

Quim GIRALT ROIG

Millora fenotípica i conservació de la soca de llevat *Saccharomyces cerevisiae* Penedès-29

TREBALL FINAL DE MÀSTER

Dirigit per Dra. Gemma Roca Domenech i Dra. Anna Puig Pujol

Supervisat per Dra. M. Jesús Torija Martínez

Màster en BEGUDES FERMENTADES

Facultat d'Enologia



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

Tarragona

14 de juny 2021

Millora fenotípica i conservació de la soca de llevat *Saccharomyces cerevisiae* Penedès-29.

Giralt, Q., Roca, G., Puig A.

Àrea de Microbiologia i Biotecnologia, INCAVI, 08720-VILAFRANCA DEL PENEDÈS, ESPANYA

Paraules clau: Llevat, acidesa volàtil, mutagènesis, llum UV, Etil metanosulfonat, crioprotecció.

email: quim.giralt32@gmail.com

ÍNDIX

Resum	1
1. Introducció	2
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> penedès-29	2
1.2. Acidesa volàtil en els vins	3
1.3. Mutagènesis de microorganismes	5
1.4. Tècniques de conservació de microorganismes	7
2. Objectius	10
3. Materials i Mètodes	11
3.1. Reducció de l'acidesa volàtil	11
3.2. Conservació peu de cuba <i>S. cerevisiae</i> P29	14
4. Resultats i Discussió	15
4.1. Reducció de l'acidesa volàtil	15
4.2. Conservació peu de cuba <i>S. cerevisiae</i> P29	24
5. Conclusions i Perspectives	29
6. Agraïments	29
7. Bibliografia	30
8. Annexes	33
Annex I Fitxa tècnica <i>Saccharomyces cerevisiae</i> soca Penedès-29 (P29)	33
Annex II PCR Elements delta (δ) directe de colònia	35
Annex III Anàlisi de restricció del ADN mitocondrial	35
Annex IV Classificació dels aïllats obtinguts mitjançant la radiació amb llum UV	37
Annex V Classificació dels aïllats obtinguts mitjançant el tractament amb EMS	38

RESUM

La soca de llevat *Saccharomyces cerevisiae* Penedès-29 (P29) va ser seleccionada per INCAVI (Institut Català de la Vinya i el Vi) als anys vuitanta a la zona vitícola del Penedès. És una soca de llevat que actualment s'està comercialitzant en format líquid a diferents cellers, per a l'elaboració de vins tranquils i vins escumosos. Tot i tenir bones característiques fermentatives i sensorials, té dos inconvenients: tendeix a produir unes mica més d'àcid acètic (al voltant de 0,30-0,40 g/L) respecte altres soques, i fins al moment no s'ha pogut produir en forma de llevat sec actiu, fet que facilitaria la seva comercialització.

Un dels objectius de l'estudi ha estat l'obtenció d'un descendent de la soca P29 que presentés una reducció en la producció d'àcid acètic. Per a fer-ho, es van dur a terme tècniques de mutagènesi clàssica, utilitzant llum UV i l'agent alquilant etil metanosulfonat (EMS). Dels 82 descendents avaluats, 5 d'ells van presentar una reducció d'entre el 25-33% de la producció d'àcid acètic al final de la fermentació alcohòlica respecte la soca P29 sense mutagenitzar.

El segon objectiu s'ha basat en l'estudi de la viabilitat del peu de cuba (PdC) de la soca P29 conservada al llarg de 2 mesos a -20°C i -60°C utilitzant diferents concentracions de crioprotectors (glicerol, llet desnatada en pols, àcid ascòrbic i el producte comercial Gomasol SEDA: goma aràbiga, manoproteïnes i àcid ascòrbic) per intentar evitar danys cel·lulars. El crioprotector que mantenia una major viabilitat al llarg del temps a -20°C va ser el glicerol al 7,5 i 10%. D'altra banda, es va avaluar l'efecte de la temperatura de congelació a -60°C, on la viabilitat del PdC conservat sense crioprotector va ser major que la viabilitat obtinguda a -20°C. Finalment, a l'addicionar glicerol a -60°C es va observar que la viabilitat del PdC es conservava pràcticament al 100% durant els dos mesos de conservació en totes les concentracions del crioprotector avaluades (2.5, 5, 7.5, i 10 %).

ABSTRACT

The wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*, strain Penedès-29 (P29), was selected by INCAVI (Catalan Wine Institute) in the 1980s in the Penedès wine region. P29 is currently commercialized in a liquid format to different wineries for the production of wines and sparkling wines. Despite having good fermentation and sensory characteristics, it has two disadvantages, it tends to produce a few tenths of acetic acid (around 0,30-0,40 g/L), and it has not been possible to produce P29 strain as an active dry wine yeast, making easier its commercialization.

One of the aims of this study was to obtain a descendant of the P29 strain that presented a reduction in the production of acetic acid. Classical mutagenic techniques were performed, using UV light and the alkylating agent ethyl methanesulfonate (EMS). Of the 82 descendants evaluated, only five showed significant reduction of the acetic acid production (25-33%) at the end of the alcoholic fermentation in comparison with the untreated P29 stain.

The second objective was the study of the viability of the "pied de cuve" (PdC) of the P29 strain. The PdC was preserved over two months at -20°C and -60°C using different amounts of cryoprotectants (glycerol, skimmed milk powder, ascorbic acid and Gomasol SEDA: gum arabic, manoproteins and ascorbic acid) to prevent cell damage. The cryoprotectant that showed a higher viability over the time at -20°C was the glycerol at 7,5 and 10%. On the other hand, we evaluated the effect of using -60°C as freezing temperature. This lower temperature exhibited a better preservation of the PdC, even without addition of any cryoprotectant respect to the viability obtained at -20°C. Finally, the use of glycerol in combination with -60°C as conservation temperature, showed a viability of the PdC of nearly 100% after two months.

1. INTRODUCCIÓ

En la fermentació alcohòlica el procés principal és la transformació de sucres a etanol gràcies a l'acció dels llevats. La fermentació del most es pot donar de manera espontània, ja que la superfície dels raïms, d'on s'obté el most, està poblada de llevats i altres microorganismes endèmics. Aquestes fermentacions espontànies són de gran interès, ja que aporten característiques organolèptiques típiques de la zona als vins, tot i que aquestes poden donar resultats molt heterogenis i impredecibles, en alguns casos poden donar lloc a llargues fermentacions, gustos i aromes desagradables perquè no es té control de quines poblacions de microorganismes hi actuen. En les darreres dècades, la tendència ha estat realitzar fermentacions inoculant cultius purs de llevats comercials, principalment soques de *Saccharomyces cerevisiae*, els quals s'han aïllat de diferents zones vitícoles i provats per tal de seleccionar aquells amb un interès enològic afegit (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

1.1. *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PENEDÈS-29

La soca vínica *Saccharomyces cerevisiae* Penedès-29 (P29) (Figura 1) va ser seleccionada per INCAVI als anys vuitanta a la zona vitícola del Penedès. Va mostrar unes característiques que la feien idònia per obtenir un producte final de qualitat, permetent elaborar tant vins tranquils com escumosos amb un segell de territori. Actualment, INCAVI distribueix a diferents cellers de la zona peus de cuba (PdC) en format líquid de la soca P29 com a cultiu iniciador tant per a la primera fermentació com per a la segona fermentació en ampolla (escumós). L'any 2020, INCAVI va presentar al sector una fitxa on es recull la informació bàsica d'aquesta soca, detallant les seves aplicacions habituals, característiques morfològiques i microbiològiques, propietats enològiques, condicions de conservació i finalment un exemple orientatiu d'increment de volum i adaptació al medi alcohòlic del PdC (Annex 1).

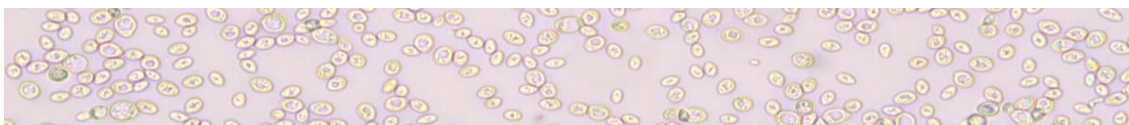


Figura 1 *Saccharomyces cerevisiae* Penedès-29 observada al microscopi

La soca P29 té molt bones aptituds fermentatives i aporta característiques organolèptiques desitjables als vins finals obtinguts. Ara bé, presenta dos inconvenients:

Per una banda, aquesta soca vínica tendeix a produir una mica més d'àcid acètic (0,30-0,40 g/L) en comparació amb altres soques de *S. cerevisiae* comercials. A INCAVI, amb la finalitat de millorar aquesta desviació enològica no desitjada, es van iniciar estudis on s'exposava la soca P29 a un procés d'evolució dirigida, per tal d'obtenir una descendent d'aquesta soca, que presentés una reducció en la producció d'àcid acètic.

Per altra banda, no es pot deshidratar, és a dir, no es pot conservar en forma de llevat sec actiu (LSA), la qual cosa impedeix una comercialització ràpida i còmoda, i per aquesta raó actualment es distribueix als diferents cellers en format de PdC en líquid. Al llarg dels anys s'han fet diversos estudis per determinar les millors condicions per deshidratar les cèl·lules d'aquesta soca i evitar una baixa viabilitat després del procés d'assecat utilitzant diversos compostos referenciats com a potenciadors de la tolerància a l'estrès per deshidratació, però sense èxit.

Fins al moment, cap dels estudis esmentats no havien pogut resoldre aquests dos inconvenients. Per tant, durant aquest treball s'han realitzat noves proves i metodologies per tal de poder disminuir la seva producció d'acidesa volàtil i conservar en el temps el PdC de la soca de llevat P29 en condicions òptimes.

1.2. ACIDESA VOLÀTIL EN ELS VINS

Durant la fermentació del most de raïm a vi, els llevats produeixen una gran quantitat de metabòlits secundaris que afecten les propietats organolèptiques del producte final. L'àcid acètic és un d'ells, i és el principal compost implicat en l'acidesa volàtil, que la conformen tots els àcids de la sèrie acètica presents en els vins, en les seves formes lliures o combinades en forma de sal (OIV 2009). L'acidesa volàtil dels vins ha de ser baixa perquè a elevades concentracions el seu descriptor aromàtic és l'olor de vinagre i aporta un gust agre, que és considerat com un defecte del vi. El llindar de percepció de l'àcid acètic varia segons la varietat de raïm i el tipus de vi. A una concentració de 0,9 g/L ja produeix una lleugera sensació a picat (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). D'acord amb l'actual legislació, l'acidesa volàtil màxima permesa en els vins blancs és d'1,08 g/L i 1,20 g/L pels negres; en alguns tipus de vins com els "icewines" i vins botrititzats es permet arribar a concentracions de fins a 2,01 g/L d'àcid acètic (OIV 2021).

L'àcid acètic es pot formar des de l'inici del procés de vinificació (raïm) fins en el producte final (vi embotellat), ja sigui a conseqüència del metabolisme dels bacteris o llevats (Taula 1). Si ens centrem en el cas dels llevats, l'àcid acètic es pot formar com a subproducte de la fermentació alcohòlica per *S. cerevisiae*. Diferents estudis sobre la producció d'àcid acètic per *S. cerevisiae* en condicions de vinificació, mostren que aquest àcid pot aparèixer principalment al principi de la fermentació alcohòlica (Alexandre *et al.*, 1994). La producció d'àcid acètic pot dependre de diferents factors, principalment de: la soca de *S. cerevisiae* utilitzada (Torrens *et al.*, 2008), la composició química del most, com el contingut en nitrogen, vitamines, concentració inicial de sucre (Radler, 1993) i les condicions de fermentació com la temperatura a la què es desenvolupa el procés (Beltran *et al.*, 2008). Els llevats vínics també produeixen àcid acètic per tal de regular l'equilibri redox com a resposta a l'estrès hiperosmòtic causat per les elevades concentracions de sucre en els mostos, especialment en aquells amb un grau Brix superior a 35° (Erasmus *et al.*, 2004).

El metabolisme de l'àcid acètic en els llevats és complex. Durant la fermentació alcohòlica, l'àcid acètic és produït com a producte intermedi de la via citosòlica de la piruvat deshidrogenasa (PDH). Aquesta via involucra la conversió del piruvat a acetaldehid mitjançant l'enzim piruvat descarboxilasa. Posteriorment, l'enzim aldehid deshidrogenasa (ALDH) oxida l'acetaldehid a acetat. A més, aquest acetat pot ser convertit en acetil-CoA mitjançant l'enzim acetil-CoA sintetasa (AACoAS) (Figura 2 basada en Vilela-Moura *et al.* 2010). Per tant, la producció de l'àcid acètic durant la fermentació depèn de l'equilibri entre l'activitat de l'enzim ALDH i el AACoAS. Per tant, els llevats amb una menor activitat enzimàtica de ALDH i una elevada activitat del AACoAS, seran els que produiran una menor concentració d'àcid acètic (Verduyn *et al.*, 1990).

Taula 1 Origen microbià de l'àcid acètic

	ORIGEN MICROBIÀ DE L'ÀCID ACÈTIC			
	Bactèries acètiques	Bactèries làctiques	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Contaminació de Llevats
Most de raïm	Oxidació de l'etanol a àcid acètic per <i>Gluconobacter spp</i> i <i>Acetobacter spp</i> en raïms afectats per <i>Botrytis cinerea</i> (Du Toit and Lambrechts, 2002)	Creixement ràpid de <i>Lactobacillus</i> en el most produint una elevada concentració d'àcid acètic en comptes d'àcid làctic (Boulton <i>et al.</i> , 1996)	-----	Producció d'àcid acètic per part de llevats no- <i>Saccharomyces</i> indígenes del propi raïm (Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> , 2006b)
Fermentació alcohòlica	<i>A. pasteurianus</i> i <i>A. liquefaciens</i> poden sobreviure durant la fermentació alcohòlica i incrementar l'acidesa volàtil dels vins (Du Toit and Lambrechts, 2002)	Bacteris làctics heterofermentatius (<i>Oenococcus oeni</i>) realitzen la fermentació heterolàctica, on els sucres són metabolitzats a àcid làctic i àcid acètic entre d'altres compostos (Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> , 2006b)	<i>S. cerevisiae</i> en un most de raïm sa amb una concentració moderada de sucres pot produir entre 0,1-0,3 g/L d'àcid acètic tot i que algunes soques en poden produir més de 1 g/L (Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> , 2006b)	Algunes espècies de llevats no- <i>Saccharomyces</i> com <i>Pichia</i> , <i>Candida</i> , <i>Hanseniaspora</i> , produeixen elevades concentracions d'àcid acètic durant l'inici de la fermentació alcohòlica (Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> , 2006b)
Fermentació malolàctica	-----	La descarboxilació de l'àcid màlic a àcid làctic produïda per bacteris làctiques (<i>Oenococcus oeni</i>) està associada a un increment en la composició volàtil dels vins (Pozo-Bayon <i>et al.</i> , 2005)	-----	-----
Vi	Augment considerable de la concentració d'àcid acètic degut a l'oxidació de l'etanol a àcid acètic per part de <i>A. pasteurianus</i> (Bartowsky and Henschke, 2008)	El creixement de <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , i <i>Leuconostoc spp</i> en el vi suposa un augment de la producció d'àcid acètic degut a la degradació de l'àcid cítric (Sponholz, 1993)	-----	Les espècies del gènere <i>Dekkera</i> i <i>Brettanomyces</i> poden produir una gran concentració d'àcid acètic durant l'emmagatzematge i envelleiment del vi (Sponholz, 1993)

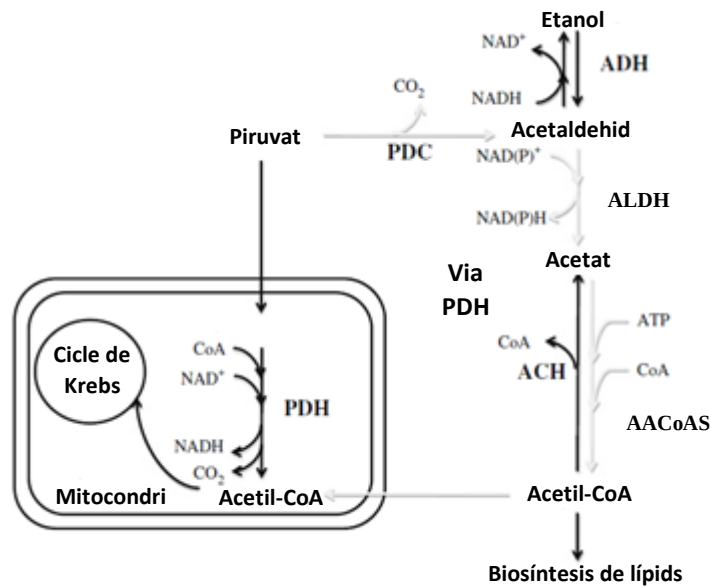


Figura 2 Reaccions i enzims principals implicats en el metabolisme de l'àcid acètic en els llevats

1.3. MUTAGÈNESI DE MICROORGANISMES

La mutagènesi fa referència a la inducció de canvis heretables (mutacions) en el material genètic (DNA) d'un organisme. Les mutacions són causades per variacions en el genotip i es poden detectar per canvis en el fenotip (en el nostre cas, reducció en la producció d'àcid acètic) de l'organisme (mutant). Les mutacions poden produir-se de forma espontània a la natura o poden ser induïdes per diferents agents mutagènics com radiacions (llum ultraviolada) o agents químics (per ex. etil metanosulfonat) o mitjançant tècniques d'enginyeria genètica, però en aquest últim cas, els organismes es consideren organismes genèticament modificats (OGM) (Pühler, 1993).

