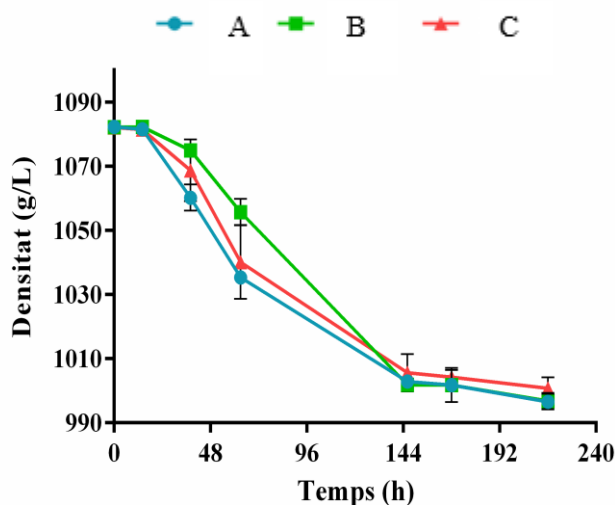


Figura 7. Evolució de la densitat durant la fermentació amb elevada concentració d'aminoàcids aromàtics.

En el seguiment de l'evolució de la població total, la B segueix la mateixa cinètica que en la fermentació 1X, té un creixement més lent, seguit de la C (Figura 8). La fermentació també té una durada de 216h, 9 dies, coincidint en la fermentació 1X.

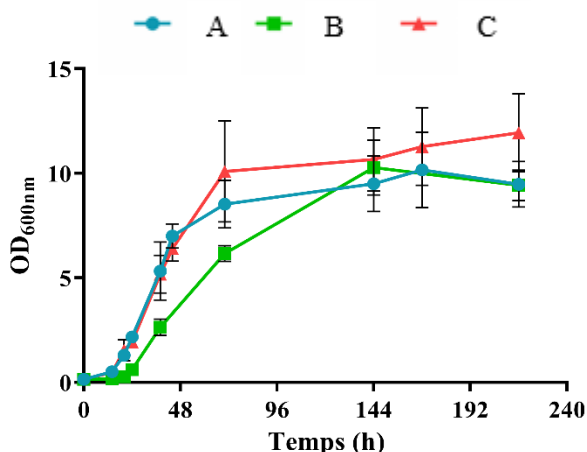


Figura 8. Evolució de la població total de llevats durant la fermentació amb elevada concentració d'aminoàcids aromàtics.

Si comparen les figures 5 i 6 amb les 7 i 8, sembla ser que el fet d'augmentar la concentració d'aminoàcids aromàtics al most,

afavoreix la fermentació i el creixement en el cas de la soca B, ja que no té un creixement tan retardat respecte la fermentació realitzada amb most en concentracions estàndards. A més, també s'observa que l'A té un creixement més retardat i en canvi, la C més ràpid respecte la cinètica de creixement en la fermentació 1x.

Finalment, en la sembra d'unitats formadores de colònies (*ufc*) no han hagut diferències significatives respecte als resultats obtinguts en la fermentació 1x. S'adjunta taula detallada a l'annex 3.

Tipificació de llevats

Abans de realitzar les fermentacions es va fer una tipificació de les soques utilitzades, per tal de comprovar si els mutants que han estat seleccionats per a una major producció d'alcohols aromàtics a partir d'aminoàcids aromàtics han tingut modificacions a nivell del seu perfil genòmic.

Per aquest motiu, es va fer la tipificació utilitzant l'amplificació dels elements delta. Aquesta, és una tècnica ràpida que permet diferenciar dos soques de llevats *S. cerevisiae*, però requereix l'extracció de DNA (Annex 1) i posterior amplificació per PCR. Les seqüències delta són elements de 330 parells de bases (pb) que flanquegen els retrotransposons Ty1 i Ty2 de *S. cerevisiae* (Cameron et al., 1979). El nombre d'elements delta i posició són específics de cada soca i a més, són estables durant 50 generacions. És per aquest motiu que podem diferenciar les soques.

Després de realitzar aquesta tècnica, es va comprovar que les tres soques mostraven el mateix perfil.

Al final de cada fermentació, tant en la fermentació amb condicions estàndards d'aminoàcids com en la fermentació amb elevades concentracions d'aminoàcids aromàtics, es va utilitzar la mateixa tècnica per tal de descartar possibles contaminacions d'altres soques de *S. cerevisiae* o soques no-*Saccharomyces*, que s'utilitzen de forma habitual al laboratori en altres estudis.

Es va comprovar que no hi va haver cap tipus de contaminació externa i que per tant, les fermentacions les van dur a terme les soques de l'estudi, ja que s'observa el mateix perfil de bandes en totes 3 soques i les seues respectives rèpliques (Figura 9).

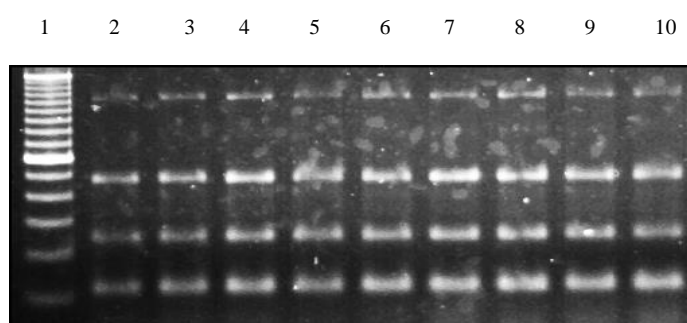


Figura 9. Perfils de bandes de DNA obtinguts després d'aplicar la tècnica dels elements delta al final de les fermentacions realitzades amb les tres soques. Carril 1: marcador de pes molecular (100pb *DNA Ladder*). Carril 2, 3 i 4: soca A. Carril 5, 6 i 7: soca B. Carril 8, 9 i 10: soca C.

Producció de compostos

- Producció d'alcohols superiors

Com s'ha comentat a la introducció, aquestes soques han estat seleccionades per sintetitzar una major concentració d'alcohols superiors derivats dels aminoàcids aromàtics (PheOH, TrpOH i TyrOH), i més concretament, la soca B sintetitzava una major concentració de PheOH i TrpOH i la soca C, més PheOH i TyrOH. A més, en estudis previs (Hernández-Orte et al., 2002; Bordiga et al., 2016;), s'ha descrit que s'aconseguia una major producció d'alcohols superiors si s'incrementava la concentració d'aminoàcids aromàtics al most. Per això, es va voler comprovar si augmentant la concentració d'aquests aminoàcids aromàtics, cinc vegades la concentració que es troba de forma habitual en un most, suposava un increment encara més gran d'aquests compostos aromàtics.

En aquest estudi, s'analitza la síntesi dels alcohols aromàtics (TyrOH, TrpOH i PheOH) durant els dos tipus de fermentacions de les 3 soques de *S. cerevisiae*.

Concretament, en la producció de (TyrOH) (Figura 10), s'ha vist com la soca que ha estat seleccionada per produir més concentració d'aquest compost és la que té una síntesi molt major en la fermentació en condicions estàndards dels precursors. Les altres dues soques produeixen nivells molt baixos.

A més, quan s'augmenta 5 vegades la concentració d'aminoàcids aromàtics al most, augmenta considerablement la producció de TyrOH en la soca C, encara que no és un augment proporcional a la major quantitat d'aminoàcids aromàtics, ja que s'obté quasi el doble, i no 5 vegades més.

