Protocolo para obtener la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* P29 como levadura seca activa vínica

TRABAJO FINAL DEL GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

Autor: Ignacio García de Linares

Tutor: Ricardo Román Cordero Otero

UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

Tarragona, enero de 2020

Índice

Resumen 4
Abstract 5
Datos del centro 6
Introducción 7
Efecto de la trehalosa en la viabilidad celular 8
Efecto del estado metabólico sobre la viabilidad celular 10
Efecto del magnesio en la viabilidad y vitalidad celular 10
Efecto de la galactosa en la viabilidad celular 11
Efecto de la expresión génica en la viabilidad y vitalidad celular 11
Pérdida de la selectividad de la membrana celular durante el estrés 12
Hipótesis 14
Objetivos 15
Materiales y Métodos 16
Cepa de levadura y condiciones de crecimiento 16
Condiciones de secado y de rehidratación 16
Determinación de la viabilidad de la levadura 16
Determinación de la cinética de crecimiento 17
Medición de fuga de nucleótidos intracelulares 17
Fermentación 17
Análisis estadístico 18
Resultados 19
Evaluación del efecto de la trehalosa sobre la tolerancia al secado durante distintas fases del crecimiento celular 19
Evaluación del tiempo de rehidratación de las células sobre la viabilidad celular 19
Evaluación de la temperatura de rehidratación de las células sobre la viabilidad celular 21
Evaluación de la viabilidad celular tras rehidratar con diferentes medios 21
Evaluación del efecto de las condiciones de secado y de rehidratación sobre la vitalidad celular 23

Evaluación de las pérdidas de contenido citoplasmático bajo diferentes condiciones de rehidratación 24
Evaluación de la variación del pH del medio de rehidratación en función del tiempo 25
Evaluación de los compuestos aromáticos principales de los vinos producidos con la cepa P29 26
Discusión 28
Conclusión 32
Bibliografía 33
Autoevaluación 35

Resumen

En la industria vinícola se han sustituido los procesos de fermentación espontánea por la inoculación de levaduras secas activas vínicas (LSAV). La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* P29 es usada en la producción de vino de denominación Cava. A fin de mejorar su manipulación y conservación, se desarrolló un protocolo para obtener la cepa P29 como LSAV. Se estudió la influencia de las condiciones de secado y rehidratación y su efecto sobre la viabilidad y la vitalidad celular y sobre el proceso de fermentación. Se determinó que las células alcanzaban mayor viabilidad al ser secadas 8 horas después de entrar en fase estacionaria y rehidratadas durante 15 minutos a 28ºC. Nuestros resultados mostraron que con el secado en presencia de trehalosa al 10% y posterior rehidratación en un medio complementado con magnesio 0,5 mM se alcanza una viabilidad celular del 55%. Las células rehidratadas en presencia de magnesio mostraron una fase de adaptación 1,75 veces más larga. No obstante, las fermentaciones presentaron la misma cinética que los mostos inoculados con células frescas. El análisis de compuestos volátiles mostró diferencias significativas en 6 de los 30 compuestos analizados. El presente estudio inicia el desarrollo de un protocolo para desarrollar la cepa *Saccharomyces cerevisiae* P29 como LSAV.

Palabras clave: viabilidad, vitalidad, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentación, levadura seca activa.

Abstract

In the wine industry spontaneous fermentation processes have been replaced by the inoculation of active dry wine yeasts (ADWY). The yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* P29 is used in the production of Cava wine. To improve its manipulation and storage, a protocol was developed to obtain strain P29 as ADWY. The influence of dehydration and rehydration conditions and their effect on cell viability, vitality and the fermentation process were studied. It was determined that the cells reached higher viability when dried at 8 hours after entering the stationary phase and rehydrated for 15 minutes at 28°C. Our results showed that drying in the presence of 10% trehalose and rehydration with 0.5 mM MgSO4 increases cell viability up to 55%. The cells rehydrated in the presence of magnesium showed a lag phase 1.75 times longer. However, the fermentations showed the same kinetics as the musts inoculated with fresh cells. The analysis of volatile compounds showed significant differences in 6 out of the 30 compounds analyzed. The present study takes the first steps in the development of a protocol to develop the *Saccharomyces cerevisiae* P29 strain as ADWY.

Keywords: viability, vitality, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, active dry wine yeast.

Datos del centro

El presente estudio fue realizado en el grupo de investigación de Biotecnología Microbiana de los Alimentos de la Universitat Rovira i Virgili, dirigido por el Dr. Ricardo Román Cordero Otero. El grupo estudia múltiples vías de investigación relacionadas con el análisis y control de microorganismos de interés para el sector de la industria alimentaria, como pueden ser levaduras o bacterias. Durante la duración de mis prácticas externas formé parte de la línea de investigación de levaduras, en concreto en el desarrollo de un protocolo para desarrollar una levadura *Saccharomyces* como levadura seca activa vínica. En dicho proceso se llevaron a cabo técnicas de cuantificación de estos microorganismos en las distintas fases celulares involucradas en el proceso de secado, rehidratación y adaptación para la producción de vino Cava, además del estudio de diversas estrategias microbiológicas para la optimización de la fermentación.

Introducción

Actualmente, gran parte de los vinos producidos mundialmente son elaborados con levaduras secas activas vínicas (LSAV). Estas levaduras se caracterizan por su tolerancia a la deshidratación mediante la suspensión de los procesos metabólicos (Beker et al., 1987). La capacidad de estas levaduras de sobrevivir a la deshidratación y posterior rehidratación abarata los costes de conservación y transporte, permite la disponibilidad de inóculos y asegura la identidad de la levadura y su estabilidad genética a temperatura ambiente (Roca-Domènech et al., 2016). El sometimiento de las levaduras a estrés por choque osmótico y por calor produce variaciones en la actividad celular, mejorando el metabolismo y evitando fermentaciones lentas o estancadas. Muchas cepas de levaduras han sido descartadas de catálogos comerciales debido a su sensibilidad al tratamiento de secado. La investigación para desarrollar nuevas LSAVs del género *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* es de interés para la industria vinícola, ya que permite el desarrollo de nuevos productos con mayor complejidad aromática o con perfiles organolépticos de mayor calidad (Rodríguez-Porrata et al., 2008).

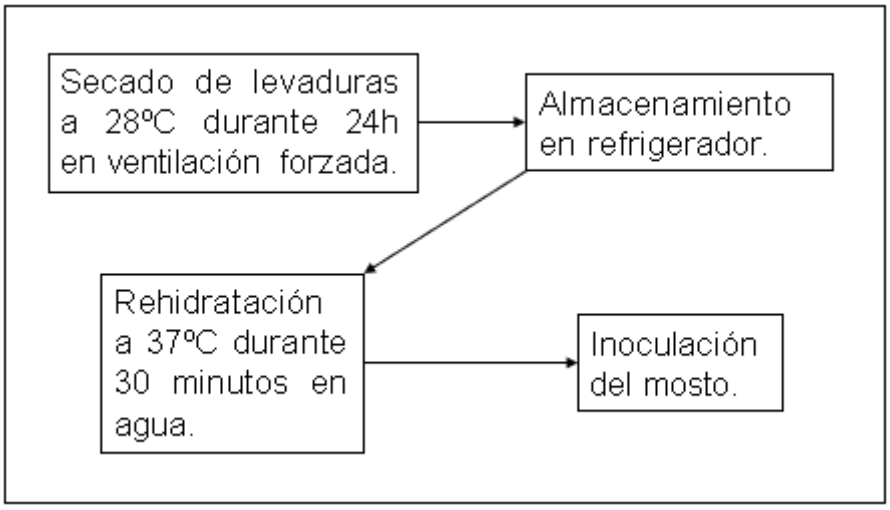

Figura 1: Protocolo actual para el secado y posterior rehidratación de *Saccharomyces cerevisiae* LSAV (Rodríguez-Porrata et al., 2011)

Para la producción de LSAV se lleva a cabo la deshidratación de la biomasa celular hasta alcanzar un porcentaje de humedad inferior al 8% (Rodríguez-Porrata et al., 2008). En la Figura 1 se muestra el protocolo actual para secar levaduras *Saccharomyces*. Los principales parámetros que influyen en la aptitud de las LSAV y en la calidad del proceso de fermentación son la viabilidad y vitalidad celular de las levaduras. La viabilidad es la capacidad de una célula de desarrollar una colonia, mientras que la vitalidad es la medida de la actividad metabólica respecto al estado fisiológico del cultivo inicial. La diferencia entre viabilidad y vitalidad celular de las levaduras no LSAV queda reflejado en la pérdida irreversible de la habilidad de reproducirse, aunque sigan metabólicamente activas. Además, la vitalidad celular influye en la velocidad de las levaduras para metabolizar los nutrientes del medio en el que se inoculen. Puesto que en el medio ya habrá de manera natural otros microorganismos, la vitalidad afectará a la competitividad de las levaduras por los nutrientes disponibles. Analizar estos parámetros es el método principal para el desarrollo de LSAV, permitiendo que los enólogos puedan evitar fermentaciones atascadas o lentas (Rodríguez-Porrata et al., 2008). Hasta la fecha se han realizado múltiples estudios para aumentar la tolerancia a la deshidratación y rehidratación de las levaduras, tanto para levaduras del género *Saccharomyces* como para levaduras no-*Saccharomyces*.