Avui dia la legislació europea no permet l'ús de OGM, per la qual cosa, no es poden utilitzar llevats OGM per a l'elaboració de vi, sent necessària la cerca d'altres metodologies per aconseguir modificacions genètiques en els llevats. Una d'elles pot ser induir en els llevats mutacions espontànies mitjançant la mutagènesi clàssica, i posteriorment seleccionar aquells llevats que han aconseguit les mutacions o característiques fenotípiques desitjades.

Mètodes de mutagènesi clàssica en llevats:

- **Llum ultraviolada**

La llum UV que engloba les longituds d'ona entre 220-300 nm, afecta el DNA formant dímers de pirimidines (Citosina i Timina) de forma aleatòria. Quan hi ha dues pirimidines successives en la mateixa hèlix del DNA, la llum UV provoca la formació de ponts d'hidrogen entre elles creant un plec en la cadena fet que implica la desunió de les dues cadenes que formen la doble hèlix (Figura 3). Els dímers que es generen amb més freqüència són els de timines (Pühler, 1993).

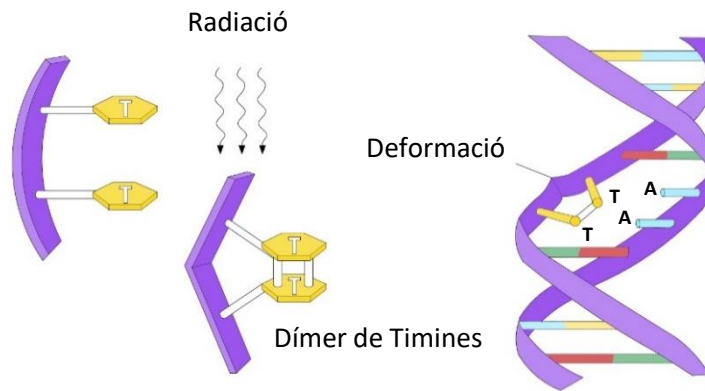


Figura 3 Formació de dímers de Timines en el DNA per l'acció de la radiació UV

- **Etil metanosulfonat**

L'etil metanosulfonat (EMS) és un agent químic alquilant altament mutagènic (Figura 4), el qual afegeix radicals d'etil de forma aleatòria a les bases nitrogenades Adenina, Timina, Citosina i Guanina, les quals formen ponts d'hidrogen entre elles donant lloc a la doble hèlix de DNA. Els radicals d'etil reaccionen amb més freqüència amb la base nitrogenada Guanina.

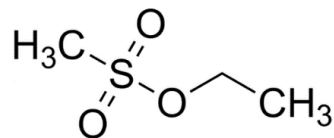


Figura 4 Estructura química del etil metanosulfonat

La Citosina forma unions amb la Guanina mitjançant tres ponts d'hidrogen. En aplicar el tractament amb l'EMS la Guanina és alquilada pel grup etil formant la molècula O-6-Etilguanina (Figura 5). A conseqüència d'aquesta modificació química, la Guanina pot formar ponts d'hidrogen amb la Timina. Després de la replicació del DNA, té lloc la substitució de parells de bases. La combinació inicial de Citosina-Guanina és convertida en un parell de Timina-Adenina (Figura 6). Aquests canvis de parells de bases poden provocar una modificació o un error en la transcripció dels gens, els quals al ser transcrits no poden generar la proteïna o enzim que codificaven, provocant una alteració en el funcionament cel·lular de l'organisme. A més a més, l'EMS pot generar mutacions puntuals i polimorfismes d'un sol nucleòtid en els genomes (Pühler, 1993).

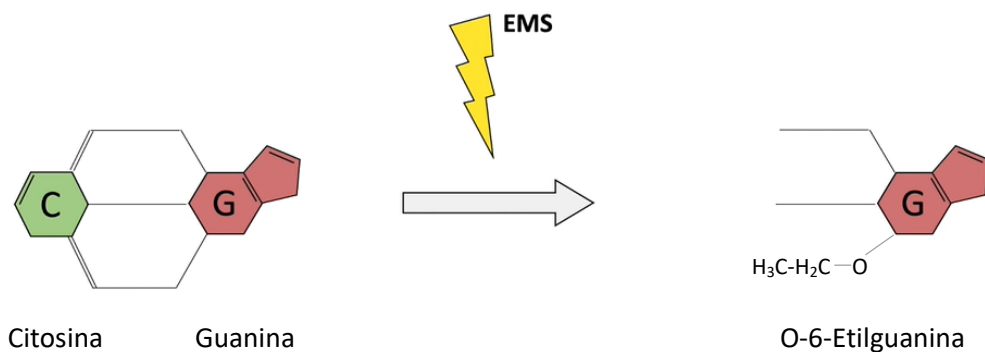


Figura 5 Efecte del EMS en la base nitrogenada Guanina formant O-6-Etilguanina

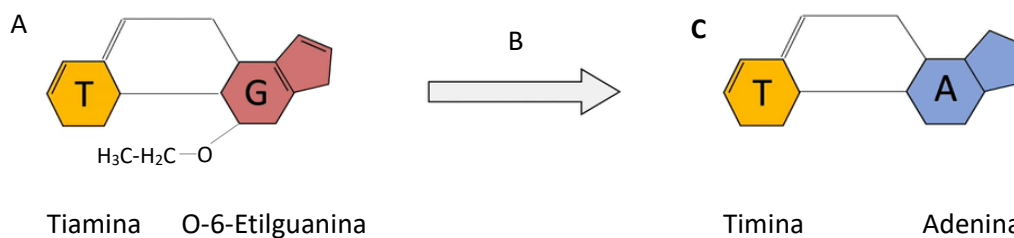


Figura 6 A) Formació de dos ponts d'hidrogen entre la Tiamina i la O-6-Etilguanina. B) Replicació del DNA. C) Substitució de O-6-Etilguanina per una Adenina

1.4. TÈCNiques DE CONSERVACIÓ DE MICROORGANISMES

En l'actualitat les característiques metabòliques de diferents microorganismes són explotades en diferents sectors tant de salut, medi ambient, indústries alimentàries i agrícoles entre d'altres (Beach *et al.*, 2002). Per tant és necessari tenir les diferents col·leccions de microorganismes ben conservades per ser utilitzades a posteriori garantint així, la seva disponibilitat (Day *et al.*, 1999). Quan es duu a terme la conservació d'un microorganisme s'han d'aconseguir tres objectius (Juarros *et al.*, 2000):

1. Que el cultiu conservat sigui pur, evitant que es produeixin contaminacions durant el procés de conservació.
2. Que durant el temps de conservació sobrevisquin almenys el 70-80% de les cèl·lules.
3. Que les cèl·lules conservades siguin genèticament estables en el temps.

S'han descrit diversos mètodes de conservació de microorganismes, amb els quals es vol mantenir el cultiu viable i amb un mínim de canvis en el seu genoma, és a dir, que siguin genèticament iguals al cultiu original. La majoria de mètodes de preservació aconseguixen reduir el ritme metabòlic dels microorganismes per retenció de nutrients, aigua i oxigen; per reducció de la temperatura de conservació; o per la combinació d'ambdues (Doyle *et al.*, 1999).

Els mètodes de conservació per microorganismes s'agrupen en tres grans grups diferents depenent del temps de conservació i les característiques fisiològiques de la soca a conservar: mètodes a llarg o curt termini i mètodes alternatius (Arencibia *et al.*, 2008). Ens centrarem en els mètodes a llarg termini que són la liofilització i la congelació, i en el cas dels llevats també la deshidratació. Aquests mètodes garanteixen al màxim l'estabilitat genètica en evitar la reproducció dels microorganismes que es volen conservar.

- **Conservació per deshidratació (LSA)**

Els llevats secs actius (LSA) són normalment els més utilitzats en el món del vi com a iniciadors de fermentació, ja que, asseguren la puresa i l'estabilitat genètica de la soca a temperatura ambient i redueixen costos de transport i emmagatzematge.

En el procés de producció dels LSA mitjançant la deshidratació de les cèl·lules, els llevats són prèviament seleccionats de diferents regions vitícoles del món en base d'una sèrie de característiques enològiques desitjades (Martini, 1993):

1. Capacitat per realitzar fermentacions vigoroses.
2. Fermentar tots els sucres presents en el most.
3. Bona tolerància a l'etanol.
4. Tolerància als nivells usals de SO₂ utilitzats durant el procés de vinificació.
5. No producció d'aromes desagradables.
6. Baixa producció d'acidesa volàtil.
7. Tolerància a les temperatures usals de fermentació.
8. Baixa producció d'escuma.
9. Capacitat de floculació.

A part d'aquests requisits i d'altres, és necessari que el llevat tingui una bona eficiència a l'hora de produir biomassa en condicions d'aerobiosis i sobreviure a llargs períodes d'emmagatzematge (Pretorius, 2000).

Un cop el llevat és seleccionat, normalment es fan assajos per produir-lo en forma de LSA. En aquest procés, primer es fan créixer les cèl·lules en volums petits per generar un precultiu el qual és reinoculat al cap de 24-48 hores a un bioreactor de major volum en condicions de *fed-batch*. Aquestes condicions són òptimes per a la producció de biomassa, on el medi de cultiu conté elevades concentracions de nutrients, però baixes de glucosa, la qual és addicionada de forma constant en el medi. Paral·lelament s'insuflen altes concentracions d'oxigen, per provocar l'activació del metabolisme respiratori del llevat aconseguint una elevada producció de biomassa i una baixa o nul·la producció d'etanol (Bauer and Pretorius, 2000). Un cop obtinguda la biomassa desitjada, entre 2×10^{10} cèl·lules/ml, les cèl·lules de llevat són concentrades mitjançant la centrifugació, rentades i assecades. Durant el procés d'assecat es produeix una reducció del contingut d'aigua del 70 al 8% (Dupont *et al.*, 2014).

Durant el procés de rentat i assecat, les cèl·lules es troben sotmeses a elevats nivells d'estrès, per la qual cosa és necessari l'ús de trehalosa, proteïnes de resposta a l'estrès i constituents específics de membrana per minimitzar els danys cel·lulars (Van Dijck *et al.*, 1995, Sales *et al.*, 2000).

Un cop finalitzada la dessecació, els llevats són empaquetats al buit per poder-se comercialitzar com a LSA als diferents cellers. Les cèl·lules com a LSA poden romandre viables llargs períodes de temps, ja que no són metabòlicament actives.

- **Conservació per liofilització**

La liofilització consisteix en l'eliminació de l'aigua d'una substància congelada per sublimació del gel al buit. Aquest procés consta de tres etapes les quals es realitzen en liofilitzadors (Rudge, 1998):

1. Precongelació del producte.
2. Assecat primari amb el qual s'elimina la major part de l'aigua per sublimació.
3. Assecat secundari amb el qual s'acaba d'extreure l'aigua encara present en el cultiu.

Les cèl·lules no poden créixer a causa de la manca d'aigua en el medi en què es troben. A més, per protegir les cèl·lules dels processos de congelació i assecat és necessari que les cèl·lules estiguin en un medi de preservació un cop acabat el procés de liofilització. Normalment, el medi de preservació conté alts nivells de sèrum, proteïnes, aminoàcids, carbohidrats o llet descremada i crioprotectors (Onions, 1998).

Tenir èxit en el procés de liofilització per conservar microorganismes en el temps, dependrà de les característiques fisicoquímiques del medi de suspensió, del tipus de microorganisme, de l'estat fisiològic i condicions del cultiu, i de la concentració de microorganismes, entre d'altres (Snell, 1997).

Aquest mètode és un dels més eficaços per a la conservació de molts microorganismes i el més convenient per a la producció i distribució massiva de cultius, com és el cas de molts cultius de bacteris làctics en el sector vínic. Tot i això, el procés és complex i car, ja que és necessari disposar d'un sistema de buit que no tots els laboratoris en disposen.

- **Conservació per congelació**

Les cèl·lules que es volen conservar es congelen en suspensió en un líquid, juntament amb un agent crioprotector i es guarden a temperatures inferiors a zero graus centígrads, fent que l'aigua es congeli. Com que les cèl·lules no disposen d'aigua líquida no poden desenvolupar-se i reproduir-se. Si es volen recuperar les cèl·lules, només cal augmentar la temperatura per tal que l'aigua es descongeli (Gherna, 1998). La congelació té l'inconvenient de requerir l'equipament necessari per dur-la a terme, a més a més, hi ha el perill de que es produeixi alguna variació en el sistema elèctric i la temperatura d'emmagatzematge augmenti.

Factors que afecten la viabilitat i estabilitat de les cèl·lules conservades per congelació:

- **Edat de les cèl·lules.** És convenient utilitzar cèl·lules que hagin entrat en la fase estacionària de la corba de creixement, ja que en aquest estadi, tenen una major resistència a condicions adverses (Hawksworth *et al.*, 1997).
- **Velocitat de congelació i descongelació.** Disminuir el temps de congelació com el de descongelació, ja que aquestes dues accions generen estrès a les cèl·lules provocant danys fisiològics. El dany cel·lular causat durant la congelació és degut a la formació de cristalls de gel i a la deshidratació de les cèl·lules. L'impacte del dany dependrà de la velocitat de congelació de la mostra i de si predomina la formació de cristalls de gel intracel·lulars o extracel·lulars (Dumont *et al.*, 2004). Per una banda, a velocitats lentes de congelació els cristalls de gel extracel·lulars es formen més ràpidament i són majoritaris, l'aigua de l'interior de les cèl·lules es transporta cap a l'exterior, produint-se d'aquesta manera danys cel·lulars per deshidratació intracel·lular. Per altra banda, a velocitats ràpides, la congelació de l'aigua intracel·lular es produeix més ràpidament i els cristalls de gel intracel·lulars són els principals responsables de la major part del dany cel·lular (Bayliak *et al.*, 2018).

Durant el procés de descongelació es genera estrès per la formació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS). És convenient realitzar la descongelació a 37°C (Arencibia *et al.*, 2008).