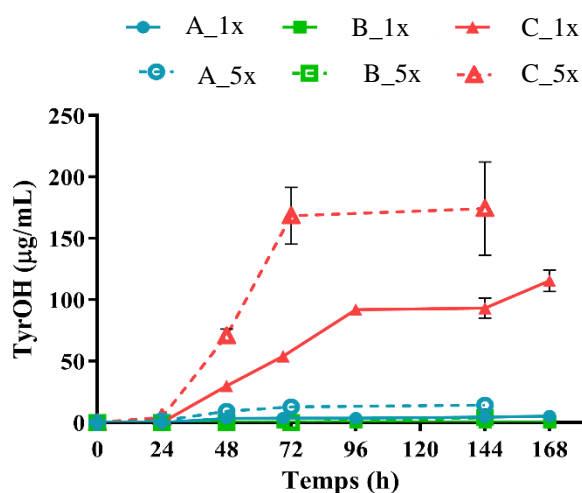


Figura 10. Evolució de la producció de TyrOH durant les fermentacions amb diferent concentració d'aminoàcids aromàtics (1x i 5x).

En canvi, en la producció del (TrpOH) (Figura 11) s'observa que la B destaca en totes dues fermentacions (1X i 5X). La B és la que ha estat seleccionada per produir una major concentració d'aquest compost i així és, però en aquest cas, la síntesi d'aquest alcohol aromàtic no s'ha vist molt augmentada respecte les altres soques. En els dos tipus de fermentacions tant la soca parental com la C, tenen una producció de TrpOH molt semblant. En González et al. (2018b) es van realitzar fermentacions amb les mateixes condicions d'aminoàcids aromàtics (1x i 5x) i en el cas de *S. cerevisiae* (QA23) la concentració de TrpOH és molt més elevada en una fermentació amb majors quantitats

d'aminoàcids aromàtics. De fet, en una fermentació 1x la concentració és de 300 μM i en una fermentació 5x és de 1000 μM .

En aquest estudi no hi ha una diferència tan notòria, això podria ser degut a l'efecte de la mutació.

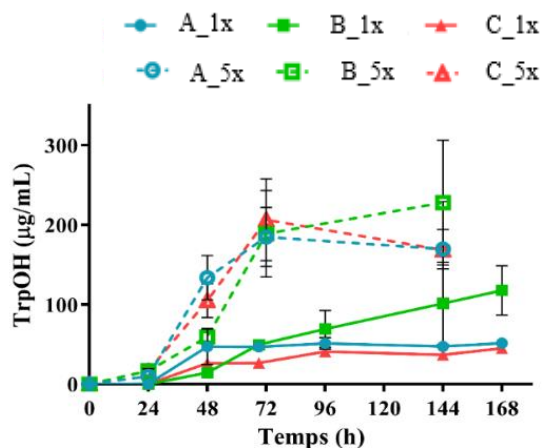


Figura 11. Evolució de la producció de TrpOH durant les fermentacions amb diferent concentració d'aminoàcids aromàtics (1x i 5x).

I per últim, la producció del 2-PheOH (Figura 12). S'ha fet la selecció de les soques mutants amb l'objectiu d'una major producció d'aquest alcohol aromàtic: el 2-PheOH. Aquest alcohol, com ja s'ha comentat anteriorment, aporta aromes de rosa.

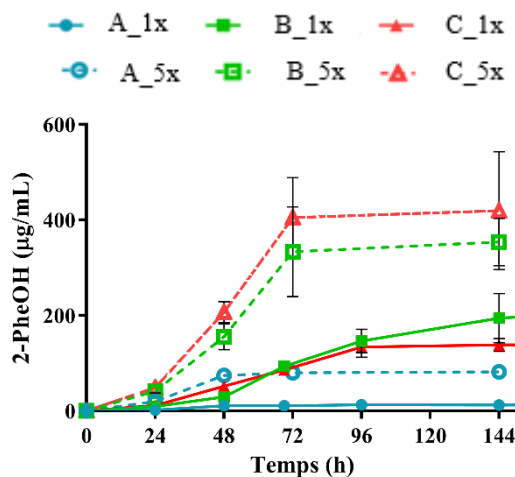


Figura 12. Evolució de la producció de 2-PheOH durant les fermentacions amb diferent concentració d'aminoàcids aromàtics.

En la Figura 12 és on es veu la diferència en la producció d'aquest compost, el 2-PheOH, entre les soques millorades i la parental, tant en la fermentació 1X com 5X. Les dos soques millorades, B i C, tenen una major producció. Aquesta diferència està encara més pronunciada en la fermentació on hi ha una major quantitat d'aminoàcids aromàtics. A

més, tal i com s'observa en la fermentació 5x destaca la soca C i en la 1x la B, tot i que tenen valors molt semblants.

En l'estudi de González et al. (2018), el TrpOH és l'alcohol aromàtic que més producció hi ha, seguit del 2-PheOH i TyrOH. Això s'atribueix al fet que el triptòfan està present en altes concentracions respecte els altres dos aminoàcids aromàtics. En canvi, en el present estudi, tot i que les concentracions dels aminoàcids aromàtics siguin les mateixes, l'alcohol aromàtic del que hi ha major producció és el 2-PheOH. Això té sentit ja que aquestes soques han estat seleccionades per produir major quantitat de 2-PheOH.

En l'article Cordente et al, (2018) en la soca parental hi ha una producció de 22,24 µg/L de PheOH en la soca parental i en canvi, una producció de 193,58 µg/L en la soca B. Tot i que els nostres resultats siguin molt majors, la proporció es manté en els resultats obtinguts en la fermentació realitzada en condicions de most estàndard.

Els aromes atribuïts als alcohols superiors aromàtics són molt preuats per la indústria enològica (Benito et al., 2015; Belda et al. 2017). Concretament, el 2-PheOH és descrit com a aroma floral, de rosa, i és atribuït al vi, la cervesa i la sidra (Hirst i Richter 2016). La presència del TyrOH, contribueix a aromes més relacionats en compostos fenòlics i està implicat en vins blancs i escumosos (Chamkha et al. 2003; Peña-Neira et al. 2000). En canvi, la presència de TrpOH, que serien vins produïts per la fermentació a partir de la B, estan relacionats amb l'astringència i el sabor amarg, així com el color groguenc al vi final (Cordente et al., 2018). És per això que a excepció del 2-PheOH, la presència d'altres alcohols superiors no són considerats agradables, especialment a altes concentracions (Cordente et al., 2018). Encara que no és adequat parlar de concentracions exactes per saber a partir de quan comença a resultar un aroma molest, ja que el vi té diferents aromes, no només els provinents dels alcohols aromàtics. S'hauria de fer un anàlisi sensorial final a partir del qual es valorés si aquesta major producció dels alcohols superiors aporten l'aroma desitjat. S'hauria d'analitzar si aquesta major producció de 2-PheOH és l'adequada i si té interferències amb l'aroma i amargor que aportarien les soques millorades, productores també de TyrOH i TrpOH.

- Producció de melatonina

Com ja s'ha explicat anteriorment, a partir del triptòfan, els llevats durant la fermentació poden sintetitzar altres compostos, com ara serotonina, melatonina i triptamina. (González et al., 2018b) En aquest treball, es va voler estudiar la melatonina, pel seu interès com a compost bioactiu.

No es va detectar presència significativa de melatonina en cap dels punts presos de la fermentació, però en canvi, sí que es va observar un pic que sortia al principi del cromatograma i que anava augmentant al llarg de la fermentació. Aquest pic es va identificar com l'etil ester de triptòfan (EET). L'EET és una molècula que inicialment, es va pensar que era un isòmer de la melatonina, ja que té el mateix pes molecular (233.12 g/mol) (Gardana et al., 2014), i a més, apareixen als mateixos fragments en HPLC-MS/MS, però és cert que apareixen en diferents temps de retenció (l'EET apareix als 5 min i la melatonina als 5.8 min, aproximadament). És per això que al cromatograma que s'obté per la quantificació de la melatonina també podem veure aquest compost (Fracassetti et al., 2019). Com es va veure que hi havia una evolució de la quantitat d'aquest compost al llarg de la fermentació, vam decidir intentar quantificar-ho, però com no teníem el patró, el que es mostrarà és una evolució de les àrees obtingudes al HPLC.