Efecto de la trehalosa en la viabilidad celular

La trehalosa es un azúcar formado por dos moléculas de glucosa unidas por sus carbonos en primera posición. Aparte de funcionar como un compuesto de almacenaje energético, la trehalosa está relacionada con la tolerancia de algunos organismos a condiciones adversas. Los organismos anhidrobiontes son capaces de sobrevivir sin agua durante largos períodos de tiempo. La trehalosa evita el aumento de la temperatura de transición de fase gel a fase liquida, permitiendo a las membranas mantenerse en estado fluido a temperaturas fisiológicas y evitar la transición de fase durante la rehidratación. El estudio de levaduras ha revelado que la trehalosa interactúa con los fosfolípidos de la membrana celular mediante la formación de puentes de

hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los carbohidratos de superficie de membrana con las cabezas polares de los lípidos. Durante esta interacción, la trehalosa sustituye las moléculas de agua que normalmente se encuentran enlazadas al exterior e interior de la bicapa lipídica, manteniendo la distancia necesaria entre lípidos de membrana para mantener el estado de equilibro entre fases (Figura 2). Además, la trehalosa es capaz de pasar a un estado líquido vítreo de alta viscosidad, permitiéndole cubrir biomoléculas y protegerlas de la cristalización causada por el secado. Existe relación directa entre la tolerancia a la desecación y la concentración de trehalosa celular. Las LSAV utilizadas en la industria vinícola son capaces de acumular altos niveles de trehalosa, permitiendo su secado y posterior rehidratación (Eleutherio et al., 2015). Una de las principales técnicas en la elaboración de protocolos para el desarrollo de LSAV es la complementación con trehalosa de las levaduras antes de ser secadas. Múltiples estudios (Roca-Domènech et al., 2018; Roca-Domènech et al., 2016) consiguieron aumentar la tolerancia a la deshidratación de levaduras no LSAV mediante el secado de las células en presencia de trehalosa al 10%.

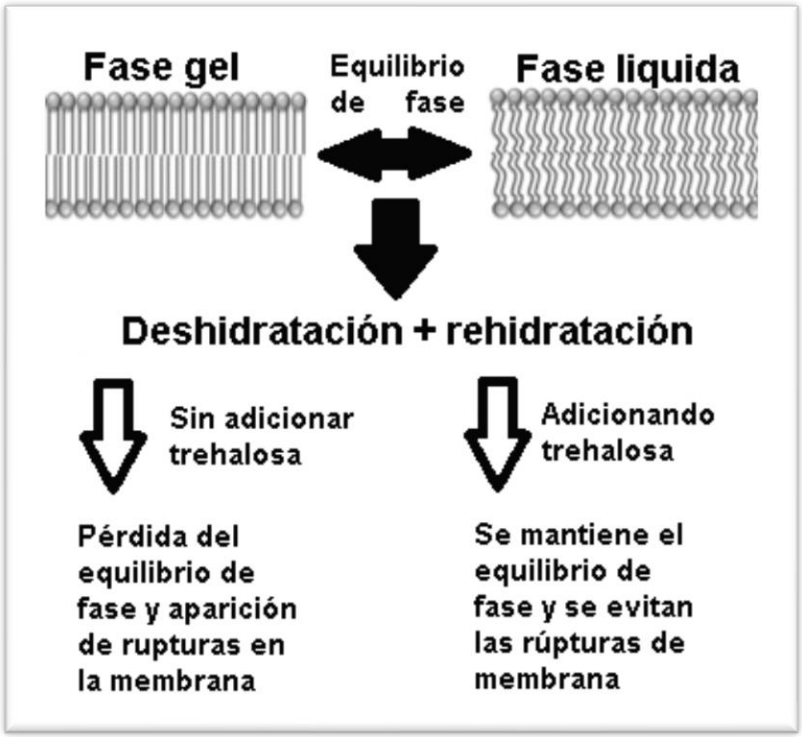

Figura 2: Efecto de la trehalosa sobre la membrana celular. La membrana antes del secado está en equilibrio entre fase gel y líquida cristalina. Si las células son secadas en presencia de trehalosa, pasarán a fase líquida cristalina. Si son secadas con escasez de trehalosa, pasarán a fase gel

Efecto del estado metabólico sobre la viabilidad celular

El estado metabólico en el que se encuentran las levaduras influye sobre la tolerancia al secado. Durante la fase exponencial de crecimiento, las levaduras empiezan a sintetizar y almacenar trehalosa, debido al estrés producido por la disminución de los nutrientes del medio. Este proceso continúa hasta que empiezan a agotase los nutrientes del medio y las células entran en fase estacionaria. En este momento, la producción de trehalosa se detiene, el metabolismo celular disminuye y las células alcanzan su máxima concentración de trehalosa intracelular, habiendo sustituido gran parte del agua de la célula. Durante este estado de metabolismo pausado, la trehalosa protege las células. Una vez se reponen los nutrientes del medio, la trehalosa se degradada y la célula, si es un anhidrobionte, recupera su actividad normal.

Varios estudios han confirmado la expresión de los genes relacionados con la producción de trehalosa en la fase exponencial, a la vez que confirmaron la reducción de la expresión de estos durante la fase estacionaria (Eleutherio et al., 2015). Complementando estos resultados, se analizó la tolerancia al secado y a la rehidratación a distintos tiempos y fases celulares en *S. pombe*, *S. bacilliaris* y en otras cepas de *S. cerevisiae*. En estos estudios alcanzaron máxima viabilidad celular cuando las levaduras fueron deshidratadas estando en fase estacionaria (Roca-Domènech et al., 2018; Roca-Domènech et al., 2016), confirmando la idoneidad de esta fase para la rehidratación.

Efecto del magnesio en la viabilidad y vitalidad celular

La biodisponibilidad del magnesio tiene un papel clave sobre el crecimiento y metabolismo de las levaduras. La suficiencia de magnesio intracelular libre es imprescindible para el funcionamiento de enzimas clave y para la estabilidad de membrana. Respecto a la estabilidad de membrana, el magnesio influye en la protección de las células de levadura al prevenir el aumento de la permeabilidad de la membrana celular, causado por el estrés inducido por la temperatura o la desecación (Trofimova et al., 2010). Es por ello por lo que ha sido estudiado el

efecto del magnesio sobre la viabilidad y vitalidad celular. La rehidratación con medios con magnesio mostró un incremento en la viabilidad celular (Roca-Domènech et al., 2018; Roca-Domènech et al., 2016). Además, Rodríguez-Porrata et al. (2008) consiguieron aumentar la vitalidad de *Saccharomyces cerevisiae* QA23 mediante la rehidratación en un medio con magnesio 5 y 10 mM. Dicho aumento de la vitalidad quedó reflejado en la duración de la fase de adaptación, que fue 2/3 veces más corta.

Efecto de la galactosa en la viabilidad celular

En el estudio realizado por Roca-Domènech et al. (2018) consiguieron aumentar la viabilidad de *Starmerella bacilliaris* con la suplementación del medio de rehidratación con Galactosa. Sin embargo, en estudios con *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* no mostraron ninguna mejoría en la viabilidad celular, pero mostraron tiempos de duplicación similares a las rehidratadas en presencia de glucosa, lo que sugiere un efecto no tóxico en las células (Roca-Domènech et al., 2016; Rodríguez-Porrata et al., 2008).

Efecto de la expresión génica en la viabilidad y vitalidad celular

Al inocular un mosto con células de levadura, estas sufren un choque osmótico debido a la alta concentración de azúcares. Para sobrevivir a dicho choque osmótico es necesario que las células se recuperen de la rehidratación con la máxima vitalidad posible. El grupo de Rodríguez-Porrata et al. (2012) confirmó que el silenciamiento de los genes relacionados con la síntesis de hidrofilinas afectaba negativamente a la viabilidad celular tras el estrés de deshidratación. La función de las hidrofilinas no está totalmente determinada, pero la expresión de los genes que las codifican es inducida durante el choque osmótico, por lo que se especula que están relacionadas con la adaptación al déficit de agua. Por ello, determinar las condiciones óptimas de rehidratación contribuiría en alcanzar mayor vitalidad y favorecer la síntesis de hidrofilinas.