- **Temperatura d'emmagatzematge.** Les temperatures més baixes afavoreixen la viabilitat i l'estabilitat genètica (Nakase, 1996). Per congelar les cèl·lules es pot utilitzar nitrogen líquid que té una temperatura de -195°C o congeladors que puguin arribar a temperatures de -70°C (Hawksworth, 1997). En utilitzar congeladors, s'han de preparar lots de diversos tubs per cada microorganisme i utilitzar un tub per a cada ocasió, per evitar que les cèl·lules es congelin i descongelin diverses vegades.
- **Agents crioprotectors.** Protegeixen les cèl·lules del dany que poden patir durant el procés de congelació. Existeixen molts compostos que es poden utilitzar com a crioprotectors, però el més utilitzat és el glicerol. També tenen un efecte crioprotector el dimetilsulfòxid, la llet descremada i diferents carbohidrats com la glucosa, la lactosa, la sacarosa, inositol, la trehalosa, entre d'altres (Malik, 1996; Hubalek, 2003) .

2. OBJECTIUS

L'objectiu d'aquest estudi és obtenir un descendent de la soca de *Saccharomyces cerevisiae* P29 que presenti una reducció en la producció d'àcid acètic i poder conservar en el temps el peu de cuba d'aquesta soca. Els objectius específics són:

- Obtenir una variant de la P29 que produeixi una menor concentració d'acidesa volàtil mitjançant tècniques clàssiques de mutagènesis tant físiques (UV) com químiques (EMS).
- Conservar de forma estable en el temps el peu de cuba de la soca vínica P29, sense que la viabilitat i la seva puresa es vegi compromesa, mitjançant l'ús de diferents crioprotectors durant el procés de congelació.

3. MATERIALS I MÈTODES

En aquest estudi es van dur a terme dues línies de treball per tal d'assolir els objectius establerts anteriorment.

3.1. REDUCCIÓ DE L'ACIDESA VOLÀTIL

Soca de llevat i medis

El llevat utilitzat per fer l'estudi va ser la soca de *S. cerevisiae* Penedès-29 aïllada per INCAVI. En totes les experiències la soca de llevat es va fer créixer en 100 ml de most blanc pasteuritzat de la varietat macabeu ($^{\circ}$ Brix = 16,4; acidesa total (AT) = 4,8 g/L; pH = 3,12, grau alcohòlic probable (GAP) = 9,6 % v/v, nitrogen fàcilment assimilable (NFA) = 110 mg/L) a temperatura ambient i en agitació constant (100 rpm) durant dos dies fins a la fase estacionària de creixement.

Per a realitzar la selecció dels llevats que presentessin una reducció de la producció d'àcid acètic, es va utilitzar medi mínim suplementat amb carbonat càlcic (50 g/L glucosa, 5 g/L extracte de llevat, 18 g/L agar i 5 g/L carbonat càlcic). El creixement dels mutants es va fer en anaerobiosis mitjançant el sistema GasPak (BD, Nova Jersey, USA) (Figura 7) a 28°C durant almenys sis dies, per tal que els àcids produïts pels llevats reaccionessin amb el carbonat càlcic present en el medi, fent-lo precipitar donant lloc a la formació d'un halo al voltant de les colònies.



Figura 7 Plaques de medi mínim suplementades amb carbonat càlcic dins de les gerres d'anaerobiosi

Mutagènesi amb llum UV i EMS i aïllament dels mutants

Per a fer l'anàlisi del ràtio de supervivència de la soca P29 a la mutagènesi amb UV, es van realitzar dilucions seriades amb tampó Ringer (Scharlab, Barcelona, Espanya) d'un cultiu en fase estacionària de la soca P29. Es va sembrar la dilució (-5) en diverses plaques de medi mínim suplementat amb carbonat càlcic. Les plaques es van col·locar sota la llum UV de la cambra de flux laminar Telstar Mini H (Telstar, Barcelona, Espanya) a una distància de 31 cm i es van irradiar en diversos períodes de temps: 0 (control), 5, 10, 12, 15, 20, 22, 25, 30 i 60 segons. Després de la irradiació, les plaques es van incubar a 28°C durant un mínim de 6 dies en anaerobiosis. Finalment, es van recomptar les colònies per determinar el ràtio de supervivència del llevat després de la irradiació amb la llum UV respecte al cultiu control sense irradiar, seguint el protocol descrit per Hashimoto *et al.* (2004).

Per a l'anàlisi del ràtio de supervivència mitjançant la mutagènesi amb EMS (seguint el protocol descrit per Cordente *et al.* (2009)), es va determinar la població (cèl·lules/ml) del cultiu crescut en el most blanc pasteuritzat i es van rentar les cèl·lules dues vegades amb tampó fosfat sòdic 50 mM (pH 7). Després, les cèl·lules es van resuspendre en 1 ml del mateix tampó. A les suspensions se'ls hi van addicionar diferents concentracions (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8%) d'EMS (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) i es van deixar incubar a 30°C durant 30 minuts en agitació constant. Per aturar la mutagènesi es va addicionar la mateixa concentració (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8%) de tiosulfat sòdic (Panreac AppliChem, Barcelona, Espanya) al 10% en cadascun dels tubs. Després les cèl·lules es van rentar dues vegades amb aigua, es van fer dilucions amb tampó Ringer i es va sembrar les dilucions (-3, -4, -5, -6 i -7) en les plaques de medi mínim suplementat amb carbonat càlcic en les mateixes condicions que la mutagènesi amb llum UV.

Finalment, es van seleccionar aquelles colònies de llevats que van presentar una reducció qualitativa de l'halo generat en la placa en comparació les cèl·lules sense mutagenitzar, diferenciant-les segons la morfologia de les colònies i el temps d'irradiació de la llum UV o la concentració d'EMS emprada.

Caracterització moleculars dels aïllats (RFLP-mtDNA i PCR dels elements delta)

Es van caracteritzar molecularment els aïllats seleccionats mitjançant l'estudi del polimorfisme de longitud dels fragments de restricció del DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) (Guillamón *et al.*, 1994) i l'amplificació dels elements Delta (Legras *et al.*, 2003) (Veure Annex 2 i 3). D'aquesta manera es va comprovar quins aïllats presentaven el mateix perfil molecular que la soca P29 d'origen, descartant aquells que presentessin perfils diferents.

Screening dels aïllats

Un cop seleccionats els aïllats que qualitativament presentaven menor formació d'halo en el medi mínim i que presentaven el mateix perfil molecular que la soca P29, es va procedir a fer un primer "*screening*" per determinar la producció d'àcid acètic i la seva capacitat de consumir de sucres en condicions de creixement en most. L'assaig de cada mutant es va realitzar en un únic erlenmeyer amb 100 ml de most blanc pasteuritzat, en agitació (100 rpm) i a temperatura ambient durant set dies o fins al consum total de sucres, inoculat una població inicial d' 1×10^6 cell/ml.

Es va fer un seguiment de la producció d'àcid acètic i del consum de sucres (glucosa + fructosa) al llarg de la fermentació per mètodes enzimàtics. Mitjançant l'equip Miura 200 (I.S.E Srl, Guidonia Montecelio, Itàlia) es va fer la determinació de l'àcid acètic (TDI, Barcelona, Espanya) i la concentració de sucres (glucosa + fructosa) (GAB, Barcelona, Espanya) restants en el most. Els controls es van fer de forma periòdica fins que la soca P29 control, és a dir, sense mutagenitzar, va arribar a una concentració inferior a 0,1 g/L de sucre.

Es van seleccionar tots aquells aïllats que van esgotar tots els sucres presents en el most en el mateix temps que la soca P29 control. Tots aquells que no van arribar a consumir la totalitat dels sucres presents en el most van ser descartats. També es van descartar aquells aïllats que van tenir una producció d'àcid acètic superior a la produïda per la soca P29 control.

Microvinificacions

Per avaluar la capacitat fermentativa i la producció d'àcid acètic dels aïllats finalment seleccionats, es van realitzar microvinificacions en 250 ml de most per triplicat. Es va utilitzar most blanc pasteuritzat, el qual va ser suplementat amb sucre fins a una concentració de 200 g/L, una font de nitrogen (Nutrient Vit Nature a 4 g/Hl, Lallemant, Montreal, Canadà) i metabisulfit a una concentració de 30 mg/L de SO₂ teòrics. La composició química del most un cop suplementat es mostra a la Taula 2.

Taula 2 Anàlisi del most blanc pasteuritzat de la varietat macabeu suplementat

Sucres (g/L)	Densitat (g/L)	Grau Brix	GAP (% v/v)	pH	AT (g/L)	Àc. màlic (g/L)	Àc. làctic (g/L)	Àc. acètic (g/L)	NFA (mg/L)	SO ₂ Total (mg/L)
194,2	1082,8	19,5	11,5	3,1	4,8	1,3	0,04	0,03	120	44

Cada fermentador va ser inoculat a una població inicial de 3×10^6 cell/ml utilitzant com a inòcul un precultiu de cada un dels aïllats a avaluar. Les fermentacions es van realitzar a una temperatura constant de 20°C.

El seguiment de les fermentacions es va dur a terme per pèrdua de pes dels fermentadors. Un cop es va detectar una relentització en la pèrdua de pes, es va procedir a determinar la concentració de sucres mitjançant l'equip enzimàtic Miura. La fermentació es va donar per finalitzada quan la concentració de sucres va ser inferior a 2 g/L. Durant el transcurs de les fermentacions també es va determinar la producció d'àcid acètic de cadascun dels aïllats, utilitzant el mateix equip.

Un cop acabades les fermentacions, es va fer l'anàlisi dels paràmetres fisicoquímics bàsics dels vins obtinguts, determinant: grau alcohòlic (% v/v) mitjançant l'equip WineScan (Foss Iberia S.A., Barcelona, Espanya), els sucres residuals (g/L), àcid acètic (g/L), àcid màlic (g/L) i àcid làctic (g/L) utilitzant l'equip Miura i pel que fa a l'acidesa total (g/L) i el pH es van determinar amb l'equip CRISON Compact Titrator (Crison instruments S.A., Barcelona, Espanya).

Finalment, es va sembrar una estria en agar-Sabouraud dels llevats presents a final de FAL en cadascun dels fermentadors per tal de comprovar el seu perfil molecular i poder conservar-los amb criovials a -60°C.

Anàlisi estadístic

Els resultats obtinguts de les anàlisis fisicoquímiques de les microvinificacions van ser tractats estadísticament per avaluar si entre ells eren estadísticament semblants o no. Per a fer-ho es va dur a terme una anàlisi T-test amb una $p=0,05$.

3.2. CONSERVACIÓ PEU DE CUBA S. *CEREVISIAE* P29

Preparació del peu de cuba

Per tal d'obtenir el PdC de la soca de llevat P29 per ser posteriorment conservat al llarg del temps, es va inocular most blanc pasteuritzat (densitat inicial 1067 g/L) amb cultiu fresc de la soca P29 pura. Es va mantenir en agitació durant tres dies fins a aconseguir una densitat al voltant de 1025-1030 g/L. Després, el PdC es va repartir en tubs falcons de 45 ml i es van concentrar les cèl·lules fins a 1/3 del volum inicial (15 ml) mitjançant centrifugació durant 5 minuts a 12000 rpm. A cadascun dels tubs se'ls hi va addicionar la concentració determinada de cada crioprotector avaluat: glicerol (Panreac AppliChem, Barcelona, Espanya), àcid ascòrbic (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), llet desnatada en pols (Nestle Sveltesse, Vevey, Suïssa) i Gomasol SEDA, compost per goma aràbiga, manoproteïnes i àcid ascòrbic (Agrovin, Vilafranca del Penedès, Espanya) (Taula 3); i es van homogeneïtzar amb el vòrtex. Finalment, es va al·liquotar 1 ml de cada tub falcon en microvials de 2 ml per ser congelats a -20°C i -60°C.

Taula 3 Descripció dels crioprotectors avaluats i les concentracions provades independentment

CRIOPROTECTORS				
	Glicerol	Llet desnatada en pols	Goma Sol SEDA	Glicerol + Àcid ascòrbic
CONCENTRACIONS	0%	0%	0 L/Hi	0% + 0g/L
				0% + 2,5 g/L
	2,5%	5%	100 ml/Hi	0% + 5 g/L
				5% + 2,5 g/L
				5% + 5g/L
	5%	7,5%	300 ml/Hi	7,5% + 2,5 g/L
	7,5%	10%		7,5% + 5 g/L
		10%	12%	300 ml/Hi + 10% llet
				10% + 5 g/L

Seguiment de la viabilitat en el temps

La viabilitat cel·lular del PdC de la soca P29 es va avaluar durant dos mesos de conservació a -20°C i -60°C per duplicat, mitjançant el recompte d'unitats formadores de colònies per mil·lilitre (ufc/ml) en medi de cultiu agar Sabouraud (Scharlab, Barcelona, Espanya).

Concretament, es va determinar la viabilitat abans de congelar i un cop transcorregudes una, dues, quatre, sis i vuit setmanes de conservació. En cada punt de mostreig, es van descongelar les mostres a 37°C, es van realitzar dilucions seriades amb tampó Ringer i es van sembrar en agar Sabouraud les dilucions per a obtenir un creixement d'entre 30 - 300 ufc/placa.

Finalment, es va determinar la puresa del PdC mitjançant la tècnica molecular d'amplificació dels Elements Delta (δ). L'amplificació es va dur a terme directament de 8 colònies escollides a l'atzar (Legras *et al.*, 2003) (Veure Annex 2).

4. RESULTATS I DISCUSIÓ

4.1. REDUCCIÓ DE L'ACIDESA VOLÀTIL

Mutagènesi clàssica per irradiació de llum UV i aïllament dels mutants

Al sotmetre la soca de llevat *S. cerevisiae* P29 a la mutagènesi per irradiació de llum UV durant diferents temps d'exposició (0 - 60 segons), es va determinar el seu ràtio de supervivència (Figura 8).

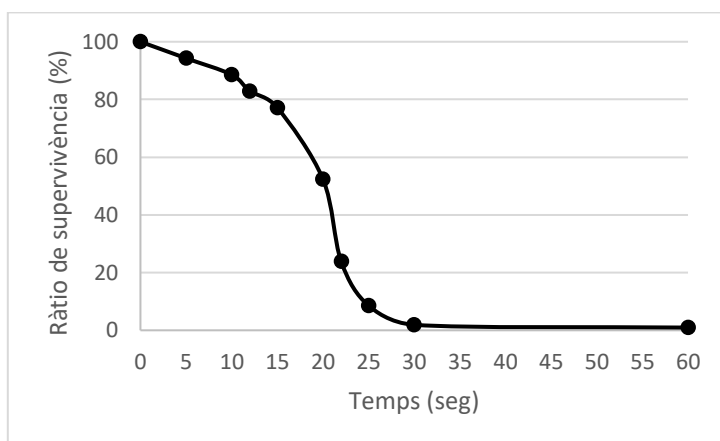


Figura 8 Ràtio de supervivència de la soca P29 a diferents temps d'exposició a la llum UV

Mitjançant el recompte de colònies viables en placa, de medi mínim suplementades amb carbonat càlcic, en els diferents temps d'irradiació, es va avaluar la mortalitat provocada per la llum UV. En la Figura 8 es pot observar que el temps òptim d'irradiació de la llum UV per aconseguir una mortalitat del 50% i afavorir l'aparició de mutacions espontànies en la soca de llevat P29 va ser de 20 segons. L'exposició a la llum UV durant un temps d'entre 5 i 12 segons no va produir un descens notable en la viabilitat cel·lular en placa, on la supervivència va disminuir un 20% respecte a la placa sense irradiació (control). A partir de 20 segons d'irradiació la supervivència cel·lular es va veure reduïda dràsticament provocant un creixement de només el 10% de la població inicial (25 segons d'irradiació), fent estadísticament improbable l'aparició i detecció d'algun mutant. En períodes d'irradiació més llargs, d'entre 30 segons i un minut, l'efecte de la llum UV produeix la mortalitat de totes les cèl·lules presents en el cultiu sembrat en placa. Per aquesta raó, es va escollir el rang de temps d'irradiació entre 12-25 segons per tal d'afavorir l'aparició de mutants que presentessin una reducció en la producció d'àcid acètic qualitativa en placa.