➔ Producció EET intracel·lular i extracel·lular

Com s'observa a les gràfiques següents (Figura 13 i Figura 14), hi ha diferències entre la producció extracel·lular i intracel·lular. Es pot veure com primer s'acumula intracel·lularment i a partir de les 40h, aproximadament, es comença a secretar al medi extracel·lular, aquestes diferències són més notòries en la fermentació 5x.

A més, s'observa que la B en la fermentació 1X, la síntesi d'EET és menor respecte les altres dos soques. En canvi, quan la concentració d'aminoàcids aromàtics i, per tant, de triptòfan és major, la síntesi intracel·lular és molt més important. De fet, en la fermentació 1X el pic major representa una àrea de 700 i en canvi, en la fermentació 5x, el pic arriba a tenir una àrea de 1200.

Una de les diferències també a destacar, és la producció extracel·lular d'EET en les dos fermentacions (1x i 5x). En la fermentació 5X, hi ha una major producció. De fet, s'ha vist en altres estudis que a l'augmentar la concentració de triptòfan, també augmenta la producció d'EET (Vigentini et al., 2015).

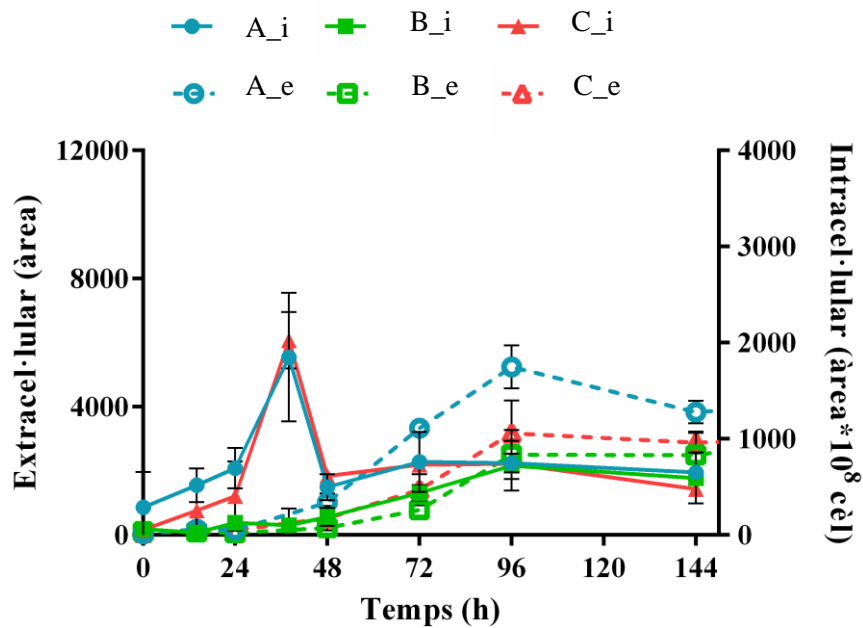


Figura 13. Evolució de la producció d'EET intra i extracel·lularment, fermentació amb most en condicions estàndards (1x)

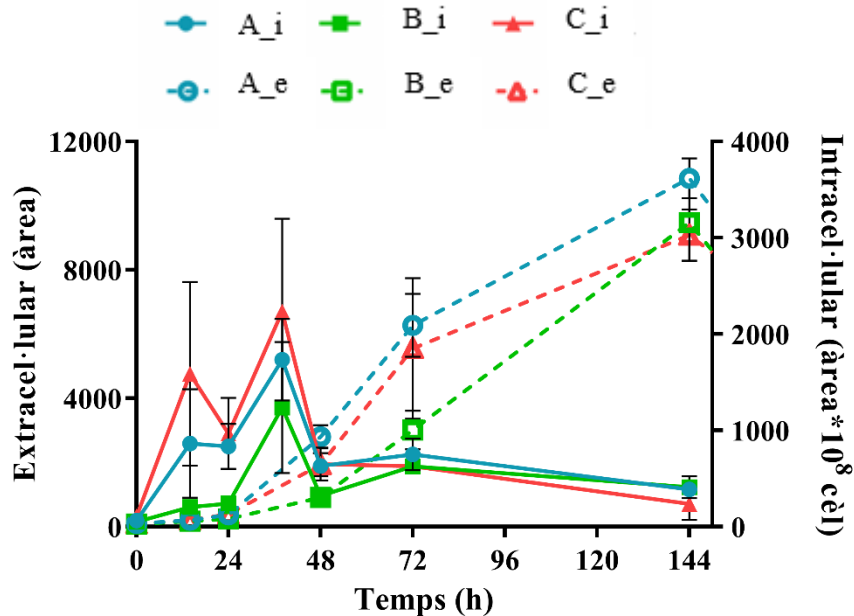


Figura 14. Evolució de la producció d'EET intra i extracel·lularment, fermentació amb most en majors concentracions d'aminoàcids aromàtics (5x).

Caracterització vi final

Al final de la fermentació, es va analitzar els paràmetres químics més habituals per veure si hi havia diferències pel fet de canviar la concentració d'aminoàcids aromàtics al medi inicial o de fermentar amb tres soques diferents, encara que molt semblants ja que tenien un origen comú. Tal i com es veu en la taula 2, no hi ha diferències importants entre la

fermentació 1X i 5X, a excepció de l'anàlisi de l'etanol, on sí que hi ha diferència. Aquest últim resultat, és força estrany ja que no sembla lògic veure aquestes diferències degudes al canvi de concentració d'aminoàcids aromàtics. De totes maneres, donat la poca mostra de la que es disposava (50 mL) no es va poder tornar a repetir aquest anàlisi.

Taula 2. Caracterització de vi final obtingut després de fermentar dos mosts sintètics amb diferent concentració d'aminoàcids aromàtics (1x i 5x) amb les tres soques (A, B i C).

	Glicerol (g/L)		Àcid acètic (g/L)		Glu-Fru (g/L)	
	1x	5x	1x	5x	1x	5x
A	5,92±0,28	6,29±0,37	1,60±0,21	1,57±0,28	8,58±1,70	7,16±1,36
B	6,24±0,16	6,99±0,33	1,53±0,08	1,66±0,43	11,11±3,72	6,03±4,06
C	5,48±0,27	5,58±0,13	1,24±0,16	1,36±0,05	9,87±1,46	9,95±1,73
	Àcid màlic (g/L)		Amoni (mg/L)		Etanol (%)	
	1x	5x	1x	5x	1x	5x
A	2,20±0,13	2,31±0,03	22,67±16,04	30±18,38	8,27±1,62	10,48±0,21
B	2,28±0,03	2,29±0,08	16,67±4,51	22±14,36	8,88±0,35	10,83±0,46
C	2,25±0,13	2,29±0,09	18,50±8,50	21±20,66	9,16±0,32	10,33±0,15

A més, tenint en compte les condicions utilitzades per a la fermentació i el fet d'agafar un tub per a fer el seguiment d'aquesta, fa que els resultats entre rèplica variïn i és per aquest motiu que l'error estàndard resulti tan gran, especialment el cas de l'amoni.

Comparant-ho amb l'article de Cordente et al., (2018); en què també es va fer caracterització de vi final, s'han obtingut alguns valors diferents, com el glicerol (ells obtenen 10.5 g/L de glicerol en l'A i 10.8 g/L en la B), però són resultats totalment lògics ja que les condicions de fermentació són molt diferents.