Pérdida de la selectividad de la membrana celular durante el estrés

Durante la deshidratación y rehidratación de las levaduras se produce un flujo rápido de agua a través de las membranas celulares que causa rupturas en membranas celulares y nucleares (Figura 3). Dichas rupturas alteran la integridad celular. Además, la transición de fase experimentada por las membranas celulares y las bicapas lipídicas durante el secado provoca cambios en la permeabilidad de la célula. Estos cambios incrementan la pérdida de nucleótidos, iones y otros componentes celulares solubles. Las membranas son rápidamente reparadas durante la rehidratación celular mediante la movilización de los lípidos almacenados. La determinación de la pérdida de componentes celulares bajo distintas condiciones de rehidratación nos mostrará qué suplementos favorecen la reparación de las membranas celulares. Una reparación más rápida supondrá menor pérdida de componentes y mayor viabilidad y vitalidad celular.

En este estudio desarrollamos un protocolo para hacer que la cepa P29 de *Saccharomyces cerevisiae* sea una LSAV. Se caracteriza por presentar una baja tolerancia a la rehidratación, hecho que genera dificultades en su transporte, conservación y manipulación. Nuestros resultados para la cepa P29 mostraron una mejoría en la viabilidad celular del 43% al secar con trehalosa y rehidratar en magnesio. Utilizamos técnicas de análisis que han sido realizadas en anteriores estudios para determinar las condiciones óptimas de secado y rehidratación y para determinar los efectos de dichas condiciones sobre la vitalidad y viabilidad celular de la cepa P29 (Rodríguez-Porrata et al., 2008; Roca-Domènech et al., 2018). También estudiamos el efecto de la trehalosa durante el secado, ya que en estudios anteriores se obtuvieron mejoras en la tolerancia al secado al deshidratar las células en presencia de trehalosa. Se rehidrató en presencia de magnesio, galactosa o de magnesio y galactosa a la vez. Se estudió la variación del pH, la pérdida de nucleótidos tras la rehidratación y los compuestos volátiles principales producidos en la fermentación.

A) B)

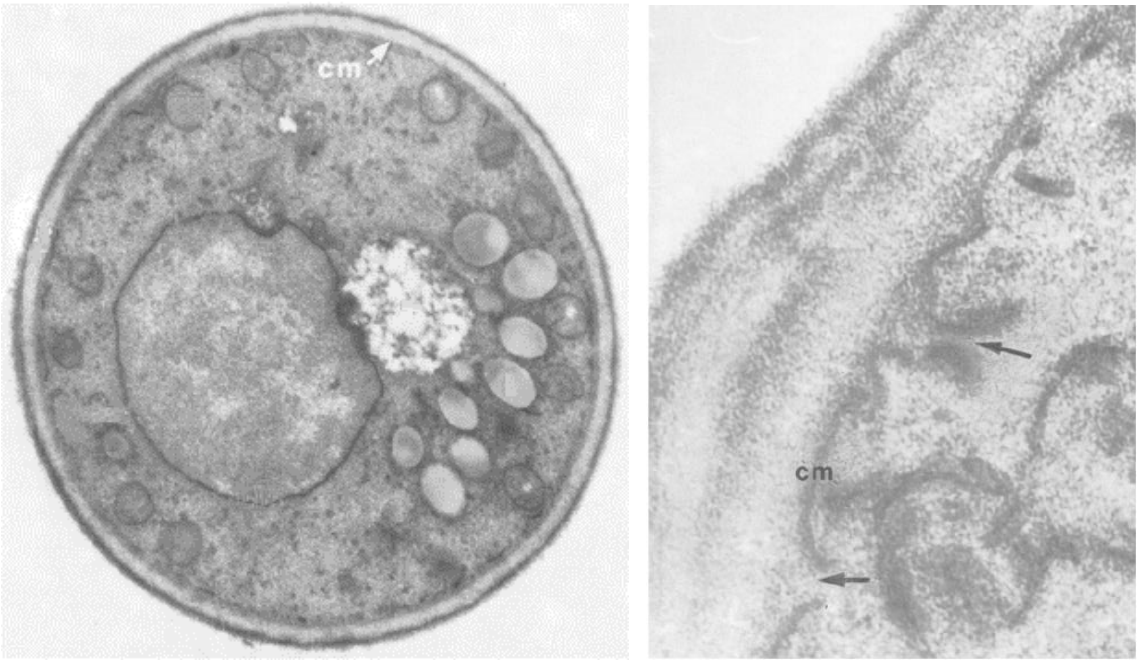

Figura 3: Microscopia electrónica de células de *Saccharomyces cerevisiae*. A) Célula intacta B) Célula deshidratada. cm: Membrana celular. (→): rupturas de la membrana celular. Fotografías tomadas por Beker et al. (1987)

Hipótesis

La complementación de compuestos durante el tratamiento de secado y rehidratación puede incrementar la tolerancia de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* P29 a la deshidratación.

Objetivos

El objetivo de este estudio es el desarrollo de un protocolo que permita obtención de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* P29 en formato de Levadura Seca Activa (LSA). Para ello, será necesario su caracterización fisiológica para permitir su aplicación enológica en la producción de vino Cava.

Materiales y Métodos

Cepa de levadura y condiciones de crecimiento

Se utilizó la cepa de levadura de vino cava *Saccharomyces cerevisiae* P29 (Institut Català de la Vinya i el Vi, España) en este estudio. Fueron cultivadas en agitación a 200 rpm en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona bacteriológica y 2% dextrosa) a 28ºC, inoculado con un precultivo líquido que creció durante la noche a una OD_{600} inicial de 0,2.

Condiciones de secado y de rehidratación

Se determinó las curvas de crecimiento y se deshidrató 1 x 10^8 células en ausencia y en presencia de trehalosa al 10%. El secado de levaduras se realizó mediante exposición a aire seco a 28ºC durante por 24 horas. La viabilidad y la vitalidad celular se determinó para la rehidratación en agua pura y en soluciones de rehidratación. Se estudió el efecto de las soluciones de rehidratación agregando a la condición basal de agua cada compuesto individualmente o combinando varios compuestos. La viabilidad celular y la vitalidad se determinaron para los siguientes compuestos: 0,5% de galactosa; 0,5 mM $MgSO_4$; 0,5% de galactosa y 0,5 mM $MgSO_4$. En todos los casos, se rehidrató en 10 ml de volumen final durante diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos) y a diferentes temperaturas (28, 30, 32, 35, 37, 40, 42ºC).

Determinación de la viabilidad de la levadura

Tras el proceso de rehidratación, el conteo de células viables fue realizado sembrando 100 µl y 200 µl de diluciones de células a 1 x 10^3 células/ml en placas con medio agar YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona bacteriológica, 2% dextrosa y 2% agar). Las placas fueron incubadas a 28ºC durante 48 horas y las unidades formadoras de colonias (UFCs) fueron cuantificadas.

Determinación de la cinética de crecimiento

El crecimiento en microplaca fue monitorizado a 600 nm cada 10 minutos tras 20 segundos de agitación durante 48 horas a 28ºC en un lector POLARstar omega (BMG Labtech, Alemania). Se inocularon pocillos de microplacas llenos con medio YPD con inóculos de células rehidratas. Estos inóculos fueron medidos por conteo de células con microscopio para que el volumen final (200 ml) tenga una OD_{600} de 0,2. Se determinaron blancos de cinco pocillos no inoculados independientes para cada placa de 96 pocillos. Tres cultivos independientes de la cepa P29 fueron evaluados (seis veces cada). Los datos de crecimiento de conteo de placas fueron medidos en valores de log10. Los parámetros biológicos, tiempos de duplicación y duraciones de la fase de adaptación fueron calculados mediante el ajuste de las curvas de crecimiento con el software MicroFit (Institute of Food Research, Norwich, Reino Unido) (Baranyi et al., 1994).

Medición de fuga de nucleótidos intracelulares

Las células rehidratadas se recolectaron por centrifugación a 5000 rpm a 4ºC durante 3 minutos. Los valores de absorbancia de los sobrenadantes a 260 y 280 nm se usaron para calcular la concentración de nucleótidos con la siguiente fórmula: $mg \cdot ml^{-1} = (0{,}063 \cdot A_{260}) - (0{,}036 \cdot A_{280})$. La muestra total de nucleótidos intracelulares fue preparada según lo descrito por Rodríguez-Porrata et al. (2008), y se calculó que el nivel intracelular basal fue de 3 mg por gramo de levadura rehidratada. Estos análisis fueron realizados por triplicado y las desviaciones estándar fueron de <10%. Para confirmar la validez de estos análisis, se midió la variación en el tiempo del pH de los sobrenadantes.