D'un total aproximat de 2500 colònies obtingudes durant la mutagènesi amb llum UV (irradiació 12-25 segons), i després d'haver avaluat qualitativament la presència/absència o reducció de l'halo generat per la precipitació del carbonat càlcic en reaccionar amb els àcids produïts pels llevats en creixement en anaerobiosi, se'n van aïllar fins a 59 colònies que presentaven absència o reducció qualitativa de l'halo (colònies encerclades), en comparació a les colònies de P29 control (Figura 9). Els diferents aïllats es van classificar segons el temps d'exposició sota la llum UV i la seva morfologia (Annex 4).

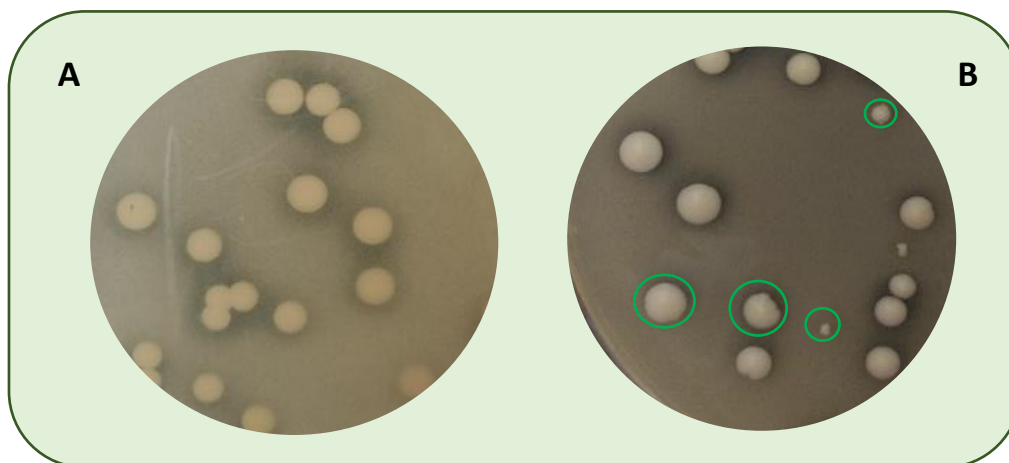


Figura 9 A) Placa de cultiu amb medi mínim suplementat amb carbonat càlcic sense mutagenitzar B) Placa de cultiu amb medi mínim suplementat amb carbonat càlcic després de 20 segons d'irradiació amb llum UV

Mutagènesis clàssica mitjançant l'agent químic EMS i aïllament dels mutants

Paral·lelament, també es va realitzar la mutagènesi clàssica mitjançant l'agent químic alquilant etil metanosulfonat (EMS), determinant el ràtio de supervivència de la soca de llevat P29 en ser tractada amb aquest compost (Figura 10).

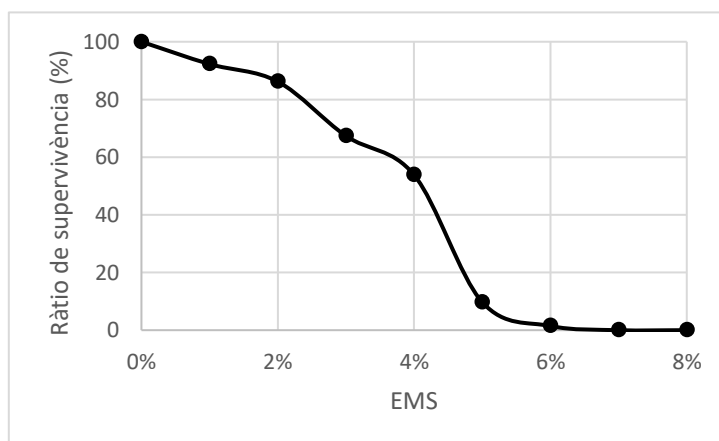


Figura 10 Ràtio de supervivència de la soca P29 a diferents concentracions d'EMS

Després de deixar créixer les colònies, tractades amb les diferents concentracions d'EMS (0 – 8%), en les plaques de medi mínim suplementades amb carbonat càlcic, es va avaluar la viabilitat cel·lular recomptant les colònies crescudes en placa. Es va determinar que la concentració d'EMS òptima per obtenir el 50% de la població inicial viable després del tractament era del 4%. L'aplicació d'una concentració d'EMS de l'1 i el 2% no va mostrar un descens significatiu de la població, disminuint un 20% respecte de la població cel·lular inicial. A l'aplicar un 3% d'EMS, la viabilitat cel·lular va començar a disminuir notablement fins a arribar al 65% de supervivència. A partir de l'aplicació del 4% d'EMS (50% viabilitat), la població va disminuir dràsticament fins a una supervivència del 10 i 1,5% amb l'ús del 5% i 6% d'EMS, respectivament. Finalment, amb les concentracions del 7 i 8% d'EMS la soca de llevat P29 va perdre totalment la seva viabilitat. Per aquesta raó, es van escollir les concentracions d'EMS d'entre el 4 – 6% per tal d'obtenir possibles mutants que presentessin una disminució en la producció d'àcid acètic durant la fermentació alcohòlica.

De l'ordre d'unes 1500 colònies obtingudes en la mutagènesi mitjançant l'agent químic EMS (4 - 6%), i després d'haver avaluat qualitativament la presència/absència o reducció de l'halo generat per la precipitació del carbonat càlcic en reaccionar amb els àcids produïts pels llevats en creixement en anaerobiosi, se'n van aïllar fins a 24 colònies que presentaven absència o reducció qualitativa de l'halo, en comparació a les colònies de P29 control. Els diferents aïllats es van classificar segons la concentració d'EMS utilitzada i la morfologia de les colònies obtingudes (Annex 5).

Els ràtios de supervivència obtinguts mitjançant les dues tècniques de mutagènesi clàssica, llum UV com EMS, van ser semblants als obtinguts en altres estudis duts a terme per Hashimoto *et al.* (2004), Cordente *et al.* (2009) i Cordente *et al.*, (2012).

Comprovació del perfil molecular dels aïllats (RFLP-mtDNA i elements Delta)

De les 59 colònies aïllades després de la irradiació amb llum UV i les 24 aïllades després del tractament amb l'EMS, es van comprovar els perfils moleculars de cadascun dels aïllats mitjançant les tècniques moleculars, RFLP-mtDNA i l'amplificació dels elements Delta.

Dels 59 i 24 aïllats obtinguts mitjançant la irradiació amb la llum UV i l'agent químic EMS, se'n van descartar 25 i 4 respectivament, a causa de la variació del perfil molecular en una o en les dues tècniques moleculars utilitzades.

A tall d'exemple, l'aïllat número 52 obtingut per irradiació amb llum UV, va mostrar un perfil diferent del de la soca P29 mitjançant la tècnica RFLP-mtDNA. En canvi, amb la tècnica molecular d'amplificació dels elements delta va donar el mateix perfil que la soca P29. Per tant, aquest aïllat va ser descartat perquè no va conservar el perfil molecular en una de les dues tècniques emprades després de ser sotmès a la mutagènesi amb llum UV. D'altra banda, els aïllats 49 i 50 van mostrar el perfil de la soca P29 mitjançant la tècnica RFLP-mtDNA, però diferent mitjançant l'amplificació dels elements deltes, per aquesta raó també van ser descartats (Figura 12).

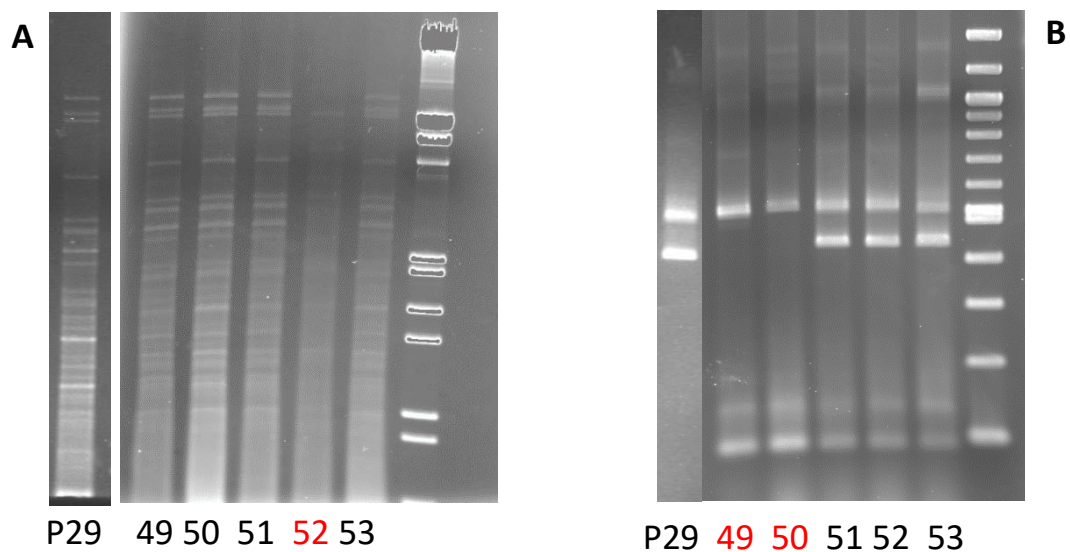


Figura 12 A) Perfils obtinguts de la digestió del mtDNA de la soca de llevat *S. cerevisiae* P29 i els aïllats 49-53 B) Perfils obtinguts de l'amplificació d'elements delta de la soca de llevat *S. cerevisiae* P29 i els aïllats 49-53

Screening dels mutants aïllats

○ Mutagènesi amb llum UV

A partir de les 34 colònies que van presentar absència o una disminució qualitativa de l'halo i que preservaven el perfil molecular de la soca P29, es va fer un primer *screening* per avaluar la capacitat de consum de sucres segons les diferents morfologies de les colònies aïllades (Figura 13).

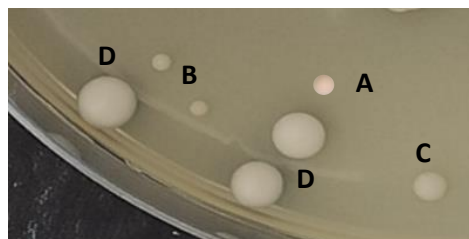


Figura 13 Diferents morfologies dels aïllats (UV): A) Colònia petita groga B) Colònia petita blanca C) Colònia mitjana D) Colònia gran

Concretament, es va avaluar un aïllat representatiu de cada classificació per aspecte colonial, de tres morfologies diferents: aïllat 7 (A), aïllats 23 i 57 (B) i aïllat 15 (C). La morfologia de colònia gran (D) no es va avaluar en aquest primer *screening* a causa de la seva similitud a les colònies de la placa control de la soca P29, i en aquest cas es van realitzar directament en els següents cribratges.

Dels quatre aïllats, només el 15 va ser capaç de consumir la totalitat dels sucres presents en el most al mateix ritme que la soca P29 control, en canvi els altres tres no van ser capaços de consumir-los totalment. Per aquesta raó es van descartar aquells aïllats amb morfologies diferents de colònies mitjanes i grans, ja que es volia conservar la capacitat fermentativa de la soca P29. Dels 59 aïllats dels quals es va partir en un inici, després d'eliminar aquells amb un perfil diferent del de la soca de *S. cerevisiae* P29 i aquells aïllats amb morfologia de colònia petita, ens vam quedar amb un total de 14 aïllats: 13, 15, 16, 17, 26, 27, 31, 37, 43, 53, 54, 55, 58, 59.

A continuació, aquests 14 aïllats van ser avaluats per determinar la seva capacitat per consumir tots els sucres i la seva producció d'àcid acètic en 100 ml de most blanc pasteuritzat en agitació constant (100 rpm). El seguiment es va fer durant set dies que va ser el temps que va tardar la soca P29 en consumir tots els sucres (Taula 4).

Finalment, es van seleccionar aquells aïllats que van aconseguir arribar a una concentració de sucres residuals inferior a 0,1 g/L i una acidesa volàtil inferior a la produïda per la soca P29 en el mateix temps (7 dies). Dels 14 aïllats tastats, es van seleccionar 8 d'ells, concretament els números: 13, 15, 16, 26, 27, 53, 54 i 55, amb els quals es van fer posteriorment microvinificacions. Destacar que tot i que l'aïllat 27 va presentar una acidesa volàtil de 0,10 g/L, es va seleccionar, ja que es va considerar que podria ser degut a la incertesa del mètode d'anàlisi de l'equip ($\pm 0,03$ g/L).

Taula 4 Avaluació de la capacitat de consum de sucres i producció d'acidesa volàtil dels aïllats obtinguts per mutagènesi amb llum UV. En color verd es mostren els aïllats seleccionats i en gris els descartats. En color crema la soca P29

AÏLLAT	Sucre residual (g/L)	Àc. acètic (g/L)
13	0,1	0,02
15	0,06	0,03
16	0,1	0,03
17	43	0,05
26	0,1	0,04
27	0,1	0,10
31	20,9	0,08
37	58,1	0,07
43	11,7	0,04
53	0,07	0,02
54	0,04	0,04
55	0,08	0,04
58	1,05	0,06
59	1,47	0,03
P29	0,1	0,05

○ **Mutagènesi amb EMS**

A partir dels 20 aïllats que van presentar absència o disminució qualitativa de l'halo i amb el mateix perfil molecular de la soca P29, es van seleccionar aquells que van tenir una morfologia de colònia mitjana, ja que, com es va veure amb els aïllats obtinguts mitjançant la mutagènesi amb llum UV, les colònies petites i "minis" i amb coloració diferent de blanca, no conservaven el poder fermentatiu de la soca P29, per aquesta raó també en aquest cas, es van descartar. Per tant, es va continuar l'estudi amb 8 aïllats anomenats: A, C, F, L, M, P, Q i R, amb els quals es va procedir a fer l'*screening* per tal d'avaluar la seva capacitat de consum de sucres i la producció d'àcid acètic en 100 ml de most blanc pasteuritzat en agitació constant (100 rpm). Com en el cas anterior, el seguiment es va fer durant 7 dies, temps necessari per a que la soca P29 esgotés tots els sucres (Taula 5).

Taula 5 Avaluació de la capacitat de consum de sucres i producció d'acidesa volàtil dels aïllats obtinguts per mutagènesi amb EMS. En color verd es mostren els aïllats seleccionats i en gris els descartats. En color crema la soca P29

AÏLLAT	Sucre residual (g/L)	Àc. acètic (g/L)
A	0,07	0,06
C	0,02	0,04
F	0,00	0,02
L	0,00	0,02
M	0,06	0,07
P	7,17	0,01
Q	0,04	0,03
R	0,09	0,22
P29	0,1	0,05

Un cop realitzat l'*screening* es van seleccionar aquells aïllats que van aconseguir arribar a una concentració de sucres residuals inferior a 0,1 g/L i una acidesa volàtil inferior a la produïda per la soca P29 en el mateix temps (aproximadament set dies). Dels 24 aïllats inicials es va continuar treballant amb 4 d'ells, concretament els anomenats com C, F, L i Q, avaluats posteriorment en microvinificacions.