Creixement filamentós

a. Formació de pseudo-hifes

Donat que s'ha observat que existeix una relació entra la presència d'alcohols superiors derivats d'aminoàcids aromàtics i el creixement filamentós (Hornby et al., 2001; Kruppa, 2009; González et al., 2018b), s'ha volgut estudiar si aquestes soques que incrementaven la síntesi d'aquests alcohols, modificaven el seu creixement filamentós.

A continuació es mostren els resultats de l'evolució de la formació de pseudo-hifes en funció de la soca i els diferents medis de cultiu; sent el SAD un medi de cultiu ric en nutrients, SLAD baix en nitrogen i SALG baix en glucosa. S'han utilitzat la P5 i P24 com

a control (González et al., 2018b). La P5 només forma hifes en SLAD i la P24 en cap dels tres medis. Per tant, s'ha utilitzat la P5 com a control positiu i la P24 com a control negatiu (s'adjunta taula del seguiment de la formació de pseudo-hifes de les soques control a l'annex 4)

Tal i com s'observa en les següents imatges (Figura 15), el fet de que hi hagi una menor concentració de nitrogen, fa que augmenti la capacitat de les soques per formar pseudo-hifes. En medi SLAD (baix en nitrogen), s'observa l'evolució del comportament de les diferents soques i es veu que totes tres soques filamenten, encara que en el cas de la soca B, no s'observa filamentació fins el dia 11, mentre que les altres dos, ja es veu inici de filamentació el dia 5.

Aquest retard en la capacitat de la formació de pseudo-hifes en la soca B podria ser o bé perquè està associat a un retard al creixement, tal i com hem vist en el consum de sucres i població total o bé perquè la mutació que ha sofert també implica aquest canvi de comportament en la formació de pseudo-hifes. És cert que a les 24 h, s'observava una disminució de la colònia de la soca B respecte les altres soques, però als 3 dies, tal i com s'observa a la figura 15, totes les colònies tenien la mateixa mida.

A més, comparant amb González et al. (2018), els resultats són similars. Hi ha formació de pseudo-hifes en situacions baixes de nitrogen (medi SLAD) però és cert que un augment considerable en la producció d'alcohols superiors no modifica el comportament de la formació de pseudo-hifes; tan la soca parental com les dues millorades tenen aquesta capacitat. En Chen et al. (2006), la producció de TyrOH augmenta la capacitat de la formació de pseudo-hifes però, en aquest cas, en la soca C, gran productora de TyrOH, no es veu una diferència important en la formació de pseudo-hifes respecte a la soca parental.

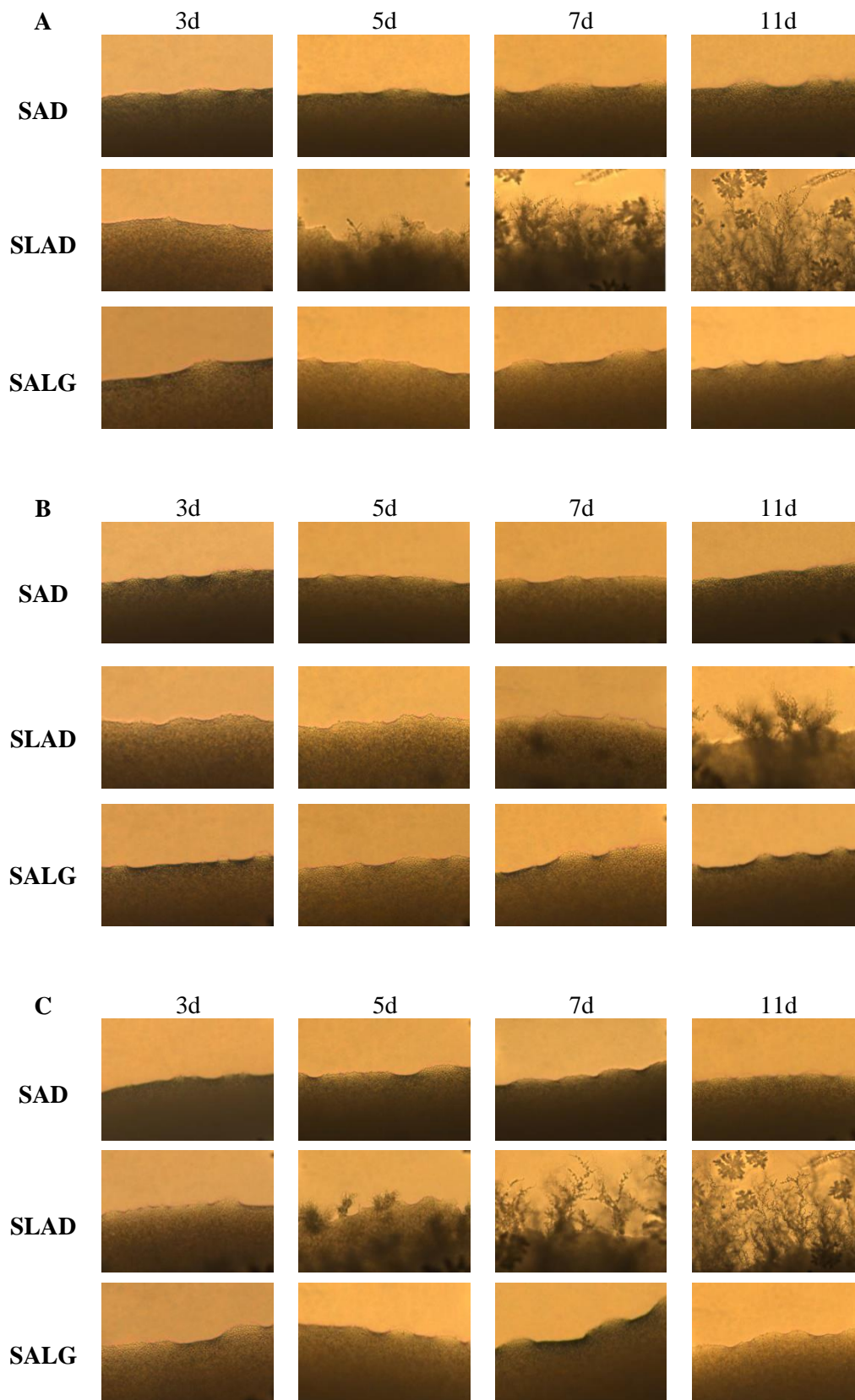


Figura 15. Seguiment de la formació de pseudo-hifes en diferents medis de cultius, sent SD el medi control, el SLAD el baix en nitrogen i el SALG el baix en glucosa. 3d, 5d, 7d i 11d, indica els dies als quals es va estudiar la formació de pseudo-hifes.

b. Creixement invasiu

Com s'ha comentat anteriorment, una presència d'alcohols superiors també comporta una major invasió de l'agar sota condicions baixes de nitrogen. En aquest estudi, també s'han utilitzat la P5 i P24 com a control, la P5 envaeix a tots 3 medis (SAD, SLAD i SALG) i la P24 no envaeix en medi baix en nitrogen. (S'adjunta taula del seguiment del creixement invasiu d'aquestes dues soques en l'Annex 5)