Fermentación

El mosto de uva Tempranillo presentaba un pH de 3,25 y fue suplementado con sacarosa hasta alcanzar los 200 $g \cdot l^{-1}$ y con fosfato de diamonio (250 $mg \cdot l^{-1}$). La prevención de contaminantes (levaduras silvestres y bacterias lácticas) se

realizó agregando 125 $mg \cdot l^{-1}$ de dicarbonato de dimetilo (DMDC). Tras 24 horas a 4ºC, se verificó la efectividad de la esterilización del mosto mediante recuento en placa. Las fermentaciones se realizaron en 100 ml de mosto en botellas de 125 ml. Se hicieron tres grupos de fermentaciones variando los inóculos de la cepa P29: células frescas, células rehidratadas en agua o en magnesio 0,5 mM. Todos los inóculos se diseñaron para alcanzar una concentración inicial de 1 x 10^6 $células \cdot ml^{-1}$. Todas las fermentaciones se realizaron por triplicado y se realizaron a 25°C sin agitación y se monitorizaron mediante pesada de los biorreactores. Se dio por finalizada la fermentación en cada reactor cuando el diferencial de emisión de CO_2 entre tres pesadas sucesivas no mostró diferencias significativas. El análisis de los compuestos volátiles principales de los vinos fue realizado por el Laboratorio de Análisis del Aromas y Enología (Universidad de Zaragoza, España). La evaluación microbiana de los vinos dio un valor de 1 x 10^8 $células \cdot ml^{-1}$.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA unidireccional utilizando el paquete de software estadístico SPSS 15.1. La significación estadística se estableció en p <0,05.

Resultados

Evaluación del efecto de la trehalosa sobre la tolerancia al secado durante distintas fases de crecimiento celular

La tolerancia al secado de la cepa P29 fue evaluada mediante un ensayo de conteo de colonias como es descrito por Roca-Domènech et al. (2018). Las medias de los valores de las UFCs por mililitro para la viabilidad celular después de la deshidratación y rehidratación con agua desionizada fueron calculadas teniendo en cuenta la viabilidad antes del secado. La desecación se realizó a distintos tiempos de las fases exponencial y estacionaria, tanto en ausencia como en presencia de trehalosa al 10% (Figura 4). Todas las muestras tomadas antes de las 32 horas de crecimiento y secadas sin trehalosa mostraron porcentajes de viabilidad entre 5 y 10%, mientras que las secadas en presencia de trehalosa alcanzaron entre el 10 y 20% de viabilidad. Las células tomadas a las 32 horas (8 horas tras el inicio de la fase estacionaria) mostraron los porcentajes de viabilidad más elevados, 28% para las secadas en ausencia de trehalosa y 35% en presencia de trehalosa. Las muestras tomadas a las 36 horas alcanzaron un 19% de viabilidad al ser secadas en ausencia de trehalosa y un 25% al ser secadas con trehalosa. La diferencia entre la viabilidad de las muestras secadas sin trehalosa y con trehalosa al 10% fue significativa en todas las fases del crecimiento celular.

Evaluación del tiempo de rehidratación de las células sobre la viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular de la cepa P29 a tiempos de rehidratación de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos (Figura 5). Las células fueron rehidratadas en trehalosa a 28ºC. No hubo diferencias significativas entre los porcentajes de viabilidad entre los tiempos de rehidratación de 5 y 10 minutos o en el tiempo comprendido entre 15 y 30 minutos. La viabilidad de las células rehidratadas en tiempos entre los 15 y 30 minutos fue de un porcentaje aproximado al 35%.

Como no hay diferencias significativas entre la rehidratación a 15, 20, 25 y 30 minutos, en el resto de experimentos se rehidrató durante 15 minutos.

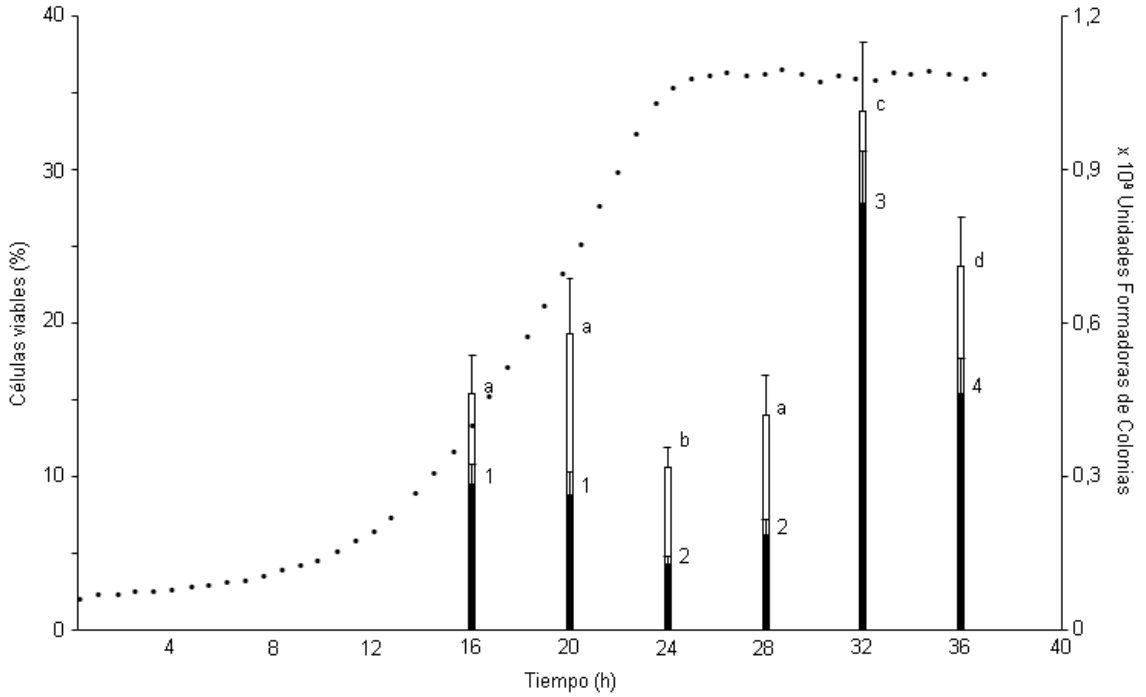

Figura 4: Viabilidad celular de la cepa P29 basada en el estado fisiológico celular durante el crecimiento. La curva de crecimiento y la viabilidad (%) en presencia de trehalosa durante el secado celular (barras blancas) frente a la ausencia (barras negras). Los valores representan la media de al menos 5 repeticiones biológicas ± desviación estándar. a, b, c; o 1, 2, 3 indican $p<0,05$

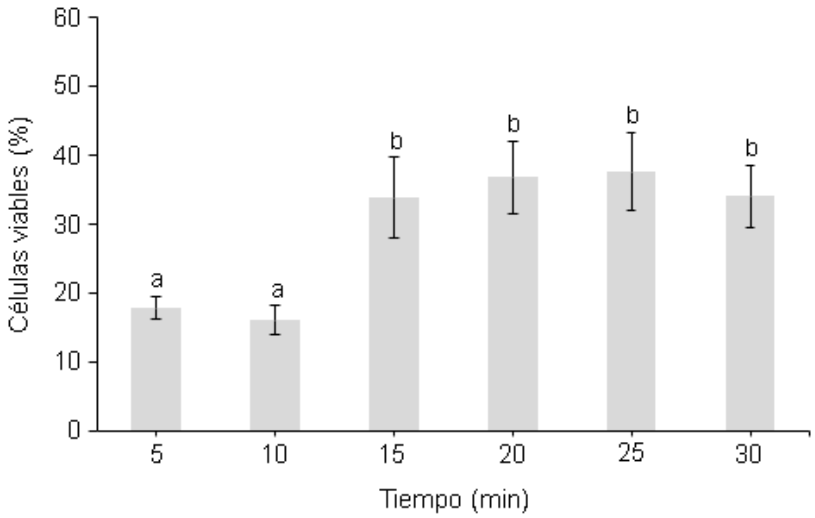

Figura 5: Efecto de la duración de rehidratación sobre la viabilidad celular. Los valores representan la media de 3 repeticiones biológicas ± desviación estándar. [a], [b] indican $p<0,05$. 100% = 1 x 10^8 células·l^{-1}

Evaluación de la temperatura de rehidratación de células sobre la viabilidad celular

La viabilidad celular fue medida a distintas temperaturas de rehidratación (28, 30, 32, 35, 37, 40 y 42ºC) durante 30 minutos (Figura 6). Las células fueron secadas en presencia de trehalosa al 10%. Los porcentajes de viabilidad de las células no presentaron diferencias significativas en temperaturas de rehidratación entre 28ºC y 42ºC, alcanzando un porcentaje de viabilidad aproximado del 48%. Como no se observaron diferencias significativas entre las distintas temperaturas de rehidratación, en el resto de experimentos se rehidrató a 28ºC.