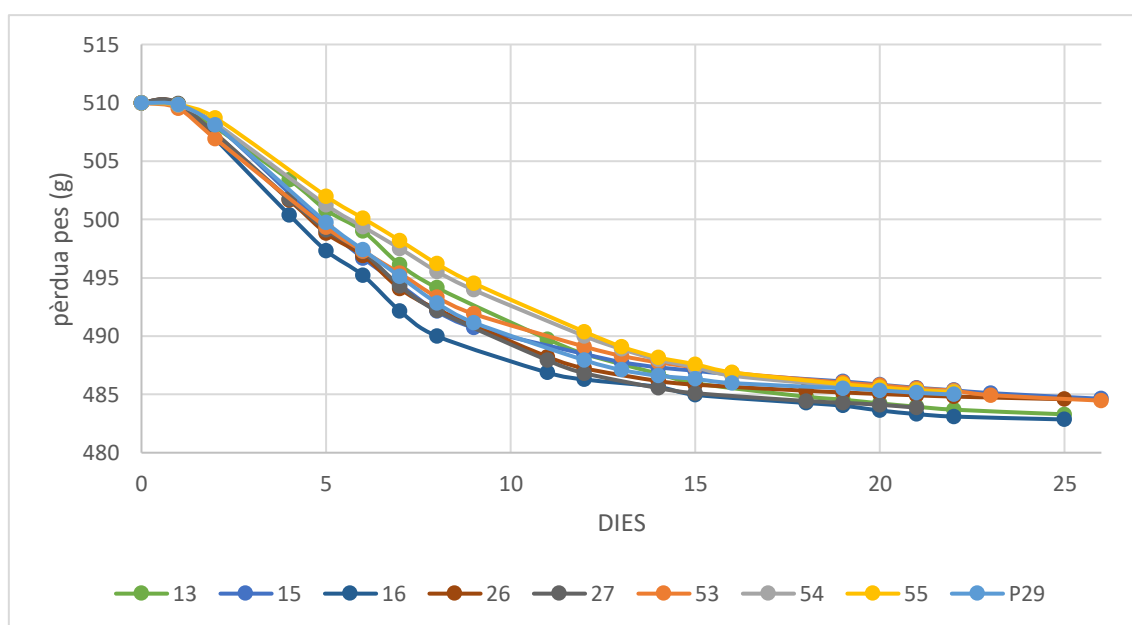
Microvinificacions amb els aïllats seleccionats

Una vegada fet l'*screening*, es van realitzar les microvinificacions (seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.1) amb els aïllats que presentaven una capacitat de consum de sucres semblant a la soca P29 control, però amb una tendència a generar una menor concentració d'àcid acètic.

○ Mutagènesi per Llum UV

A la Figura 15 es mostra la cinètica fermentativa dels aïllats 13, 15, 16, 26, 27, 53, 54 i 55 respecte la soca P29 control, representada com la pèrdua de pes (g) de les microvinificacions al llarg del temps. Es pot observar que en general totes les fermentacions van mantenir una tendència semblant a l'hora de disminuir el pes. La microvinificació de l'aïllat número 16 va mostrar una pèrdua de pes més ràpida els primers dies de fermentació respecte a les microvinificacions dels aïllats 54 i 55 les quals van presentar una disminució del pes més lenta. Les microvinificacions de l'aïllat número 27 van ser les que van mostrar una pèrdua de pes més semblant a la de la soca P29. Pel que fa al consum de sucres presents en el most, la soca P29 els va consumir fins a arribar a una concentració inferior a 2 g/L, en un total de vint-i-un dies. Un dia més tard van acabar la fermentació dels aïllats 54 i 55, seguidament, el vint-i-cinquè dia es van donar per acabades les fermentacions realitzades pels aïllats 13 i 16. Finalment, les microvinificacions dels aïllats 15, 26 i 53 van acabar la fermentació transcorreguts vint-i-sis dies.

Figura 15 Cinètica de fermentació (disminució del pes) dels aïllats 13, 15, 16, 26, 27, 53, 54, 55 obtinguts mitjançant la mutagènesi amb llum UV en comparació a la soca P29 control. Les corbes són el resultat de la mitjana del triplicat, i la desviació estàndard va ser inferior al 5% en tots els casos.



A la Taula 6, es mostren els resultats de les anàlisis químiques dels vins elaborats amb els aïllats resultants de la mutagènesi amb llum UV. Els resultats obtinguts van ser estadísticament analitzats per tal de saber si les diferències que s'observaven entre ells eren significativament diferents o no, tenint en compte una $p = 0,05$. Pel que fa a les graduacions alcohòliques obtingudes en les diferents microvinificacions, es pot observar que els resultats són significativament semblants entre ells. El contingut de sucres residuals de les diferents microvinificacions sí que són estadísticament diferents, degut al moment en que es va fer la seva determinació. D'altra banda, l'acidesa total no va mostrar diferències significatives, en canvi, el pH sí que en va mostrar, probablement degudes a la incertesa del mètode analític ($4,4-7,6 \pm 0,2$ g/L) produït durant la seva determinació. Al comparar l'àcid acètic format durant el transcurs de la fermentació de la soca P29 (0,40 g/L) respecte als diferents aïllats provats, es van poder veure diferències significatives entre ells. Els aïllats 16 i 55 són els que van produir una major concentració d'àcid acètic de 0,49 i 0,47 g/L respectivament, sent superiors a la soca P29 control. Seguidament, els aïllats 54 i 27 van produir una concentració més pròxima a la formada per la soca P29 control, però continuant sent superior amb uns valors de 0,44 i 0,42 g/L respectivament. Dels vuit aïllats provats, quatre d'ells van arribar a produir una concentració inferior als 0,40 g/L d'àcid acètic. Els aïllats que van reduir quasi un 25% la producció d'àcid acètic van ser el número 26 i 53 amb una concentració d'àcid acètic al final de les fermentacions de 0,31 g/L. Els aïllats 13 i 15 també van disminuir la producció d'àcid acètic arribant a les concentracions de 0,32 i 0,33 g/L, respectivament.

Taula 6 Anàlisi química dels vins obtinguts amb els aïllats obtinguts per mutagènesi amb llum UV. Determinació del grau alcohòlic, sucres residuals, acidesa total (AT), pH, àcid acètic, àcid màlic i àcid làctic. Els valors són el resultat de la mitjana del triplicat.

AÏLLATS	13	15	16	26	27	53	54	55	P29
Grau alcohòlic (% v/v)	12,30 ± 0,12 ^a	12,17 ± 0,19 ^a	12,34 ± 0,04 ^a	12,38 ± 0,04 ^a	12,32 ± 0,01 ^a	12,20 ± 0,25 ^a	12,23 ± 0,04 ^a	12,18 ± 0,03 ^a	12,20 ± 0,08 ^a
Sucres residuals (g/L)	1,56 ± 0,51 ^c	1,86 ± 0,19 ^c	1,23 ± 0,33 ^c	0,60 ± 0,25 ^b	0,31 ± 0,34 ^a	1,74 ± 0,53 ^c	0,22 ± 0,12 ^a	0,15 ± 0,09 ^a	0,55 ± 0,42 ^a
AT (g/L)	6,3 ± 0,1 ^a	6,2 ± 0,1 ^a	6,3 ± 0,2 ^a	6,2 ± 0,1 ^a	6,3 ± 0,1 ^a	6,0 ± 0,1 ^a	5,8 ± 0,2 ^a	5,9 ± 0,2 ^a	6,0 ± 0,1 ^a
pH	3,14 ± 0,03 ^c	3,20 ± 0,04 ^d	3,15 ± 0,01 ^c	3,16 ± 0,03 ^c	3,14 ± 0,04 ^c	3,21 ± 0,03 ^c	3,10 ± 0,02 ^b	3,08 ± 0,03 ^a	3,13 ± 0,01 ^c
Àc. acètic (g/L)	0,32 ± 0,02^a	0,33 ± 0,03^a	0,49 ± 0,02 ^d	0,31 ± 0,04^a	0,42 ± 0,02 ^b	0,31 ± 0,06^a	0,44 ± 0,01 ^{b,c}	0,47 ± 0,01 ^{b,c}	0,40 ± 0,03 ^b
Àc. màlic (g/L)	1,00 ± 0,08 ^a	1,19 ± 0,11 ^b	0,86 ± 0,07 ^a	1,00 ± 0,06 ^a	1,01 ± 0,06 ^a	1,25 ± 0,03 ^b	1,50 ± 0,03 ^c	1,45 ± 0,03 ^c	1,18 ± 0,07 ^b
Àc. làctic (g/L)	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a

○ Mutagènesi per EMS

A la Figura 17 es mostra la cinètica fermentativa expressada en pèrdua de pes (g) al llarg del temps dels aïllats "C", "F", "L" i "Q" obtinguts de la mutagènesi clàssica amb EMS, respecte a la soca P29 sense mutagenitzar. A partir del divuitè dia de fermentació, es va observar una frenada en la pèrdua de pes de totes les microvinificacions. En aquest punt, es va determinar el contingut de sucres de les microvinificacions donant-les per finalitzades un cop aquest va ser inferior a 2 g/L, concretament transcorreguts vint-i-tres dies. Les quatre microvinificacions portades a terme pels aïllats van seguir una cinètica fermentativa semblant a la de la soca control, tot i que, els aïllats "C" i "Q" van tendir a consumir els sucres de forma més lenta i ràpida, respectivament.

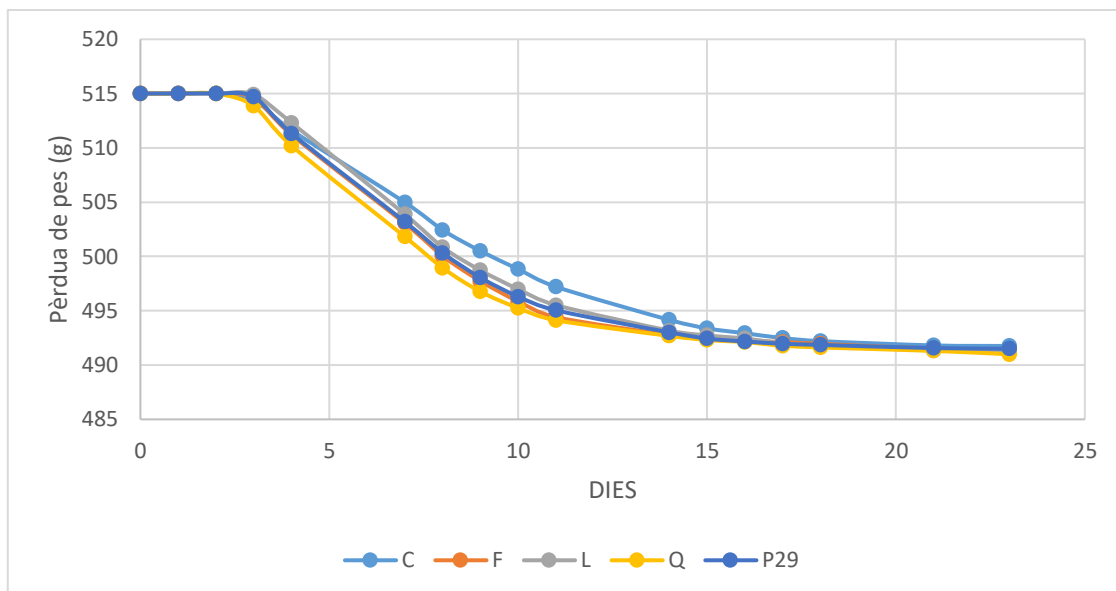


Figura 17 Cinètica de fermentació (disminució del pes) dels aïllats 13, 15, 16, 26, 27, 53, 54, 55 obtinguts mitjançant la mutagènesi amb llum UV en comparació a la soca P29 control. Les corbes són el resultat de la mitjana del triplicat, i la desviació estàndard va ser inferior al 5% en tots els casos

En la Taula 7, es mostren els resultats de les anàlisis químiques dels vins elaborats amb els aïllats resultants de la mutagènesi amb l'agent químic EMS. Els resultats obtinguts van ser estadísticament analitzats per tal de saber si les diferències que s'observaven entre ells eren significativament diferents o no, tenint en compte una $p=0,05$. De forma semblant als resultats obtinguts en les microvinificacions inoculades amb els aïllats resultants de la mutagènesi amb la llum UV, no hi ha diferències estadísticament significatives en les graduacions alcohòliques, només en la microvinificació realitzada per l'aïllat "F". Aquesta diferència pot ser deguda a la concentració de sucres residuals al final de la fermentació. Pel que fa a les concentracions de sucres al final de la fermentació, aquestes són significativament diferents com passava amb les microvinificacions dels aïllats obtinguts per mutagènesi amb llum UV. D'altra banda, l'acidesa total no va mostrar diferències significatives, en canvi el pH sí que en va mostrar, probablement degudes a la incertesa del mètode analític prèviament esmentat. Al comparar l'àcid acètic format durant el transcurs de la fermentació de la soca P29 (0,39 g/L) respecte als diferents aïllats provats, es poden veure diferències significatives entre ells. Concretament, l'aïllat "C" va ser el que va produir una major concentració d'àcid acètic de 0,57 g/L, sent superior a la soca P29 control. Seguidament, els aïllats "F" i "Q" van produir una concentració més pròxima a la produïda per la soca P29 control, amb uns valors de 0,36 i 0,41 g/L respectivament. Dels quatre aïllats testats, l'anomenat "L" va arribar a reduir un 33 % la producció d'àcid acètic en comparació a la soca P29 control, amb una concentració d'àcid acètic al final de les fermentacions de 0,26 g/L.

Taula 7 Anàlisi química dels vins obtinguts amb els aïllats obtinguts per mutagènesi amb EMS. Determinació del grau alcohòlic, sucres residuals, acidesa total (AT), pH, àcid acètic, àcid màlic i àcid làctic. Els valors són el resultats de la mitjana del triplicat

AÏLLATS	C	F	L	Q	P29
Grau alcohòlic (% v/v)	11,85 ± 0,05 ^a	11,74 ± 0,09 ^b	11,83 ± 0,16 ^a	11,91 ± 0,07 ^a	11,86 ± 0,04 ^a
Sucres residuals (g/L)	0,89 ± 0,18 ^a	1,97 ± 0,60 ^b	1,90 ± 0,39 ^b	1,14 ± 0,49 ^a	1,07 ± 0,11 ^a
AT (g/L)	6,9 ± 0,1 ^b	6,7 ± 0,2 ^{a,b}	6,4 ± 0,1 ^a	6,4 ± 0,1 ^a	6,5 ± 0,1 ^a
pH	3,12 ± 0,03 ^a	3,17 ± 0,03 ^b	3,20 ± 0,01 ^{b,c}	3,19 ± 0,02 ^b	3,19 ± 0,01 ^b
Àc. acètic (g/L)	0,57 ± 0,05 ^c	0,36 ± 0,04 ^b	0,26 ± 0,01^a	0,41 ± 0,03 ^b	0,39 ± 0,01 ^b
Àc. màlic (g/L)	1,56 ± 0,04 ^b	1,50 ± 0,02 ^a	1,90 ± 0,02 ^c	1,50 ± 0,02 ^s	1,50 ± 0,01 ^a
Àc. làctic (g/L)	0,05 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a

Podem afirmar que gràcies a la mutagènesi amb llum UV i l'agent químic EMS, és possible aconseguir obtenir mutacions aleatòries que afectin la via de producció d'àcid acètic per part del llevat, reduint d'aquesta manera la concentració d'àcid acètic en el vi final com s'havia vist en l'estudi realitzat per Cordente *et al.*, (2012), en el qual van aconseguir reduir la producció d'àcid acètic de dues soques de llevat en un 70%. Els aïllats obtinguts mitjançant la mutagènesi amb llum UV que van aconseguir reduir la producció d'àcid acètic, també van ser aquells en acabar entre 4 i 5 dies més tard les fermentacions. Aquest fet, podria ser degut a que la mutació produïda durant la mutagènesi amb la llum UV a part d'afectar a la producció d'àcid acètic, també podria haver afectat lleugerament la capacitat fermentativa del llevat. Per poder determinar exactament en quin punt del genoma de la soca P29 ha afectat la mutació que ha fet disminuir la producció d'àcid acètic, s'haurien de fer proves moleculars de seqüenciació. Seqüenciant el genoma de la colònia d'interès i comparar-lo amb la seqüenciació del genoma de la soca parental, és a dir, la P29 i veure on s'han produït les modificacions. Però l'objectiu de l'estudi no era la caracterització genotípica de la soca millorada sinó que es tractava d'obtenir una descendent de la soca P29 que presentés la millora fenotípica desitjada.