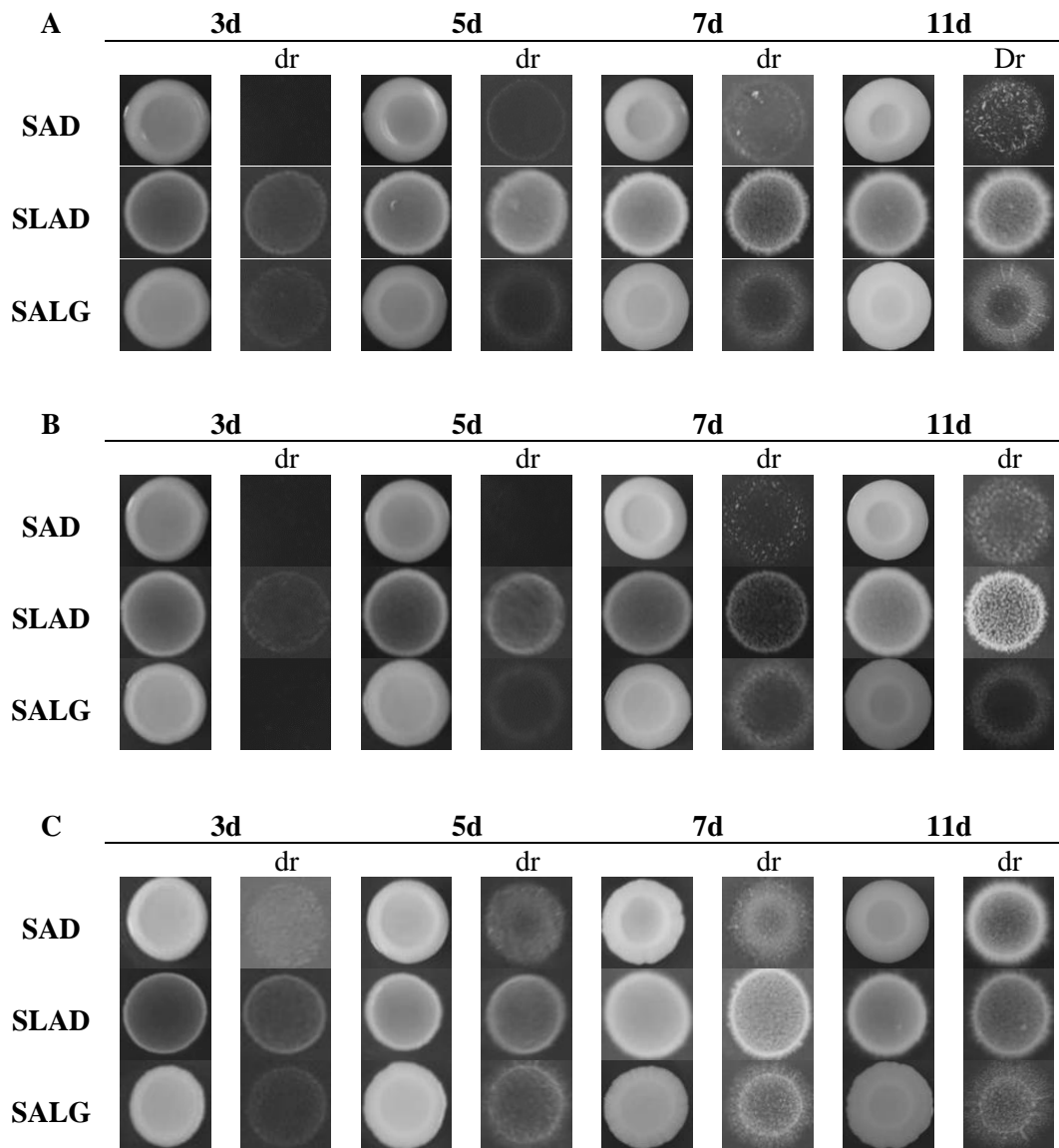


Figura 16. Seguiment del creixement invasiu en diferents medis de cultiu sent el SAD el control, el SLAD el baix en nitrogen i el SALG el baix en glucosa. 3d, 5d, 7d i 11d indica els dies als quals estudiar el creixement invasiu. El *dr* indica "després del rentat".

Com s'observa en les anteriors imatges, al medi control (SD), ric en nutrients, hi ha una invasió més pronunciada en C (dia 11), respecte les altres soques.

En canvi, en SLAD hi ha una invasió total en totes 3 soques (A, B i C), però també és en C on hi ha una major invasió des del principi (dia 3).

Per últim, en el medi baix de glucosa, SALG, tot i que també envaeixen les 3 soques, és també la C, la soca que té una invasió més notòria al 11è dia. De fet, al 3r dia ja s'observa una lleugera invasió.

Així doncs, la soca C és la que presenta un comportament invasiu més pronunciat respecte a les altres dos soques. A més, la B té una invasió més retardada: 7 dies en SAD, als 3 dies en SLAD la invasió és molt poca i 5 dies en SALG.

Els nostres perfils d'invasió en SLAD coincideixen amb els que es van observar a González et al. (2018b). En canvi, en Pu et al. (2014) observen una major invasió en SAD quan hi ha una major producció de 2-PheOH. En l'estudi realitzat també s'observa aquest fenomen en la soca C, que presenta una major concentració de 2-PheOH i és la soca on s'observa una major invasió. En canvi, la invasió en l'altra soca millorada, B, no és major que la que hi ha en la soca parental.

Aquest retard en la soca B alhora d'envair, tal i com s'ha comentat en la formació de pseudo-hifes, deu ser degut a les mutacions que han ocorregut i no a un retard en el propi creixement, ja que la mida de la colònia al dia 3 (primer dia del seguiment de la filamentació) era la mateixa que les altres soques de llevat.

CONCLUSIONS

En aquest estudi es pretenia caracteritzar fenotípicament dues soques de *Saccharomyces cerevisiae* (B i C), les quals s'han obtingut per mutacions espontànies de la soca parental (A) i que es van seleccionar per produir una major concentració de 2-PheOH, i TrpOH i TyrOH, respectivament.

S'ha fet un seguiment de dos fermentacions de most sintètic amb diferents concentracions d'aminoàcids aromàtics (1X i 5X), i s'ha comprovat que, entre les dues variants de most, no hi ha diferències notòries en quant a la densitat, població total i població viable. Però és cert que entre les dues soques s'ha observat que la B té un creixement lleugerament més lent.

També s'ha pogut comprovar que les soques millorades (B i C) tenen una major síntesi d'alcohols superiors, de TrpOH i TyrOH, respectivament i de 2-PheOH. I aquesta producció ha estat molt més elevada quan s'han canviat les condicions del most, amb major concentració d'aminoàcids aromàtics. La soca B tenia una major producció de TrpOH però la diferència entre les altres soques no era tan important com la síntesi de TyrOH que produeix la soca C. En quant a la producció de 2-PheOH, s'ha observat una gran diferència a nivell de producció entre les soques millorades i la parental.

D'altra banda, degut a que els alcohols superiors han estat classificats com a molècules *quòrum sensing*, també s'ha fet un estudi del creixement filamentós. S'ha obtingut que totes tres soques tenen capacitat d'invasió i de formació de pseudo-hifes en situacions en baix nitrogen (SLAD). És cert, però, que aquest creixement més retardat de la B també s'ha observat en el seguiment del creixement filamentós, un retard que podria ser degut a les mutacions que han hagut i, per tant, que el comportament filamentós estigui afectat.

Així doncs, per concloure, les soques seleccionades (B i C) són capaces de sintetitzar una major quantitat d'alcohols superiors aromàtics i, per tant, poden ser interessants en la indústria enològica perquè aporten un aroma molt preuat al vi final. L'aroma és una de les principals característiques, i així la soca C, que té una bona capacitat fermentativa i alta producció de 2-PheOH, podria ser una soca interessant per l'elaboració de vins blancs i rosats.

REFERÈNCIES

Avbelj, M., Zupan, J., Kranjc, L., and Raspor, P. (2015). Quorum-Sensing Kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: A Symphony of ARO Genes and Aromatic Alcohols. *J. Agric. Food Chem.* 63, 8544–8550.

Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., (2017). Microbial contribution to Wine aroma and its intended use for Wine quality improvement. *Molecules* 22, 1–29.

Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* 4, 625–632.

Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K (2015). Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 707–717.

Bisquert, R., Muñoz-Calvo, S., Guillamón, J.M. (2018). Protective role of intracellular melatonin against oxidative stress and uv radiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol.* 9, 318.

Bordiga, M., Lorenzo, C., Pardo, F., Salinas, MR., Travaglia, F., Arlorio, M., Coisson, JD., Garde-Cerdán, T (2016). Factors influencing the formation of histaminol, hydroxytyrosol, tyrosol, and tryptophol in wine: Temperature, alcoholic degree, and amino acids concentration. *Food Chem.* 3 (197), 45-79.

Cameron, JR., Loh, EY., Davis RW. (1979). Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell.* 16 (4), 739-51.

Chamkha M, Cathala B, Cheynier V, Douillard R (2003) Phenolic composition of champagnes from Chardonnay and Pinot Noir vintages. *J Agric Food Chem* 51(10):3179–3184.

Chen, H., and Fink, G. R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Gene Dev.* 20, 1150–1161.

Chen, Y., Nielsen, J., Caspeta, L., (2016). Thermotolerant yeasts selected by adaptive evolution express heat stress response at 30 °C. *Scientific reports.* 2300, 12-160.

Cordente, A., Solomon, M., Schulkin, L., Barker, A., Borneman, A., Curtin, C. (2018). Novel wine yeast with ARO4 and TRY1 mutations that overproduce ‘floral’ aroma compounds 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate.

Cornford EM, Crane PD, Braun LD, Bocash WD, Nyerges AM, Oldendorf WH (1981) Reduction in brain glucose utilization rate after tryptophol (3-indole ethanol) treatment. *J Neurochem* 36(5): 1758–1765

Cullen, P. J., and G. F. Sprague, Jr.. (2002) The roles of bud-site-selection proteins during haploid invasive growth in yeast. *Mol Biol Cell* 13: 2990-3004.

Czarnek, M., Bereta, J. (2016) The CRISPR-Cas9 system – from bacterial immunity to genome engineering. *Hig Med Dosw.* 70, 901-16.

Dickinson, J. R., Salgado, L. E. J., and Hewlins, M. J. E. (2003). The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 8028–8034.

Ehrlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* 40, 1027–1047.

Esteve, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5,85 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers *Int J Syst Bacteriol.* 49(1): 323-37

Fabre, C. E., Blanc, P. J., and Goma, G. (1998). Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Prog.* 14, 270–274.

Fracassetti, D. , Vigentini, I., Tirelli. A., Orioli, M., De Nisi, P., Iriti M (2019). Assessment of Tryptophan, Tryptophan Ehtylester, and Melatonin Derivates in Red Wine by SPE-HPLC-FL and SPE-HPLC-MS Methods. *Foods.* 8, 99.

Gardana, C., Iriti M, Stunkynté, M., De Noni, I., Simonetti, P. (2014) ‘Melatonin isomer’ in wine is not an isomer of melatonin but tryptophan-ethylester. *J Pineal Res.* 57 (4), 453-41.

Gimeno, C. J., P. O. Ljungdahl, C. A. Styles and G. R. Fink, (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077-1090.

Giovannini, C., Straface, E., Modesti, D., Coni, E., Cantafora, A., De Vincenzi, M.. (1999). Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *J. Nutr.* 129, 1269–1277.

Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J. (2007). Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3065–3086.

González B., Mas, A., Beltran G., Cullen, P., Torija MJ. (2018a) Role of mitochondrial retrograde pathway in regulating ethanol-inducible filamentous growth in yeast. *Frontiers in Physiology*. 8(148).

Gonzalez, B., François, J., Renaud, M. (1997). A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast*. 13(14), 1347–1356.

González, B., Vázquez, J., Cullen, P., Mas, A., Beltran, G., Torija, MJ.(2018b) Aromatic amino acid-derived compounds induce morphological changes and modulate the cell growth of wine yeast species. *Frontiers in microbiology*. 9, 670.

Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., and Barlow, M. (2014). Growth Rates Made Easy. *Mol. Biol. Evol.* 31,232–238.

Hardeland, R., Poeggeler, B. (2003). Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res.* 34(4), 233–241.

Henschke, P. A., and Jiranek, V. (1993). Yeast: Metabolism of nitrogen compounds. *Wine Microbiology and Biotechnology*. 77–164.

Hernández-Orte P, Cacho JF, Ferreira V (2002) Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *J Agric Food Chem* 50:2891-2899.

Hirst MB, Richter CL (2016) Review of aroma formation through metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations. *Am J Enol Vitic* 67(4):361–370.

Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R. (2001). Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2982–2992.

Kron, S. J., C. A. Styles and G. R. Fink, 1994 Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 5: 1003-1022.

Kruppa, M. (2009). Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses*. 52, 1–10.

Larson J, Jessen Re, Uz T. Impaired hippocampal long term potentiation in melatonin MT2 receptor-deficient mice. *Neurosci Lett* 2006; 393:23-26.

Ljungdahl, P. O. (2009). Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 242–7.

Magasanik, B., and Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1–18.

Minehart, P. L., and Magasanik, B. (1992). Sequence of the *GLN1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the upstream region in regulation of glutamine synthetase expression. *J. Bacteriol.* 174, 1828–36.

Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B (2007) Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and nonanthocyanin phenolic content and colour characteristics of wines. *Food Chem* 104(2):814–823.

Peña-Neira A, Hernández T, García-Vallejo C, Estrella I, Suarez JA (2000) A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *Eur Food Res Technol* 210:445–448.

Pu, L., Jingfan, F., Kai, C., Chao-an, L., and Yunjiang, C. (2014). Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the control of blue mold on citrus. *FEMS Yeast Res.* 14, 536–546.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains.

Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* 12(2), 151–180.

Roberts, R. L., and Fink, G. R. (1994). Elements of a single map kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: Mating and invasive growth. *Genes Dev.* 8, 2974–2985.

Rodríguez-Naranjo, M.I., Gil-Izquierdo, A., Troncoso, A.M., Cantos-villar, E., García-Parrilla, M.C. (2011). Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. *Food Chem.* 126(4), 1608–1613.

Rodríguez-Naranjo, M.I., Torija, M.J., Mas, A., Cantos-Villar, E., García-Parrilla, M.C. (2012). Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions. *J Pineal Res.* 53(3), 219–224.

Schulthess D, Ettlinger L (1978) Influence of the concentration of branched chain amino acids on the formation of fusel alcohols. *J Inst Breq* 84:240-243.

Sprenger, J., Sombra, L., Messina, G., Martinez, L.D., Silva, M.F. (2010). Determination of melatonin in wine and plant extracts by capillary electrochromatography with immobilized carboxylic multi-walled carbon nanotubes as stationary phase. *Electrophoresis.* 31(13), 2242-2248.

Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., and Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139–173.

Swingers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius IS (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine R* 11:139-173.

Ter Schure, E. G., van Riel, N. A., and Verrips, C. T. (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 67–83.

Vázquez, J., González, B., Sempere, V., Mas, A., Torija, M.J., Beltran, G. (2017). Melatonin reduces oxidative stress damage induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol.* 8, 1066.

Vázquez, J., Grillitsch, K., Daum, G., Mas, A., Torija, M.J., Beltra,n G. (2018). Melatonin minimizes the impact of oxidative stress induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces* and non-conventional yeast. *Front Microbiol.* 9, 1933.