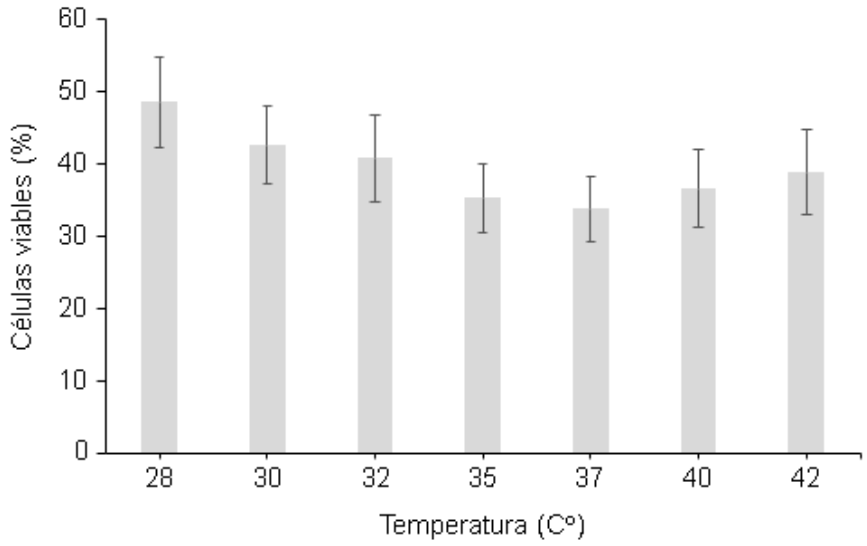

Figura 6: Efecto de la temperatura de rehidratación sobre la viabilidad celular. Los valores representan la media de 3 repeticiones biológicas ± desviación estándar

Evaluación de la viabilidad celular tras rehidratar con diferentes medios

Después de determinar la duración y la temperatura óptima de rehidratación, se evaluó la viabilidad celular en distintos medios de rehidratación. Las células fueron secadas en presencia o en ausencia de trehalosa. Posteriormente fueron rehidratadas con agua pura o complementadas con galactosa, magnesio o con

galactosa y magnesio. La figura 7 muestra el porcentaje de células viables tras la rehidratación con cada una de las condiciones. Las células secadas en presencia de trehalosa y rehidratadas con magnesio presentaron el mayor porcentaje de viabilidad celular (55% aproximadamente), aunque no se observó diferencia estadística significativa respecto a las células secadas en trehalosa y rehidratadas en agua pura. Las células secadas en trehalosa y rehidratadas con galactosa alcanzaron un porcentaje de viabilidad celular entre el 10% y el 15%. Aquellas que fueron secadas en presencia de trehalosa y rehidratadas con magnesio y galactosa tuvieron un porcentaje de viabilidad celular cercano al 25%. Sin embargo, las células rehidratadas en ausencia de trehalosa mostraron un porcentaje de viabilidad celular de aproximadamente 15%, independientemente de los compuestos utilizados durante la rehidratación.

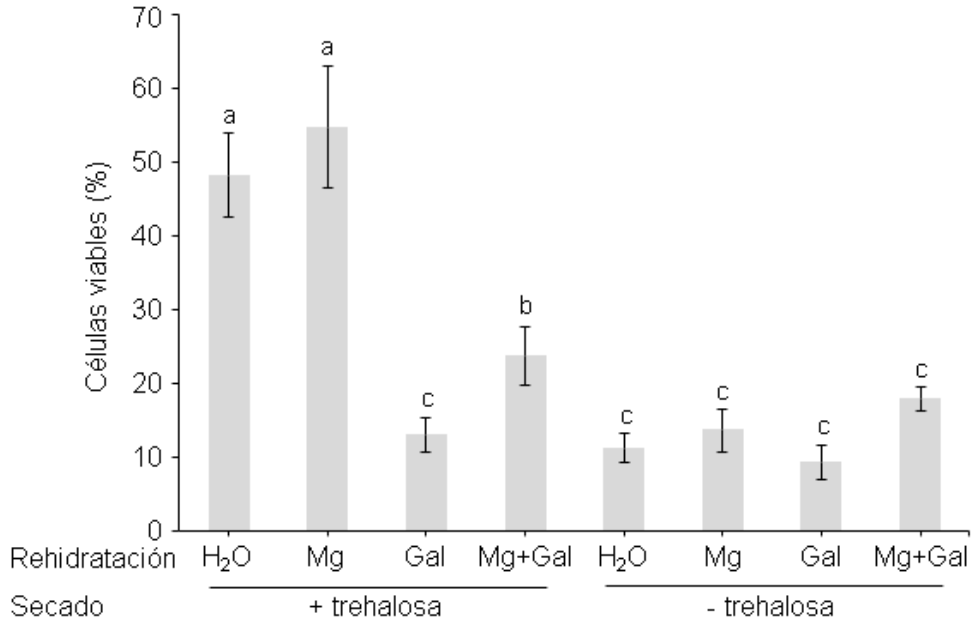

Figura 7: Viabilidad celular de la cepa P29 complementadas con compuestos durante la rehidratación. Las células secadas en presencia (+) o ausencia (-) de trehalosa se rehidrataron en agua pura (H_2O), complementadas con magnesio (Mg), con galactosa (Gal) o con ambos (Mg + Gal). Los valores representan la media de al menos 3 repeticiones biológicas ± desviación estándar. a, b, c indica $p<0,05$

Evaluación del efecto de las condiciones de secado y de rehidratación sobre la vitalidad celular

Una vez contrastada la viabilidad celular, se analizó el crecimiento de células de la cepa P29. Se analizó el crecimiento de dos grupos de células: ambos grupos fueron secados en presencia de trehalosa, pero un grupo fue rehidratado con agua pura y el otro con magnesio. En la Figura 8 podemos observar las curvas de crecimiento de los dos grupos de células. La fase de adaptación de las células rehidratadas con magnesio duró 8 horas, 1,75 veces más larga que las células rehidratadas en agua pura (5 horas). La fase exponencial de ambas condiciones duró aproximadamente 20 horas. La DO_{600} de las células rehidratadas con magnesio fue de 4,2 y de las rehidratadas en agua pura fue de 3,5, aunque la diferencia entre las DO_{600} no llega a ser significativa.

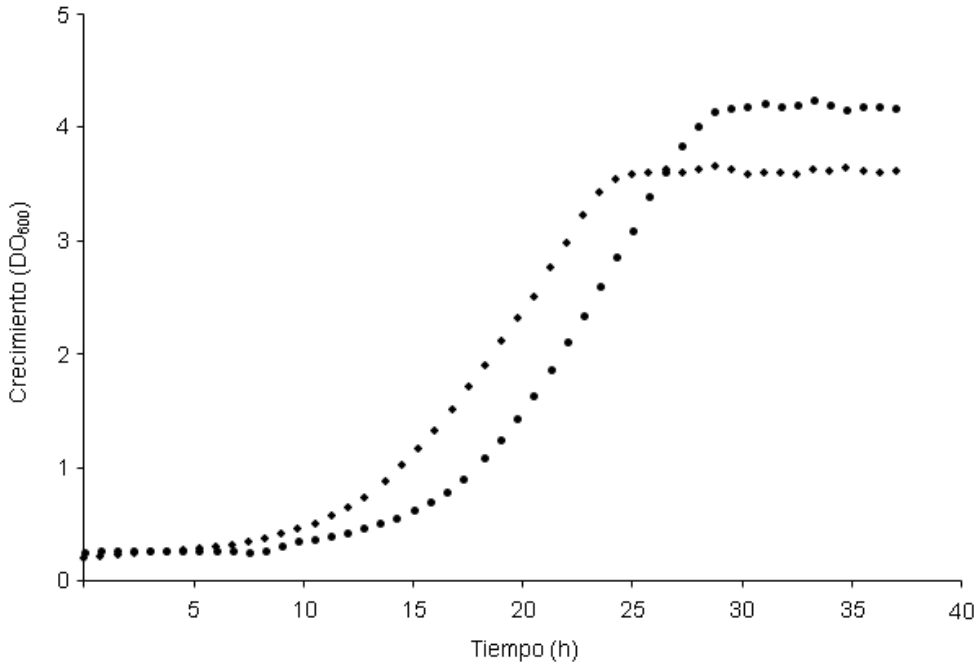

Figura 8: Crecimiento celular de la cepa P29 rehidratada en agua pura (♦) y en presencia de magnesio (●). Los valores representan la media de al menos 5 repeticiones biológicas, DS <15%