També, es va observar que alguns dels aïllats seleccionats amb el medi mínim + carbonat càlcic produïen una major concentració d'àcid acètic que la soca P29 control al finalitzar les microfermentacions (16, 55 i C), per tant, els resultats semblen indicar que el medi emprat per a la selecció i aïllament dels mutants en placa pot conduir a seleccions de falsos negatius. Per als següents *screenings* una possible alternativa al medi de selecció utilitzat seria l'ús del medi en placa basat en YPD suplementat amb ceruleïna descrit per Cordente *et al.*, 2012. Concretament, la ceruleïna és un inhibidor de la síntesi d'àcids grassos, la qual està estretament relacionada amb la producció d'àcid acètic, pel fet que aquest es considera un metabòlit intermediari de la via de síntesi de l'acetil-CoA, el qual és clau per a la biosíntesi dels esterols i àcids grassos. Les colònies que produeixen una menor i major concentració d'àcid acètic i acetil-CoA, respectivament, seran els aïllats resistents a la presència de ceruleïna i com a conseqüència podran créixer en aquest medi.

Un cop acabades les fermentacions es va determinar que la soca de llevat responsable de realitzar la fermentació tingués el perfil molecular de la soca de llevat P29 mitjançant la PCR d'elements delta. Les 8 colònies analitzades de cada fermentació, van mostrar el perfil de la soca P29. Un cop es va comprovar el perfil, es va procedir a conservar mitjançant crioboles a -60°C els aïllats que van mostrar una disminució en la producció d'àcid acètic, és a dir, els números: 13, 15, 26 i 53 i la lletra "L".

4.2. CONSERVACIÓ PEU DE CUBA S. CEREVISIAE PENEDES-29

Per a dur a terme el seguiment de la viabilitat cel·lular del PdC de la soca de llevat P29 es van sembrar en placa d'agar Sabouraud els microvials del PdC conservats durant diferents temps i temperatures de congelació.

Es va determinar l'eficàcia dels diferents compostos descrits com a crioprotectors en la bibliografia, els quals s'utilitzen per evitar i/o disminuir els danys produïts durant el procés de congelació i descongelació de les cèl·lules, el qual pot arribar a provocar la mort dels llevats durant aquestes etapes. A més a més, també es va avaluar l'efecte que produïa la temperatura de congelació (-20 i -60°C) en la conservació de la viabilitat de les cèl·lules.

En primer lloc, es va estudiar l'efecte del glicerol com a crioprotector a diferents concentracions (0, 2.5, 5, 7.5 i 10%) i a una temperatura de -20°C (Figura 17).

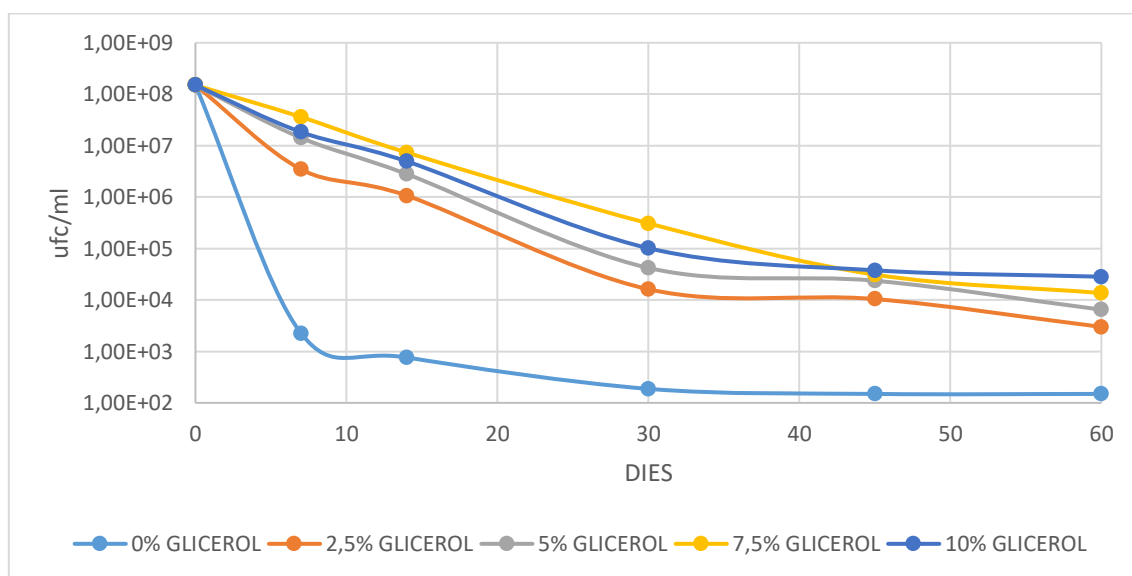


Figura 17 Avalució de l'efecte del glicerol com a crioprotector, a diferents concentracions (0, 2.5, 5, 7.5 i 10%) durant 60 dies de conservació a -20°C, mitjançant el seguiment de la població cel·lular viable en placa. Les corbes són el resultat d'un duplicat, i la desviació estàndard va ser inferior al 10% en tots els casos.

A la Figura 17, es pot observar una disminució de la població viable al llarg dels dos mesos de conservació del PdC a -20°C, en els diferents punts de mostreig, respecte a la seva població inicial ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml). Es pot veure, que en el PdC al qual no se li va addicionar glicerol, en la primera setmana de conservació, la població cel·lular viable va disminuir dràsticament fins a 2×10^3 ufc/ml. A partir de les dues setmanes de conservació, la població viable va continuar disminuint de forma sostinguda fins a arribar a una població d' $1,5 \times 10^2$ ufc/ml. Durant el període de conservació sense l'addició de glicerol es van perdre un total de 6 logaritmes respecte a la població inicial. A l'addicionar glicerol al PdC, es va observar una major conservació de la viabilitat cel·lular respecte el PdC sense crioprotector. Com més concentració de glicerol s'addicionava, major era la conservació de la viabilitat, tot i que, la concentració del 7,5% va ser la que va ajudar a mantenir una població viable més elevada durant el primer mes de conservació a -20°C (3×10^5 ufc/ml). La concentració de 2,5% de glicerol va aconseguir mantenir la població viable de llevats en 3×10^3 ufc/ml als cap de dos mesos. Seguidament, la concentració del 5% va conservar la viabilitat cel·lular fins a $6,5 \times 10^3$ ufc/ml. Pel que fa a les concentracions de 7,5 i 10% de glicerol, des d'un inici la concentració de 7,5% és la que va mostrar un major efecte de crioprotecció, tot i que, al cap de dos mesos de conservació la concentració del 10% és la que va aconseguir mantenir viable una major població cel·lular de 3×10^4 ufc/ml respecte

a els $1,5 \times 10^4$ ufc/ml viables utilitzant la concentració de 7,5%. Amb l'ús del 7,5 i 10% de glicerol es van perdre 3,5 logaritmes respecte a la població inicial. Per resumir, mitjançant l'ús de glicerol com a crioprotector, es va poder evitar la disminució de 2 logaritmes utilitzant les concentracions de 7,5 i 10% de glicerol respecte al PdC sense glicerol. Per tant amb els resultats obtinguts podem concloure que el glicerol ajuda a retardar la mort cel·lular produïda durant la conservació a -20°C . Els resultats semblen indicar que com major sigui la duració de la conservació del PdC a una temperatura de -20°C , l'efecte de crioprotecció del glicerol anirà disminuint fins a arribar a estabilitzar-se després d'un més de conservació.

Posteriorment, es va avaluar l'efecte de la llet desnatada en pols (0, 5, 7,5, 10 i 12%) i un producte comercial (Gomasol SEDA) compost principalment per: goma aràbiga, manoproteïnes i àcid ascòrbic a les concentracions recomanades (100 i 300 ml/HI) a una temperatura de -20°C . També es va provar la combinació de la dosi màxima de Gomasol SEDA més el 10% de llet desnatada en pols (Figura 18).

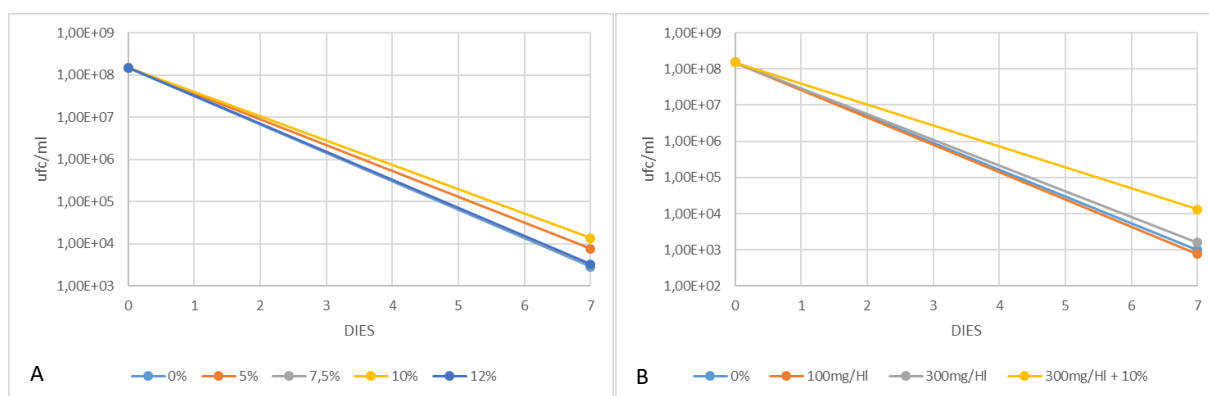


Figura 18 Avaluació de l'efecte de la llet desnatada en pols (A) i el Gomasol SEDA (B) com a crioprotectors, a diferents concentracions (0, 5, 7,5, 10 i 12% llet; 0, 100, 300 i 300 ml/hl (+10 % llet) Gomasol SEDA) durant 7 dies de conservació a -20°C , mitjançant el seguiment de la població cel·lular viable en placa. Les corbes són el resultat d'un duplicat, i la desviació estàndard va ser inferior al 10% en tots els casos.

Com es pot observar a la Figura 18, tant la llet desnatada com el Gomasol SEDA, no van ajudar en la conservació de la viabilitat del PdC conservat a -20°C . Partint d'una població de cèl·lules d' $1,5 \times 10^8$ ufc/ml, al cap d'una setmana de conservació del PdC amb l'addició de llet i Gomasol, la viabilitat cel·lular va disminuir dràsticament fins a 1×10^4 i 1×10^3 ufc/ml, respectivament. Tant en la Figura 18 A com en la 18 B es pot veure que l'únic agent que ajuda a mantenir la viabilitat més elevada respecte a les altres condicions va ser la llet desnatada en pols a una concentració del 10% arribant a conservar la població viable fins a $1,4 \times 10^4$ ufc/ml. Ara bé, al veure que després d'una setmana la població cel·lular viable havia disminuït 4 logaritmes respecte a la inicial en totes les condicions avaluades, es va decidir no continuar avaluant aquests dos compostos durant més temps, ja que no complien l'objectiu principal de conservar la població viable en el temps.

Tot i que en altres estudis utilitzant un 10% de llet desnatada en pols s'aconseguia conservar la viabilitat del cultiu cel·lular (Potomska *et al.* 2012), en el nostre cas com s'ha esmentat anteriorment el seu efecte no va ser l'esperat. Això podria ser degut al fet que la llet no quedava homogeneïtzada amb el PdC i precipitava al fons del microvial. La manca de solubilitat de la llet en pols amb el PdC podia ser deguda al pH baix d'aquest, provocant la seva inestabilitat i posterior precipitació. La llet en pols es considera un crioprotector sense permeabilitat, és a dir, no pot traspasar la membrana plasmàtica i per tant, té un efecte crioprotector extracel·lular

(Hubalek, 2003). Com que no quedava homogènia en el PdC, el seu efecte crioprotector es veia reduït, impedit el seu efecte sobre la totalitat de cèl·lules presents en el microvial.

Pel que fa al Gomasol SEDA, aquest es va avaluar, ja que, és un producte comercial que es pot utilitzar durant l'elaboració de vins i conté en la seva composició: goma aràbiga i manoproteïnes que s'han descrit com a crioprotectors (Hubalek, 2003), a més, d'àcid ascòrbic s'ha vist que ajuda a disminuir els danys oxidatius que es produeixen durant el procés de congelació i descongelació (Siaterlis *et al.* 2008; Gamero-Sandemetrio *et al.* 2015). La ineficàcia d'aquest compost podria ser deguda al fet que les concentracions de goma aràbiga, manoproteïnes i àcid ascòrbic fossin molt baixes. En la composició del producte, no s'especifica les concentracions dels diferents compostos.

En determinar que el crioprotector més eficaç per a mantenir una major viabilitat cel·lular era el glicerol, es va voler avaluar el seu efecte juntament amb l'àcid ascòrbic. Concretament, es van avaluar les concentracions del 0, 5, 7.5 i 10% de glicerol més 2,5 i 5 g/L d'àcid ascòrbic (Figura 19).

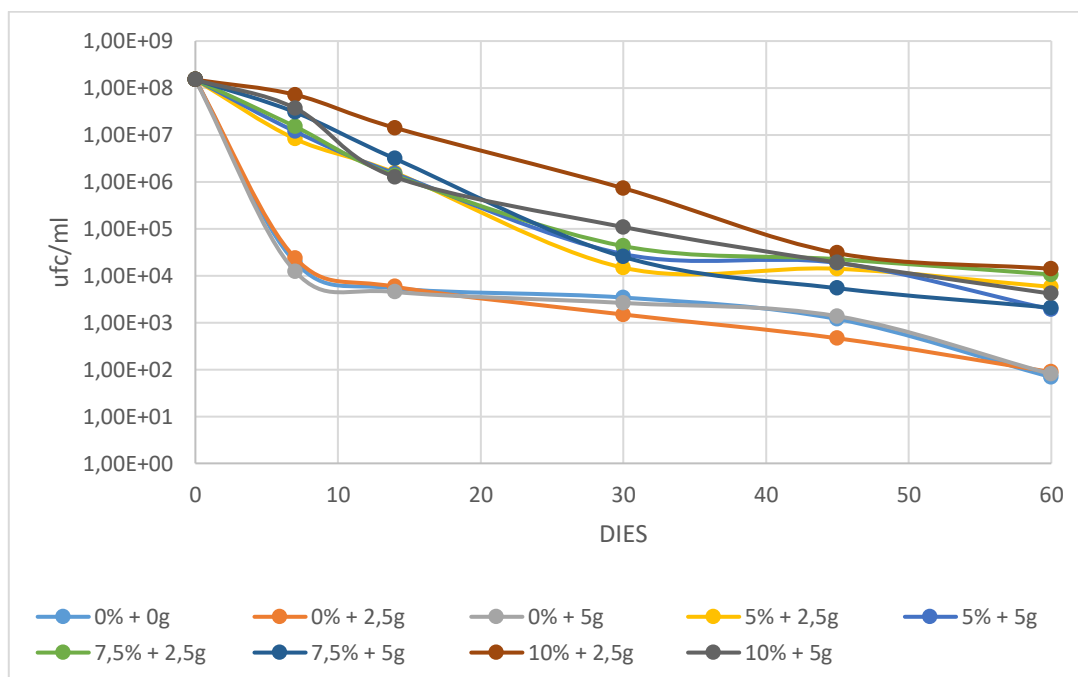


Figura 19 Avaluació de l'efecte del glicerol + àcid ascòrbic com a crioprotectors, a diferents concentracions (0, 2.5, 5, 7.5 i 10%) i (2,5 i 5 g/L), respectivament, durant 60 dies de conservació a -20°C, mitjançant el seguiment de la població cel·lular viable en placa. Les corbes són el resultat d'un duplicat, i la desviació estàndard va ser inferior al 10% en tots els casos.