Verstrepen, K. J., and Klis, F. M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.*60, 5–15.

Vigentini, I., Gardana, C., Fracassetti, D, (2015). Yeast Contribution to melatonin, melatonin isomers and tryptophan ethyl ester during alcoholic fermentation of grape musts. *J Pineal Res.* 58(4), 388-396

Waterhouse AL, Sacks GL, Jeffery DW (2016) Understanding wine chemistry. Wiley, Chichester.

Wendland, J., and Philippsen, P. (2001). Cell polarity and hyphal morphogenesis are controlled by multiple Rhoprotein modules in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics* 157, 601–610.

AUTOAVALUACIÓ

Al principi d'aquest estudi tenia molta curiositat i motivació per saber i estudiar la relació de la Biotecnologia i el vi, però pràcticament tenia descartada la possibilitat de seguir el camí de la investigació. Estar entre quatre parets blanques no era una idea que m'agradés.

Durant el desenvolupament d'aquest estudi he après, conviscut i viscut el dia a dia d'un científic; a vegades desanimar-se perquè algun aparell no acaba de funcionar, o pensar que sí que ho fa però trobar-se resultats estranys o algun procés que no trobes explicació, etc. Però es tracta de buscar els possibles errors i de repetir-ho, modificar i tornar-ho a fer, i el resultat acabarà sent encara més satisfactori. Com ja he dit, en un futur no em plantejava la via de la recerca com una opció, però acabat aquest estudi em sento molt més motivada per continuar en aquest apassionant món. Ara, les parets blanques em semblen un espai de creació, investigació i possibilitats infinites, molt més gratificants i, ahora, divertides!

Considero que he adquirit molts aprenentatges, des de tècniques que no havia utilitzat mai (extracció de DNA en llevats, sembra de viables, mesura de densitats...) com, per exemple, nocions sobre l'ús en l'HPLC.

A més a més, he après de tota la gent del laboratori amb la que he compartit el dia a dia i, especialment, de la M^a Ángeles, qui sempre ha tingut un moment en qualsevol dels dubtes que tenia, per petits que fossin.

Per acabar, destacar que ha estat una experiència molt positiva: m'ha encantat formar part d'aquest grup d'investigació, haver après dia a dia coneixements nous i endinsar-me en aquest nou i apassionant món científic.

ANNEXOS

ANNEX 1. **PROTOCOL D'EXTRACCIÓ DE DNA DE LLEVATS** (Querol et al., 1992)

- Fer créixer les cèl·lules en un *ependorff* amb 1,5mL d'YPD a 28°C (durant 12h o el temps necessari per tenir un bon creixement)
- Centrifugar 2 minuts a 10000 rpm
- Eliminem el sobrenedant
- El *pellet*, fer un rentat amb 1mL d'aigua destil·lada.
- Centrifugar 2 minuts a 10000 rpm
- Eliminem sobrenedant
- Afegir 500µL de Tampó 1 (T1: Sorbitol 0.9M, EDTA 0.1M, pH 7.5)
- Afegir 30µL de la solució de *Zymoliasa* 60000 (1.5mg en 1300µL de T1)
- Incubar la suspensió final a 37°C durant 20 minuts.
- Centrifugar 2 minuts a 10000rpm i eliminar el sobrenedant
- Resuspendre les cèl·lules en 500µL de Tampó 2 (T2: Tris 50mM, pH 7.4, EDTA 20mM)
- Afegir 13µL de SDS 10% i agitar
- Incubar a 65°C durant 5 minuts
- Afegir 200µL d'acetat potàssic 5M i homogeneïtzar bé
- Incubar en gel durant 5 minuts
- Centrifugar en fred (4°C) 10 minuts 12000 rpm (per a que precipito bé el SDS)
- Transferir el sobrenedant a un altre eppendorf
- Al nou eppendorf, afegir 700µL d'isopropanol i incubar a temperatura ambient 5 minuts.
- Centrifugar 10 minuts a 12.000 rpm i eliminar el sobrenedant
- Afegir 500µL d'etanol 70%
- Centrifugar 5 minuts a 12000 rpm i eliminar el sobrenedant
- Secar el *pellet* al buit fins que es vegi transparent
- Resuspendre el *pellet* en 30µL TE (Tris 10mM pH 7.4, EDTA 1mM pH 8).
- Deixar en TE unes 2h a 4°C abans d'utilitzar

ANNEX 2. PROTOCOL PCR ELEMENTS DELTA (Esteve et al. 1999)

Es prepara el mix de la PCR amb la recepta indicada i es posa al termociclador (24 μ L de mixPCR i 1 μ L de la mostra a analitzar).

mixPCR	Volum (μ L)
Buffer 10X	2.5
MgCl ₂ 50mM	1.25
Primer (delta12) 10 μ M	2.5
Primer (delta21) 10 μ M	2.5
dNTPs 40 μ M	0.5
BSA 20mg/mL	0.25
BioTaq U/ μ L	0.1
H ₂ O	14.4

Programa PCR

- 95°C 4min
 - 95°C 30s
 - 46°C 30s
 - 72°C 90s
 - 72°C 10min
- } x 35 cicles

A continuació es prepara un gel per a l'electroforesi (1,5% d'agarosa) amb tampó TBE 1x.

ANNEX 3. SEGUIMENT DE LA POBLACIÓ VIABLE (UFC/mL) durant les fermentacions en les tres soques

Taula 2. Seguiment de les cèl·lules viables (UFC/mL) en cada fermentació i soca.

1x			
Temps (h)	A	B	C
0	$2,00 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^6$
24	$2,26 \cdot 10^7 \pm 1,65 \cdot 10^6$	$8,27 \cdot 10^6 \pm 8,33 \cdot 10^5$	$1,74 \cdot 10^7 \pm 1,28 \cdot 10^6$
38	$5,43 \cdot 10^7 \pm 4,16 \cdot 10^6$	$1,96 \cdot 10^7 \pm 2,69 \cdot 10^6$	$5,13 \cdot 10^7 \pm 4,73 \cdot 10^6$
62	$8,17 \cdot 10^7 \pm 1,27 \cdot 10^7$	$4,23 \cdot 10^7 \pm 2,63 \cdot 10^7$	$6,40 \cdot 10^7 \pm 1,13 \cdot 10^7$
168	$9,60 \cdot 10^7 \pm 1,31 \cdot 10^7$	$8,57 \cdot 10^7 \pm 2,22 \cdot 10^7$	$9,83 \cdot 10^7 \pm 2,08 \cdot 10^6$
216	$1,07 \cdot 10^8 \pm 2,19 \cdot 10^7$	$3,90 \cdot 10^7 \pm 7,07 \cdot 10^6$	$7,30 \cdot 10^7 \pm 5,00 \cdot 10^6$
5x			
Temps (h)	A	B	C
0	$2,00 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^6$
14	$2,40 \cdot 10^8 \pm 1,84 \cdot 10^8$	$3,00 \cdot 10^6 \pm 5,86 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^7 \pm 0,00$
38	$7,25 \cdot 10^8 \pm 4,06 \cdot 10^8$	$2,80 \cdot 10^7 \pm 1,92 \cdot 10^8$	$5,93 \cdot 10^8 \pm 1,62 \cdot 10^8$
63	$8,33 \cdot 10^8 \pm 2,14 \cdot 10^8$	$5,23E+08 \pm 9,87 \cdot 10^7$	
144	$7,25 \cdot 10^8 \pm 1,59 \cdot 10^8$	$5,90 \cdot 10^8 \pm 1,76 \cdot 10^8$	$9,30 \cdot 10^8 \pm 1,61 \cdot 10^8$
168	$6,85 \cdot 10^8 \pm 1,27 \cdot 10^8$	$4,95E+08 \pm 2,12 \cdot 10^7$	$9,60 \cdot 10^8 \pm 1,87 \cdot 10^8$
216	$6,10 \cdot 10^8 \pm 2,12 \cdot 10^7$	$7,00 \cdot 10^8 \pm 0,00$	$7,37 \cdot 10^8 \pm 2,65 \cdot 10^8$