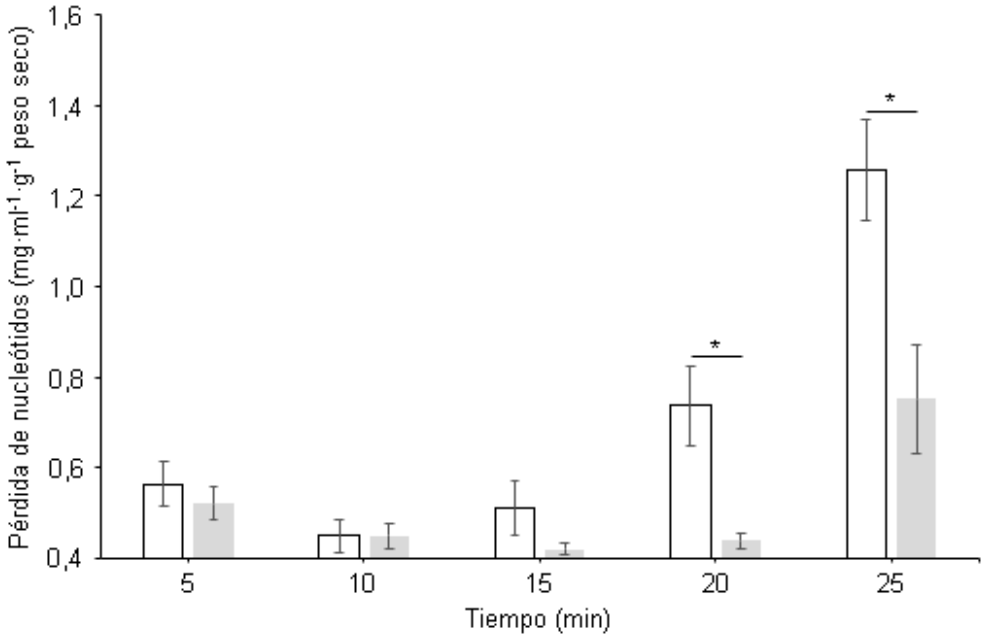

Figura 9: Evolución de la concentración de nucleótidos en el medio de rehidratación. Las células secadas en presencia de trehalosa fueron rehidratadas en agua pura (barras blancas) o en presencia de magnesio (barras grises). Los valores representan la media de al menos 3 repeticiones biológicas ± desviación estándar. * Diferencia significativa, p<0,05

Evaluación de las pérdidas de contenido citoplasmático bajo diferentes condiciones de rehidratación

Para evaluar si la permeabilidad de la membrana citoplasmática variaba según las condiciones de rehidratación, se midió la concentración de nucleótidos durante la rehidratación con distintos medios (Figura 9) en $mg \cdot ml^{-1}$ por gramo de peso seco ($mg \cdot ml^{-1} \cdot g^{-1}$). Las células fueron secadas en trehalosa y rehidratadas con agua pura o con un medio complementado con magnesio. Durante los primeros 15 minutos de rehidratación no se observó una diferencia significativa entre la concentración de nucleótidos en el sobrenadante de las células rehidratadas con agua pura o con el medio complementado con magnesio (no superaron los 0,5 $mg \cdot ml^{-1} \cdot g^{-1}$). Pasados 15 minutos, la diferencia entre la pérdida de nucleótidos entre un sobrenadante y otro se volvió significativa. A los 20 minutos, el sobrenadante de las células rehidratadas con agua presentaba una concentración aproximada de 0,75 $mg \cdot ml^{-1} \cdot g^{-1}$, mientras que el de las complementadas con magnesio era de 0,45 $mg \cdot ml^{-1} \cdot g^{-1}$. A los 25 minutos, la

pérdida de nucleótidos fue de 1,25 $mg \cdot ml^{-1} \cdot g^{-1}$ para las células rehidratadas con agua y de 0,75 $mg \cdot ml^{-1} \cdot g^{-1}$ para las rehidratadas con magnesio.

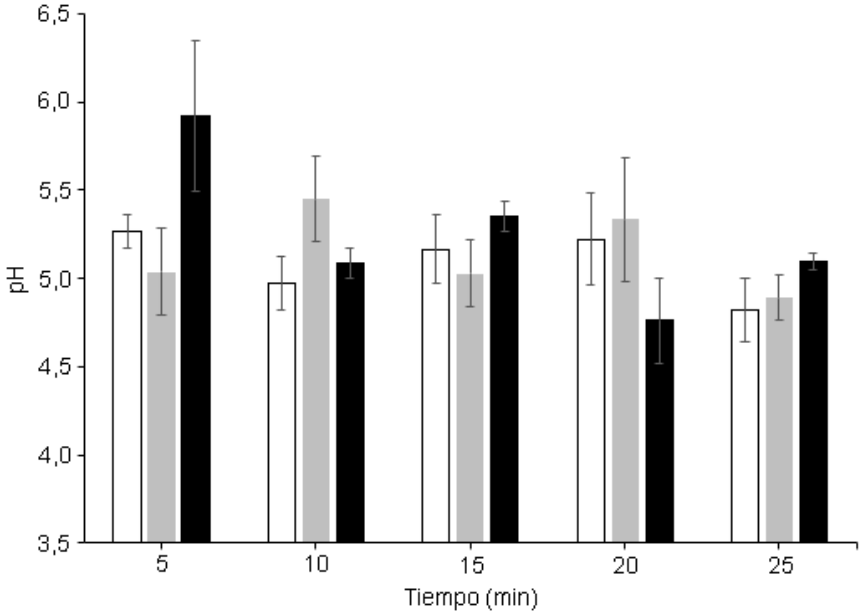

Figura 10: Variación del pH del medio de rehidratación en función del tiempo. Las células fueron secadas sin trehalosa y rehidratadas en agua pura (barras blancas), o secadas en presencia de trehalosa y rehidratadas en agua pura (barras grises) o rehidratadas en presencia de magnesio (barras negras). Los valores representan la media de al menos 3 repeticiones biológicas ± desviación estándar

Evaluación de la variación del pH del medio de rehidratación en función del tiempo

El pH del sobrenadante de las células tras ser rehidratadas fue medido para confirmar la pérdida de nucleótidos en función del tiempo y de las distintas condiciones de secado y rehidratación (Figura 10). Las células fueron secadas sin trehalosa y rehidratadas en agua pura, o secadas en presencia de trehalosa y rehidratadas en agua pura, o secadas en trehalosa y rehidratadas en presencia de magnesio. Se rehidrató durante 5, 10, 15, 20 y 25 minutos y se midió el pH. Los sobrenadantes se mantuvieron con un pH entre 5 y 5,5, sin mostrar diferencias significativas entre las condiciones, excepto en el sobrenadante de las células con magnesio a los 5 minutos de empezar la rehidratación, en el que el pH fue de 5,9. El sobrenadante final con mayor pH fue el de las células secadas con trehalosa y rehidratadas con magnesio El menor pH final fue el del

sobrenadante de las células secadas en ausencia de trehalosa y rehidratadas con agua pura.

Evaluación de los compuestos aromáticos principales de los vinos producidos con la cepa P29

Con el fin de evaluar la capacidad fermentativa de la cepa P29 en forma de LSA, se llevaron a cabo microvinificaciones usando tres condiciones de inoculación presentadas en Materiales y Métodos. La cinética fermentativa de los diferentes vinos fue monitorizada por pesada. A los 15 días, tras tres pesadas consecutivas sin cambios de masa en los biorreactores, se dieron por finalizadas las fermentaciones. Los vinos obtenidos para cada tipo de inóculo no mostraron diferencias significativas en los valores de pH (3,4 ± 0,01), azúcares residuales (3,12 ± 0,33) y etanol final (12,2%). El perfil de los compuestos aromáticos mayoritarios de los vinos producidos con células rehidratadas en presencia de magnesio o en agua no mostraron diferencias significativas. En la Tabla 1 se presentan los valores medios de los tres vinos inoculados con las células rehidratadas en magnesio o con células frescas.

De los 30 compuestos volátiles evaluados solo 6 mostraron diferencias significativas en los vinos inoculados con LSAV P29 respecto a los inoculados con células frescas. El hexanoato de etilo aumentó en un 92%, el decanoato de etilo en un 110%, el alcohol isoamílico en un 61% y ácido isovalérico empezó a ser detectable. En cambio, se observó una disminución estadísticamente significativa del 40% en contenido de diacetilo y del 20% de ácido decanoico.