El seguiment de la viabilitat durant els dos mesos de conservació utilitzant glicerol i àcid ascòrbic com a crioprotectors es mostren en la Figura 19. Per una banda, es va avaluar l'efecte de l'àcid ascòrbic addicionat com a únic crioprotector i per una altra, l'efecte complementari d'addicionar àcid ascòrbic i glicerol conjuntament com a crioprotectors. Pel que fa únicament a l'efecte de l'àcid ascòrbic, no es van observar diferències de la viabilitat cel·lular respecte el control sense addició de cap crioprotector. D'altra banda, els resultats no van mostrar un efecte supletori de l'àcid ascòrbic + glicerol arribant a disminuir la viabilitat fins a l'ordre de 10^4 - 10^5 ufc/ml transcorreguts els dos mesos de conservació. A més, si es comparen aquests resultats amb els mostrats a la Figura 17 on únicament s'havia utilitzat el glicerol com a únic crioprotector, s'observen les mateixes tendències en ambdós casos. Per tant, el que realment actua com a crioprotector és el glicerol.

Un cop es va determinar que l'addició d'àcid ascòrbic no mantenia la població cel·lular amb una viabilitat més elevada que quan s'utilitzava només glicerol, es va voler avaluar l'efecte en la viabilitat cel·lular que produeix la temperatura de congelació en el PdC. Per la qual cosa, es van repetir les mateixes concentracions de glicerol a -60°C (Figura 20).

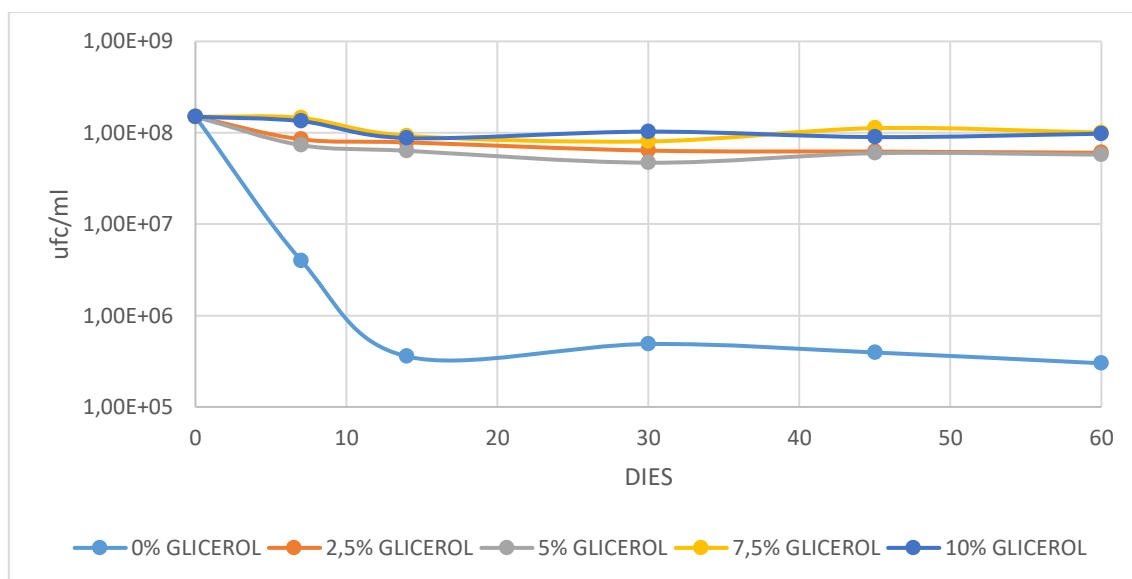


Figura 20 Avaluació de l'efecte del glicerol com a crioprotector, a diferents concentracions (0, 2,5, 5, 7,5 i 10%) durant 60 dies de conservació a -60°C , mitjançant el seguiment de la població cel·lular viable en placa. Les corbes són el resultat d'un duplicat, i la desviació estàndard va ser inferior al 10% en tots els casos.

A la Figura 20, es mostra la viabilitat del PdC de la soca P29 en ufc/ml al llarg de 60 dies a -60°C , utilitzant les concentracions de glicerol següents: 0, 2,5, 5, 7,5 i 10%. Es pot observar que, la població viable del PdC conservat sense el crioprotector transcorregudes dues setmanes va disminuir dos logaritmes i mig arribant a una població de 4×10^5 ufc/ml, mentre a -20°C la població va disminuir fins a 1×10^3 ufc/ml. Es pot veure un major efecte (dos logaritmes) de conservació de la viabilitat al llarg del temps quan la temperatura de congelació disminueix de valor. A partir de la segona setmana de conservació, la població viable es va estabilitzar, tal i com va passar en la conservació a -20°C . Quan es van addicionar les diferents concentracions de glicerol i la temperatura de congelació era de -60°C , la població de cèl·lules viables es va conservar estable al llarg dels dos mesos de conservació avaluats. La població cel·lular viable en tots els casos va disminuir, però, aquesta pèrdua de viabilitat no va ser significativa en cap de les concentracions avaluades.

Es va observar que com més baixa és la temperatura de congelació i per tant més ràpid el temps de congelació, sembla que es produeixen menys danys fisiològics en les cèl·lules, fent que la població cel·lular viable sigui major. Els resultats obtinguts concorden amb l'estudi realitzat per Dumont *et al.* (2003), el qual es va veure que el temps de congelació és un dels principals factors que influeixen en la viabilitat cel·lular durant el procés de congelació-descongelació. Com més ràpid sigui el temps de congelació, hi haurà una menor deshidratació i formació de cristalls, donant lloc a una taxa de supervivència cel·lular més elevada.

Com s'ha vist en tots els resultats mostrats, el glicerol va ser el crioprotector més eficaç. Aquests, està descrit (Hubalek, 2003) que actua com a crioprotector impregnant, és a dir, pot entrar dins les cèl·lules per difusió a través de la membrana cel·lular protegint les cèl·lules disminuint la cristal·lització de les molècules d'aigua presents a l'exterior i interior cel·lular.

Finalment, per veure l'efecte que produeix la concentració de sucres (glucosa, fructosa) present en el PdC, es va avaluar la conservació d'un PdC a una menor densitat (1004 g/L), o sigui, amb menys sucres en la matriu de conservació, congelant-lo a -60°C amb l'addició de 0, 5 i 7,5% de glicerol (Figura 21).

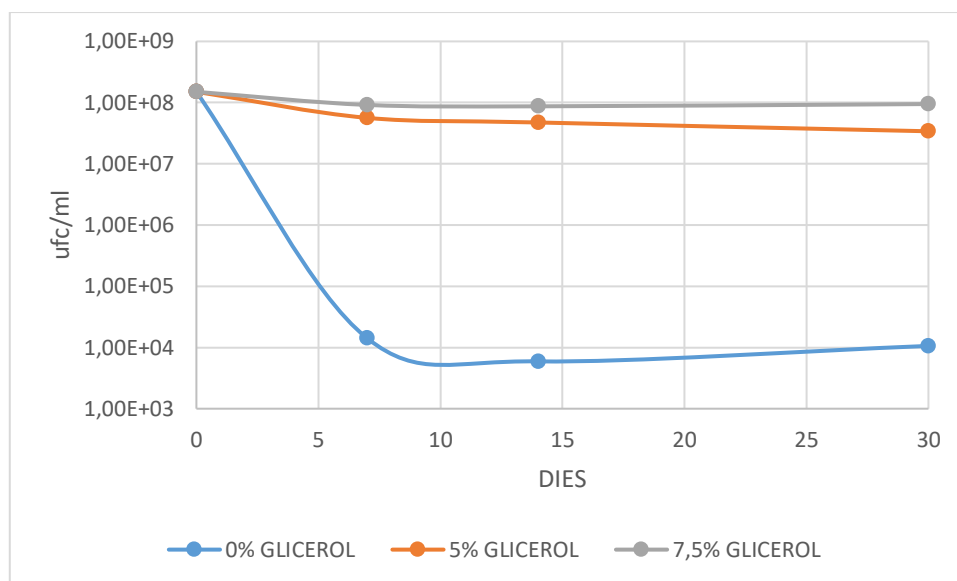


Figura 21 *Avaluació de l'efecte de la concentració de sucres (densitat = 1004 g/L) en el peu de cuba i del glicerol (5 i 7,5%) com a crioprotectors, durant 30 dies de conservació a -60°C, mitjançant el seguiment de la població cel·lular viable en placa. Les corbes són el resultat d'un duplicat, i la desviació estàndard va ser inferior al 10% en tots els casos.*

Si comparem la població cel·lular viable, transcorreguda una setmana de conservació, de la Figura 21 amb la de la Figura 20, es pot observar que el PdC sense glicerol amb una densitat de 1004 g/L va conservar la població cel·lular viable a $2,5 \times 10^4$ ufc/ml, en canvi, el PdC amb una densitat de 1025 g/L va mantenir la seva població viable a 4×10^6 ufc/ml. Per tant, quan el PdC contenia una menor concentració de sucres (densitat més baixa), la viabilitat cel·lular sense addició de glicerol era inferior, ja que els sucres presents en la matriu actuarien també com a crioprotectors. Per tant, en general es pot concloure que si el PdC té una major densitat, tendirà a tenir una major viabilitat al llarg del temps de conservació. Els resultats també mostren que l'addició del glicerol no es veia afectada per la concentració de sucres presents en el PdC.

Els resultats obtinguts concorden amb la bibliografia consultada (Hubalek, 2003) on s'havia vist que diferents sucres com la glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, etc. tenen un efecte crioprotector. En el nostre cas, en el PdC trobem glucosa i fructosa, per tant, com major sigui la presència de sucres en la matriu on es conserven les cèl·lules, major serà la protecció i per tant, es mantindrà una viabilitat més elevada al llarg del temps.

Per finalitzar, al cap dels dos mesos de conservació, es va realitzar una estria de cadascuna de les condicions que van assolir una major viabilitat, 7,5 i 10% de glicerol a -20°C i totes les condicions avaluades a -60°C. Les vuit colònies analitzades de cada PdC conservat van mostrar el perfil molecular de la soca P29. Per tant, la puresa del PdC es conserva al menys durant dos mesos de conservació.

5. CONCLUSIONS I PERSPECTIVES

REDUCCIÓ DE L'ACIDESA VOLÀTIL

Amb els resultats obtinguts, podem concloure que mitjançant les dues tècniques de mutagènesi clàssica avaluades (llum UV i EMS) es pot observar una disminució de fins a un 25% de la producció d'àcid acètic respecte la soca P29 control amb els aïllats 13, 15, 26 i 53 obtinguts a partir de la mutagènesi amb llum UV i una reducció del 33% amb l'aïllat "L" aconseguit gràcies a la mutagènesi amb l'etil metanosulfonat. Tot i reduir la producció d'àcid acètic, el comportament fermentatiu dels diferents aïllats va ser similar al de la soca P29 control.

Com a perspectives de futur, s'haurien de re-avaluar els aïllats conservats en noves microvinificacions amb les mateixes condicions, per tal de determinar si la o les mutacions aparegudes a causa de la mutagènesi són heretables o es perden al llarg del temps. A continuació, d'aquells aïllats on s'observés un comportament similar en la producció d'àcid acètic en els nous assajos, s'hauria d'incrementar el volum fins a realitzar vinificacions a nivell de celler experimental utilitzant most natural. Finalment, s'haurien d'avaluar els vins obtinguts a nivell sensorial per acabar de confirmar que la mutació o les mutacions induïda/es als aïllats seleccionats no hagin afectat negativament a nivell d'anàlisi sensorial els vins finals.

CONSERVACIÓ PEU DE CUBA S. *CEREVISIAE* PENEDES-29

D'aquesta part del treball, podem concloure que de tots els crioprotectors avaluats, el glicerol és el que ha mostrat un major efecte al llarg del temps, mantenint la major viabilitat de les cèl·lules sotmeses a congelació. A més a més, s'ha vist que la temperatura de congelació i conservació del PdC té un efecte directe en el manteniment de la viabilitat cel·lular al llarg del temps. Fent-se evident que a una temperatura de congelació més baixa (-60°C) la viabilitat cel·lular es veu significativament menys afectada que a temperatures de congelació més altes (-20°C).

Com a perspectives de futur, seria interessant plantejar l'avaluació de les millors condicions obtingudes de la congelació i conservació a -60°C a volums majors, equiparables a les condicions reals de producció i subministrament dels PdC als cellers interessats. També s'hauria de comprovar que el PdC conservat mantingui la capacitat fermentativa.

6. AGRAÏMENTS

Voldria donar les gràcies a tot l'equip de l'INCAVI, per deixar-me fer el treball de final de màster a les seves instal·lacions i ajudar-me a tirar-lo endavant.

M'agradaria fer una menció especial a Gemma Roca i Anna Puig, amb les quals he fet aquest treball i m'han aconsellat i assessorat durant els diferents mesos que he estat a l'INCAVI fent aquest treball així com les pràctiques externes.

També donar a les gràcies a María Jesús Torija per haver-me supervisat el treball i ajudar-me a millorar-lo.

7. BIBLIOGRAFIA

- Arencibia, D.F., Rosario, L.A., Gámez, R. (2008) Métodos Generales de Conservación de Microorganismos. *Liorad Ediciones*.
- Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. (2008) Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 125:60-70.
- Bauer, F.F. and Pretorius, I.S. (2000) Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine: A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21:27-50.
- Bayliak, M.M., Hryniv, O.V., Knyhynyska, R.V., Lushchak, V.I. (2018) Alpha-ketoglutarate enhances freeze-thaw tolerance and prevents carbohydrate-induced cell death of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 200:33-46.
- Beech, F.W. and Davenport, R. (1971) Isolation, purification and maintenance of yeasts (Chap. V). *Methods in Microbiol.* vol 4:153-182.
- Beltran, G., Novo, M., Guillamon, J.M., Ma,s A., Rozes, N. (2008) Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 121:169-177.
- Cordente, A.G., Cordero-Bueso, G., Pretorius, I.S., Curtin, C.D. (2012) Novel wine yeast with mutations in YAP1 that produce less acetic acid during fermentation. *FEMS Yeast Res.* 13, 62-73.
- Cordente, AG., Heinrich, A., Pretorius, I.S., Swiegers, J.H. (2009) Isolation of *sulfite reductase* variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res* 9: 446–459.
- Day, J.G. and McLellan, M.R. (1999) Cryopreservation and freeze-drying protocols. *Methods in Molecular Biology.* v 38, 56-57.
- Doyle A. (1990) Guidelines for the Establishment and Operation of Collections Cultures of Microorganisms. *Finlay Editions*. 2nd ed, 136-141.
- Du Toit, W.J., and Lambrechts, M.G. (2002) The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 74:57-64.
- Dumont, F. Marechal, P.A. Gervais, P. (2004) Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:268–272.
- Dumont, F., Marechal, P.A., Gervais, P. (2003) Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates. *Cryobiol.* 46(1):33-42.
- Dupont, S., Rapoport, A., Gervais, P., Beney, L. (2014) Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:8821–8834.
- Erasmus, D.J., Cliff, M., van Vuuren, H.J.J. (2004) Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of Icewine. *Am. J. Enol. Vitic.* 55:371-378.
- Gamero-Sandemetrio, E., Torrellas, M., Rábena, M.T., Gómez-Pastor, R., Aranda, A., Matallana, E. (2015). Food-grade argan oil supplementation in molasses enhances fermentative performance and antioxidant defenses of active dry wine yeast. *AMB Expr.* 5:75-85.
- Ghera, R.L. (1998) Preservation Culture. Methods for General and Molecular Bacteriology. *American Society for Microbiology Washington. Bacteri Assays*, 12:49-50.
- Guillamón, J.M., Barrio, E., Huerta, T., Querol, A. (1994) Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(4):708-714.
- Hawksworth, D.L. and Aguirre, B. (1997) International Initiatives in Microbial Diversity. The Biodiversity of Microorganisms and the Role of Microbial Resource Centres. Biodiversity Committee, 65-72.