ANNEX 4. SEGUIMENT DE LA FILAMENTACIÓ a les soques control (P5 i P24)

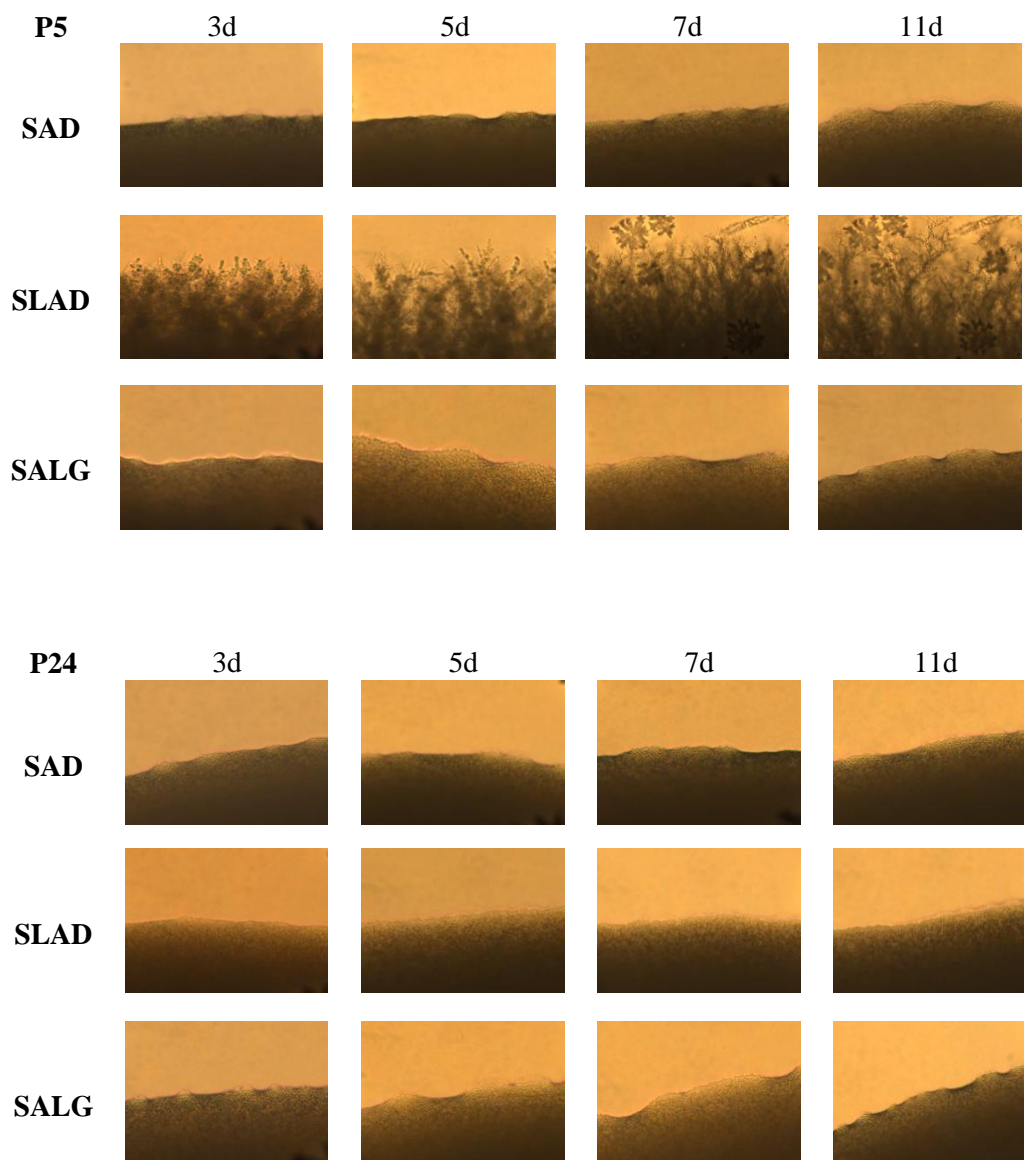


Figura 17. Seguiment de la formació de pseudo-hifes en les soques control en diferents medis de cultiu, sent el SD el medi control, el SLAD el baix en nitrogen i el SALG el baix en glucosa. 3d, 5d, 7d i 11d correspon als dies de l'estudi del creixement filamentós.

ANNEX 5. CREIXEMENT INVASIU de les soques control (P5 i P24)

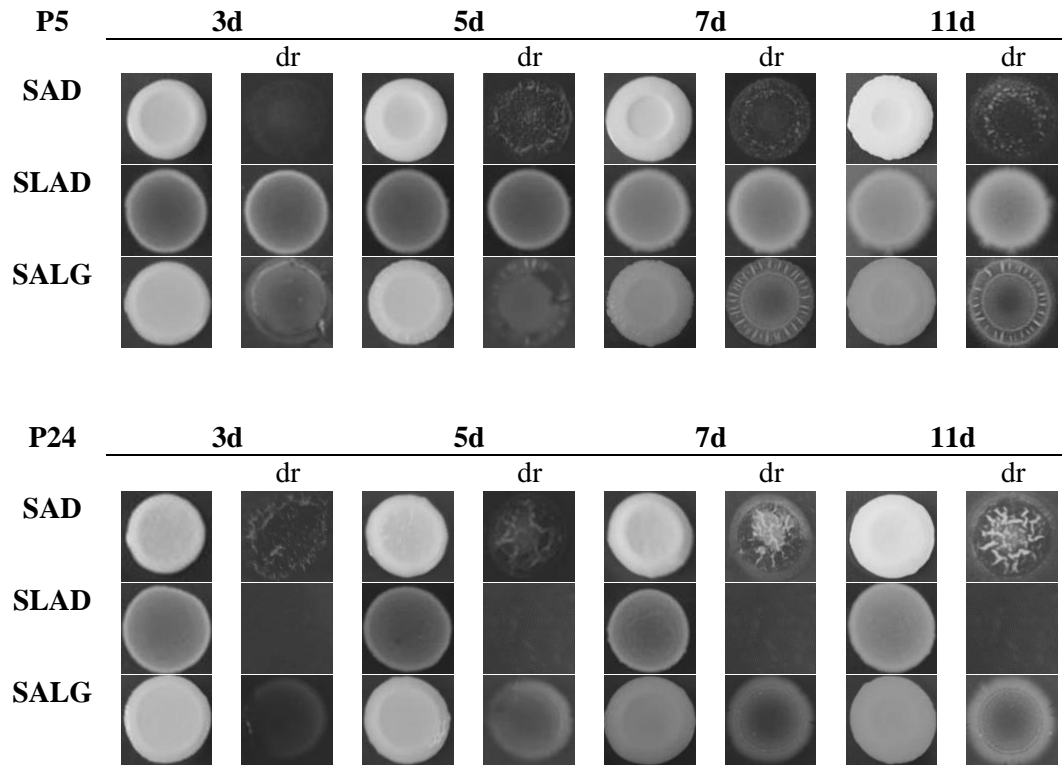


Figura 18. Evolució del creixement invasiu en dos soques control en diferents medis. SAD és el medi control, SLAD el baix en nitrogen i SALG el baix en glucosa. 3d, 5d, 7d i 11d correspon als dies de l'estudi i *dr*, "després del rentat".