Tabla 1: Compuestos volátiles principales de los vinos

Compuestos aromáticos mayoritarios	Umbral de detección en agua	Inóculo cepa P29 frescas	Inóculo cepa P29 LSA
Compuestos de carbonilo (oxidativos y descriptores aromáticos lácticos)			
Acetaldehído	0,5	19,42 ± 1,30	22,55 ± 7,17
Diacetilo	0,1	0,12 ± 0,03	0,07 ± 0,00*
Acetoína	150	1,7 ± 0,60	3,8 ± 1,03
Acetatos (descriptor de aroma floral y frutal)			
Acetato de etilo	12,3	25,1 ± 1,22	31,1 ± 4,39
Acetato de isoamilo	0,03	0,245 ± 0,02	0,37 ± 0,20
Acetato de hexilo	1,5	ND	ND
Etil ésteres lineales (descriptor de aroma frutal)			
Propanoato de etilo	5,5	ND	ND
Butirato de etilo	0,125	ND	ND
Hexanoato de etilo	0,062	0,39 ± 0,03	0,75 ± 0,00*
Octanoato de etilo	0,58	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,08
Decanoato de etilo	0,2	0,12 ± 0,01	0,25 ± 0,09*
Alcoholes (descriptor de aroma verde y fusel)			
Isobutanol	40	8,6 ± 0,25	12,5 ± 2,19*
1-butanol	150	1,01 ± 0,04	1,06 ± 0,10
Alcohol isoamílico	30	42,8 ± 1,98	68,9 ± 4,20*
1-Hexanol	8	ND	ND
3-Hexanol	0,4	ND	ND
Metanol	1	0,32 ± 0,05	0,44 ± 0,03*
Alcohol bencílico	200	0,08 ± 0,00	0,1 ± 0,01
Beta-fenil etanol	14	9 ± 0,90	11,5 ± 0,60*
Ésteres diversos (relevantes o no para el aroma)			
Lactato de etilo	154	0,8 ± 0,08	0,7 ± 0,15
Succinato de dietilo	200	0,11 ± 0,02	0,17 ± 0,00
Lactonas (descriptor melocotón)		ND	ND
Lambda-butirolactona	35	1,5 ± 0,20	1,4 ± 0,05
Ácidos (descriptor aroma queso, excepto a. acético, vinagre)			
Ácido acético	300	550 ± 51,54	631 ± 81,02
Ácido butírico	0,173	0,16 ± 0,05	0,11 ± 0,03*
Ácido isobutírico	0,05	2,44 ± 0,17	2,55 ± 0,70
Ácido isovalérico	0,033	ND	0,033 ± 0,00*
Ácido hexanoico	0,42	3,16 ± 0,16	3,9 ± 0,68
Ácido octanoico	0,5	5,98 ± 1,14	6,98 ± 0,90
Ácido decanoico	1	2,28 ± 0,13	1,84 ± 0,60*

*, Indica diferencia significativa entre las fermentaciones; ND, Compuesto no detectado; unidades de los compuestos en $mg \cdot l^{-1}$

Discusión

Las células de la cepa P29 de *Saccharomyces cerevisiae* alcanzaron su mayor viabilidad al ser secadas a las 8 horas de iniciar la fase estacionaria. Este resultado coincide con análisis realizados anteriormente para cepas de *S. cerevisiae*, en los que se obtuvieron mayor tolerancia al secado durante la fase estacionaria tardía (Dupont et al., 2014). Durante la fase estacionaria, las células alcanzan su máxima concentración de trehalosa almacenada (Eleutherio et al., 2015), por lo que podríamos asociar el papel de la trehalosa intracelular con la mayor tolerancia al secado en este punto de la curva de crecimiento. La baja viabilidad de la cepa P29 tras el secado podría ser debido a que las células de esta cepa produzcan menos trehalosa durante la fase exponencial. Esta suposición explicaría el aumento de viabilidad producido al secar las células en un medio con una concentración de trehalosa del 10%. La cepa mostró un porcentaje de viabilidad celular cercano al 48%, un 37% más que las células secadas en ausencia de trehalosa.

La mayor viabilidad celular se alcanzó al rehidratar entre 15 y 30 minutos, duración que coincide con la utilizada por enólogos para *S. cerevisiae* (alrededor de 20-30 minutos). La rehidratación en otras cepas fue a 37ºC (Rodríguez-Porrata et al., 2011) pero la cepa P29 no mostraba diferencias significativas al ser rehidratada a temperaturas entre los 28ºC y los 42ºC. Como la viabilidad no variaba entre 28ºC y 42ºC, se rehidrató a 28ºC.

La tolerancia al secado y a la rehidratación podría ser distinta entre distintas cepas por varios factores. Ratnakumar et al. (2006) estudiaron el efecto del choque térmico sobre levaduras, concluyendo que las proteínas producidas en respuesta al estrés aumentaban la tolerancia al secado. La presencia de proteínas de respuesta al choque térmico podrían ser las causas de las diferencias en tolerancia al secado. Sin embargo, la causa no ha sido determinada con exactitud.

Determinamos que secar las células en ausencia de trehalosa y rehidratarlas con distintas condiciones no producía efectos estadísticamente significativos (Figura 4). Sin embargo, al deshidratarlas en presencia de trehalosa y suplementarlas con medios con magnesio o con galactosa se producían cambios en la viabilidad celular. Las células redujeron significativamente su viabilidad al complementarlas con galactosa. La galactosa podría tener efecto antagónico sobre la trehalosa, ya que la viabilidad bajó hasta ser similar a la de células secadas sin trehalosa. La rehidratación con magnesio incrementó la viabilidad, aunque el aumento no fue estadísticamente significativo. Este leve aumento de la tolerancia coincide con los resultados de Trofimova et al. (2010), que asociaban la presencia de iones Mg^{2+} con el aumento de la viabilidad celular tras el secado. En el caso de las células secadas en trehalosa y rehidratadas simultáneamente con galactosa y magnesio, aumentaron significativamente la viabilidad respecto a la rehidratación solo con galactosa, sin llegar a alcanzar la viabilidad de las rehidratadas sin galactosa. Esta tolerancia podría deberse a la combinación del efecto de la galactosa sobre el metabolismo de la trehalosa con el aumento de viabilidad producido por el magnesio.

Para ampliar los datos sobre el efecto del magnesio en las células, comparamos las cinéticas de crecimiento de las células rehidratadas en agua pura y las rehidratadas con magnesio, habiendo sido secadas previamente en presencia de trehalosa (Figura 5). Aunque la producción de biomasa no presentó diferencias significativas, la fase de adaptación de las células rehidratadas con magnesio duró 1,75 veces más que las rehidratadas con agua. Este aumento de la fase de adaptación probablemente se deba a la necesidad de las células de expulsar el magnesio en exceso. Durante el proceso de desintoxicación, disminuiría la actividad metabólica de las células y su capacidad de duplicarse, por lo que requerirían más tiempo para salir de la fase de adaptación.

Las membranas celulares son dañadas durante la rehidratación, causando la fuga de componentes intracelulares. La capacidad de reparación de estas puede variar según las condiciones del medio de rehidratación. Se realizó un análisis de la pérdida de nucleótidos para analizar el daño causado por la rehidratación en las membranas y el efecto del medio de rehidratación en la reparación celular.

Las células fueron secadas en presencia de trehalosa y rehidratadas en agua pura o con magnesio. La pérdida de nucleótidos durante los primeros 15 minutos de rehidratación no mostró diferencias estadísticamente significativas al ser rehidratadas con agua o magnesio. A partir de los 20 minutos se puede observar que las células rehidratadas con magnesio muestran pérdidas significativamente inferiores que las rehidratadas en agua pura. Es posible que el magnesio tenga efecto sobre la vitalidad celular de las levaduras, reduciendo el tiempo de reparación de la membrana celular tras la rehidratación. El efecto del magnesio sobre la vitalidad celular podría deberse a la activación de enzimas metabólicas por parte de este y/o que tenga efecto protector al actuar como estabilizador de carga en las membranas celulares (Trofimova et al., 2010). Este aumento de la vitalidad celular podría mejorar el estado de las levaduras tras el proceso de rehidratación, haciendo que la capacidad de fermentación de las LSAV se aproxime más a la capacidad de las levaduras frescas.

La disminución de la pérdida de nucleótidos debería producir un aumento del pH, debido al carácter ácido de los mismos. El pH final de los sobrenadantes de las células secadas en trehalosa y rehidratadas en agua pura o con magnesio fue mayor que el de las células secadas sin trehalosa, aunque no fue una variación significativa. Este aumento confirma también que el secado en trehalosa y la rehidratación en magnesio mejora la capacidad de recuperación de la membrana celular tras la rehidratación. El único caso en el que se detectó una variación del pH significativa fue a los 5 minutos de empezar la rehidratación de las células secadas con trehalosa y rehidratas con magnesio. El pH de este medio fue 1,17 veces mayor que el pH del medio de las células que habían sido secadas en trehalosa y rehidratadas en agua pura. Es posible que el aumento de pH fuera producido por la presencia de aniones SO_4^{2-} procedentes de la hidrolisis del sulfato de magnesio ($MgSO_4$) utilizado para enriquecer el medio. Pasados los 5 minutos, el pH del medio de rehidratación baja hasta ser similar al pH del resto de medios. Esto podría ser resultado de la liberación del catión Mg^{2+} por parte de las células. Tras la reparación de la membrana citoplasmática posterior al proceso de rehidratación, el magnesio podría quedar en exceso en el interior celular, haciendo que las células lo liberasen al medio. Una vez liberado, el catión Mg^{2+} neutralizaría al anión SO_4^{2-}, produciendo la disminución del pH del medio.

Respecto al proceso de fermentación del mosto, se realizaron varios análisis para confirmar la actividad metabólica de las levaduras secadas y comprobar si había cambiado su capacidad fermentativa. Se pesaron los fermentadores cada día para medir la emisión de CO_2. Cuando se redujo significativamente la emisión de CO_2, concluimos que la fermentación había finalizado. Se midió los azúcares residuales finales para comprobar si la fermentación había finalizado por agotamiento de los azúcares del mosto o por reducción del metabolismo causado por fallos en la actividad metabólica de la célula. Los azúcares residuales finales fueron inferiores a 5 $g \cdot l^{-1}$, confirmando que la fermentación estaba ralentizándose por la falta de nutrientes. También se midió el pH y la concentración de etanol. Los valores fueron similares para los vinos producidos con células frescas y con células rehidratadas. Esto nos indica que el metabolismo de las células no ha variado significativamente tras el estrés producido por el secado y posterior rehidratación.

De los compuestos volátiles analizados, el vino obtenido con la cepa P29 LSAV tiene mayor concentración de hexanoato de etilo, decanoato de etilo y alcohol isoamílico. Estos compuestos son asociados con sabores afrutados, causando cambios en el perfil organoléptico del vino. También aumentó la concentración de ácido valérico y disminuyó la de diacetilo y ácido decanoico. Estos tres compuestos están asociados al descriptor “mantequilla”, así que el efecto de la disminución del diacetilo y del ácido decanoico podría ser contrarrestado por el aumento de ácido isovalérico, haciendo que no varíe el sabor a mantequilla del vino (Robinson et al., 2009). Se puede asumir que las diferencias observadas entre los perfiles aromáticos de los vinos obtenidos no han de impactar significativamente en el producto final en escala industrial. El escalado en fermentaciones vínicas y el uso de umbrales de detección en matriz vino seguramente actuaron como buffer de estas diferencias encontradas a pequeña escala. No obstante, los valores obtenidos para el contenido de ácido acético son totalmente indeseados para una cepa vínica, ya que este no debería superar los 100 $mg \cdot l^{-1}$ en este tipo de evaluaciones. Esta característica de la cepa *S. cerevisiae* P29 podría chocar con las exigencias organolépticas de algunos productores del sector vitivinícola.

Conclusión

En conclusión, este estudio da los primeros pasos en el desarrollo de una LSAV a partir de la cepa P29. Se caracterizó la viabilidad y vitalidad celular tras el proceso de secado y rehidratación bajo distintas condiciones fisiológicas. La complementación con trehalosa y la rehidratación en magnesio aumentaron la viabilidad hasta el 55%. Este aumento de la tolerancia se corresponde con los estudios realizados anteriormente. La concentración de compuestos volátiles varía, por lo que es posible que sea necesario corregir la composición del vino. Los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido aproximarnos al diseño experimental de un protocolo para el desarrollo de la cepa P29 como LSAV. Será necesario continuar la investigación con nuevos tratamientos para alcanzar una tolerancia al secado que permita el uso de la cepa en la industria vinícola.

Bibliografía

Baranyi, J., and Roberts, T. A. (1994). A Dynamic Approach to Predicting Bacterial Growth in Food. *International Journal of Food Microbiology* 23: 277–94. https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0.

Beker, M. J., and Rapoport, A. I. (1987). Conservation of Yeasts by Dehydration. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 35: 128–65. https://doi.org/10.1007/bfb0004428.

Dupont, S., Rapoport, A. I., Gervais, P., and Beney, L. (2014). Survival Kit of *Saccharomyces Cerevisiae* for Anhydrobiosis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 8821–34. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6028-5.

Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E., and Magalhães, R. (2015). Revisiting Yeast Trehalose Metabolism. *Current Genetics* 61: 263–74. https://doi.org/10.1007/s00294-014-0450-1.

Ratnakumar, S., and Tunnacliffe, A. (2006). Intracellular Trehalose Is Neither Necessary nor Sufficient for Desiccation Tolerance in Yeast. *FEMS Yeast Research* 6: 902-13. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00066.x.

Robinson, A. L., Ebeler, S. E., Heymann, H., Boss, P. K., Solomon, P. S., and Trengove, R. D. (2009). Interactions between Wine Volatile Compounds and Grape and Wine Matrix Components Influence Aroma Compound Headspace Partitioning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 10313–22. https://doi.org/10.1021/jf902586n.

Roca-Domènech, G., Lopez-Martínez, G., Tirado, V., Borrull, A., Candelas, Ó., Rozès, N., and Cordero-Otero, R. (2016). Viability Enhancement of *Schizosaccharomyces Pombe* Cells During Desiccation Stress. *Journal of Microbiology Research* 6: 82–91. https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20160604.03.

Roca-Domènech, G., Lopez-Martínez, G., Barrera, E., Poblet, M., Rozès, N., and Cordero-Otero, R. (2018). Enhancing the Tolerance of the *Starmerella Bacillaris* Wine Strain to Dehydration Stress. *Annals of Microbiology* 68: 667–76. https://doi.org/10.1007/s13213-018-1373-8.

Rodríguez-Porrata, B., Carmona-Gutierrez, D., Reisenbichler, A., Bauer, M., Lopez-Martinez, G., Escoté, X., Mas, A., Madeo, F., and Cordero-Otero, R. (2012). Sip18 Hydrophilin Prevents Yeast Cell Death during Desiccation Stress. *Journal of Applied Microbiology* 112: 512–25. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05219.x.

Rodríguez-Porrata, B., Lopez-Martinez, G., Redón, M., Sancho, M., Mas, A., Rozès N., and Cordero-Otero, R. (2011). Enhancing Yeast Cell Viability after Dehydration by Modification of the Lipid Profile. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 75–83. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0428-1.

Rodríguez-Porrata, B., Novo, M., Guillamón, J., Rozès, N., Mas, A., and Cordero Otero, R. (2008). Vitality Enhancement of the Rehydrated Active Dry Wine

Yeast. *International Journal of Food Microbiology* 126: 116–22. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.016.

Trofimova, Y., Walker, G., and Rapoport, A. I. (2010). Anhydrobiosis in Yeast: Influence of Calcium and Magnesium Ions on Yeast Resistance to Dehydration-Rehydration. *FEMS Microbiology Letters* 308: 55–61. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01989.x.

Autoevaluación

La elaboración de mi trabajo final de grado ha sido la culminación de estos años de formación como biotecnólogo. A lo largo de la carrera he llevado a cabo diversos proyectos, pero ninguno de la magnitud de este trabajo. Realizar las prácticas en las que he basado este trabajo me ha aportado la experiencia que notaba que me faltaba.

Establecimos unos objetivos iniciales para el proyecto y un calendario para cumplirlos. Debido a mi falta de experiencia, tuve que repetir los primeros resultados pero, gracias a la ayuda de Ricardo, empecé a tomar velocidad y a saber evaluar los efectos de las condiciones experimentales sobre los resultados que iba obteniendo. A pesar de todo, cumplimos el calendario establecido previamente y obtuvimos resultados que correspondían con la hipótesis del proyecto.

Entre las habilidades que he adquirido, he aprendido a acoplar los tiempos de distintos procesos de manera que pueda ahorrar el máximo tiempo y reducir el tiempo no productivo. Además, aunque a lo largo de la carrera hemos aprendido cómo buscar información y cómo contrastar datos en múltiples bases de datos, la necesidad de comparar los resultados de este trabajo con anteriores investigaciones me ha ayudado a reforzar estos aspectos de la formación como biotecnólogo que todavía debía mejorar.