- Hawksworth, D.L. and Kirsop, B.E. (1997) *Living Resources for Biotechnology: Filamentous Fungi*. Cambridge University Press, 209.
- Hubalek, Z. (2003) Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiol.* 46: 205–229.
- Juarros, E., Tortajada, C., García, M.D., Uruburu, F. (2000) Storage of stock cultures of filamentous fungi at -80°C.: effects of different freezing-thawing methods. *Microbiol SEM*, 9:28-33.
- Legras, J.L., Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 221 (2): 249-255.
- Malik, K.A. (1992) Freeze drying of microorganisms using a simple apparatus. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 8(1):76-79.
- Martini, A. (1993) The origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Wine Res.* 4:47-53.
- Nakase, T. (1996) Quality Control Systems of Microbial Cultures in Japan Collection of Microorganisms (JCM), Chap.5. Culture Collections to Improve the Quality of Live, Proceedings of the Eighth International Congress for Culture Collections, 144-147.
- Office Internationale de la Vigne et du Vin (2009) Compendium of international methods of wine and must analysis. vol. 1 OIV, 419.
- Office Internationale de la Vigne et du Vin (2021) International Code of Oenological Practices. OIV, 433.
- Onions, A.H. (1998) Preservation of fungi. *Methods in Microbiology*. vol. 4. Academic Press, 113-151.
- Połomska, X., Wojtatowicz, M., Zarowska, B., Szołtyśik, M., Chrzanowska, J. (2012). Freeze-Drying Preservation of Yeast Adjunct Cultures for Cheese Production. *Pol. J. Food Nutr. Sci*, Vol. 62, No. 3, 143-150.
- Pozo-Bayon, M.A., GA, E., Polo, M.C., Tenorio, C., Martin-Alvarez, P.J., Calvo de la Banda, M.T., Ruiz-Larrea, F., Moreno-Arribas, M.V. (2005) Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *J. Agric. Food Chem.* 53:8729-8735.
- Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 16:675-729.
- Pühler, A. (1993) *Biotechnology* 2nd ed. Weinheim.
- Radler, F. (1993) Yeasts-metabolism of organic acids. *Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publi*, 165–223.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006) Alcohols and other volatile compounds. The chemistry of wine stabilization and treatments. *Handbook of Enology*, vol. 2, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd., 51–64.
- Rudge, R.H. (1998) Maintenance of Bacteria by Freeze-Drying. *Maintenance of Microorganisms*. 2nd ed. Academic Press.
- Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E., Lindsey, G. (2000) The LEA-like protein HSP12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim. Biophys.* 1464:267-278.
- Siaterlis, A., Deepika, G., Charalampopoulos, D. (2008) Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 295-301.
- Snell, J.J. (1997) General Introduction to Maintenance Methods. *Maintenance of Microorganisms and Cells. A manual of Laboratory Methods*. 1st ed. Academy Press, 21-30.
- Sponholz, W.R. (1993) Wine spoilage by microorganisms. *Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publishers*, 395-420.

- Torrens, J., Urpi, P., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., Lopez-Tamames, E., Buxaderas, S. (2008) Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *Int. J. Food Microbiol.* 124:48-57.
- Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P., Thevelein, J.M. (1995) Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:109-115.
- Hashimoto, S., Ogura, M., Aritomi, K., Hoshida H., Nishizawa, Y, Akada, R. (2004) Isolation of auxotrophic mutants of diploid industrial yeast strains after UV mutagenesis. *Appl enviro microbiol*, 312-319.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., Van Dijken, J.P. (1990) Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* 136:395-403.
- Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Silva, R., Chaves, S., João Sousa, M., Côrte-Real, M. (2010) The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Appl Microbiol Biotechnol*

8. ANNEXES

Annex I: Fitxa tècnica *Saccharomyces cerevisiae* soca Penedès-29 (P29)

P29

Origen del llevat *Saccharomyces cerevisiae* soca Penedès-29 (P29)

Llevat aïllat per INCAVI (Institut Català de la Vinya i el Vi) a l'Estació de Viticultura i Enologia de Vilafranca del Penedès. Prové de la selecció realitzada en la zona vitivinícola del Penedès.

Característiques morfològiques

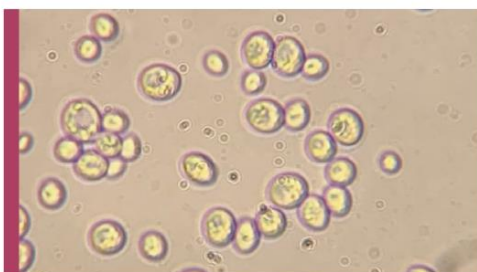
Forma: ovalada

Reproducció vegetativa: gemmació multilateral

Agrupacions cel·lulars: generalment aïllades

Característiques de la colònia: color crema, llisa i brillant

Longitud: 5,8 µm
Ample: 4,5 µm



Aplicacions

La soca P29 ha estat escollida per les seves qualitats fermentatives, especialment en segona fermentació. La fan idònia per a obtenir un producte d'alta qualitat amb una bona presa d'escuma i bones característiques organolèptiques.

També és apte per l'elaboració de vi tranquil i vi base.

Capaç d'assegurar un inici ràpid de la fermentació i una bona adaptació a tot tipus de mostos i de vins base en la presa d'escuma. Així mateix assegura un excel·lent comportament a temperatures baixes i moderades.

Característiques microbiològiques

Espècie: *Saccharomyces cerevisiae*.

Cinètica fermentativa: inici i velocitat de fermentació ràpides (Figura 1).

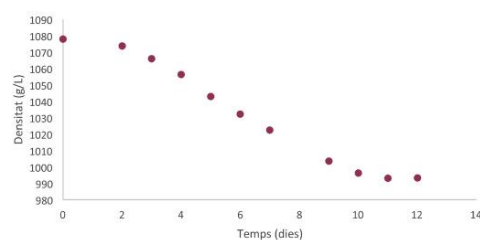


Figura 1. Exemple de cinètica de fermentació en most blanc

Rang de temperatures: 12 a 28°C

Resistència a pH: > 2.8

Propietats enològiques

Poder fermentatiu elevat: >14% v/v.

Producció d'acidesa volàtil: baixa/moderada.

Inapreciable producció d'anhídrid sulfurós i nul·la d'àcid sulfhídric.

Producció d'escuma:
tendeix a crear escuma amb agitació.

Sedimentació: relativament ràpida.

Presentació i condicions de conservació

Es subministra un peu de cup (PC) de la soca P29 en format líquid. També es pot subministrar un PC ecològic. El PC entregat sol tenir una població d'entre 80 - 150 milions de cèl·lules/mL. Malgrat es recomana l'ús immediat del PC, aquest es pot mantenir a 4°C durant 20 dies conservant un 80% de la seva viabilitat.



Increment volum peu de cup

Exemple orientatiu d'increment i adaptació al medi alcohòlic de la soca P29 a partir de 25 L inicials, per a un tiratge de 10.000 L (5% de PC).

DIA	Volum INICIAL PC	Increment	Volum FINAL PC	Vi base	Sucre	Aigua	Àcid cítric
Dia 1	25 L	25 L	50 L	22,5 L	988 g	2,5 L	12,5g
Dia 2	50 L	50 L	100 L	45 L	1.975 g	5 L	25 g
Dia 3	100 L	100 L	200 L	90 L	3.950 g	10 L	50 g
Dia 4	200 L	100 L	300 L	90 L	3.950 g	10 L	50 g
Dia 5	300 L	100 L	400 L	90 L	3.950 g	10 L	50 g
Dia 6	400 L	100 L	500 L	90 L	3.950 g	10 L	50 g
Dia 7	TIRATGE						

Taula 1. Increment volum PC.
T* PC: 17°C a 19°C; agitació suau i constant.
Mantenir diàriament el PC a densitat > 1002-1000.

Annex II: PCR Elements delta (δ) directe de colònia (Legras *et al.*, 2003)

S'aliquoten 2,5 μ l d'H₂O bidestil·lada estèril en microvials de 0,2 ml. Amb una nansa o un escuradents estèril s'agafa una colònia separada i es dissol la biomassa en l'H₂O del microvial. A continuació es prepara el mix de PCR: Reaction Buffer 1X, MgCl₂ [2,5mM], primer Delta 12 [1 μ M] (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3'), primer Delta 21 [1 μ M] (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'), dNTPs[0,2mM], Taq Polimerasa [0,02U/ μ l] (Bioline, Londres, Regne Unit) en un volum final de 25 μ l.

La mostra de DNA s'amplifica en el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanya). El cicle programat per a fer la PCR de deltes és: desnaturalització a 95°C durant 4 minuts, seguit de trenta cinc cicles de desnaturalització a 95°C durant 30 segons, unió dels encebadors a 46°C durant 30 segons i extensió a 72°C durant 1,5 minuts i finalment un cicle d'elongació final a 72°C durant 10 minuts.

Per a visualitzar el producte de la PCR, es fa una electroforesi en gel d'agarosa al 2 % d'agar (p/v) amb TBE 1X (Tris 0,089 M; Àcid Bòric 0,089 M; EDTA 0,002 M, pH 8,3) (Canvax, Córdoba, Espanya), usant Bromur d'etidi (Sigma-Aldrich corp., Missouri, EUA) com agent intercalant, i DNA Molecular Weight Marker XIV, 100 base pair ladder (Roche, Mannheim, Alemanya) com a marcador de pes molecular. Els perfils obtinguts durant la electroforesis es visualitzen gràcies al transil·luminador Gel Doc Go imaging system de Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, EUA). Gràcies a la diferència de longitud i nombre de bandes obtingudes es poden diferenciar les diferents soques.

Annex III: Anàlisi de restricció del ADN mitocondrial (Guillamón *et al.*, 1994)

Extracció ADN

D'una placa amb colònies se'n pren una per cada vial amb una nansa groga i es fa créixer en 800 μ l de YPD líquid durant 2 dies a 28°C. Abans de posar els vials a l'estufa, agitar en el vòrtex.

1. Centrifugar a 14.000 rpm 3 minuts.
2. Llençar sobrenedant i afegir 800 μ l d'H₂O destil·lada estèril. Agitar en el vòrtex per resuspendre el pellet.
3. Centrifugar a 14.000 rpm 3 min.
4. Llençar el sobrenedant i afegir 300 μ l de Tampó 1 (182 g/L Sorbitol, 200 ml/L EDTA 0.1 M, pH 7,5) i 40 μ l de Liticasa (Sigma-Aldrich corp., Missouri, EUA).
5. Agitar per resuspendre el pellet i incubar en termomixer o bany a 37°C durant 30 minuts.
6. Centrifugar a 7.000 rpm 1 min.
7. Llençar el sobrenedant i resuspendre el pellet amb 300 μ l en Tampó 2 (50 ml/L Tris 1M, 40 ml/L EDTA 0,5M, pH 7,4) i 50 μ l de SDS al 10%. Agitar vigorosament amb el vòrtex.
8. Incubar a 65°C 15 minuts en el termomixer o bany.
9. Afegir 300 μ l d'acetat potàssic, agitar vigorosament amb el vòrtex i posar els vials al congelador un mínim de 30 min.
10. Centrifugar 15 min a 14.000 rpm.
11. A l'acabar de centrifugar, traspasar per decantació el sobrenedant en un eppendorf d'1,5 ml que conté 600 μ l d'isopropanol. Agitar els vials per inversió 2-4 vegades.
12. Centrifugar 10 min a 14.000 rpm.

13. Llençar el sobrenedant i rentar el petit sediment que ha quedat amb 300 µl EtOH al 70 % fred. Agitar per inversió, procurant desenganxar el pellet del fons del vial.
14. Centrifugar 5 min a 14.000 rpm.
15. Llençar el sobrenedant i fer spin amb la centrífuga i acabar d'assecar el pellet eliminant restes d'EtOH amb pipeta.
16. Afegir 15 µl de TE procurant que el pellet quedi ben cobert. Guardar els vials al congelador un mínim de 30 minuts si després es vol fer la digestió.

Digestió del DNA total amb l'enzim de restricció Hinf I:

Abans de començar amb la digestió, treure els vials del congelador, deixar descongelar i resuspendre bé el pellet pipetejant varies vegades.

Per cada mostra:

- 1,5 µl de Tampó de Hinf I (New England BioLabs inc., Massachusetts, EUA)
- 1,5 µl de Hinf I (New England BioLabs inc., Massachusetts, EUA)
- 0,75 µl de RNasa (concentració 500 µg/ml) (Roche, Mannheim, Alemanya)

Aliquotar 3,8 µl DNA/vial:

1. Deixar els 3,8 µl de DNA en la paret del vial.
2. Fer spin per a què la gota vagi al fons del vial i es mescli amb el mix prèviament aliquotat.
3. Agitar amb el vòrtex.
4. Tornar a fer spin.
5. Posar el termomixer o bany a 37°C durant 3 hores.

Electroforesis mtDNA

Preparar els gels d'agarosa al 1 % (p/v) amb TBE 1X (Tris 0,089 M; Àcid Bòric 0,089 M; EDTA 0,002 M, pH 8,3) (Canvax, Córdoba, Espanya), usant Bromur d'etidi (Sigma-Aldrich corp., Missouri, EUA) com agent intercalant i Molecular Weight Marker III (Roche, Mannheim, Alemanya) com a marcador de pes molecular. Visualitzar els gels gràcies al transil·luminador Gel Doc Go imaging system de Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, EUA). Gràcies a la diferència de longitud i nombre de bandes obtingudes es poden diferenciar les diferents soques.

Annex IV: Classificació dels aïllats obtinguts mitjançant la radiació amb llum UV

AÏLLAT	TEMPS D'EXPOSICIÓ (segons)	MORFOLOGIA
1	25	Mitjana granulada
2	25	Mitjana granulada
3	20	Mini
4	20	Mini
5	20	Mini
6	20	Petita groga
7	20	Petita groga
8	20	Petita groga
9	20	Petita blanca
10	20	Petita blanca
11	20	Petita blanca
12	20	Petita blanca
13	20	Mitjana
14	20	Mitjana
15	20	Mitjana
16	20	Mitjana
17	20	Mitjana
18	20	Mitjana granulada
19	20	Petita estrellada grog
20	15	Petita granulada
21	15	Petita granulada
22	15	Petita granulada
23	15	Petita blanca
24	15	Petita blanca
25	15	Mitjana
26	15	Mitjana
27	15	Mitjana
28	12	Petita blanca
29	12	Petita granulada
30	12	Mini
31	15	Mitjana
32	15	Petita blanca
33	15	Mini
34	20	Petita granulada
35	20	Petita granulada
36	20	Petita granulada
37	20	Mitjana
38	22	Petita blanca
39	22	Petita blanca
40	22	Petita blanca
41	22	Mini
42	22	Mini
43	25	Petita-mitjana
44	25	Petita blanca
45	25	Petita blanca
46	25	Mini
47	25	Mini
48	25	Mini
49	20	Petita blanca
50	20	Petita blanca
51	20	Petita blanca
52	20	Mitjan
53	20	Gran
54	20	Gran
55	20	Mitjana
56	20	Petita blanca
57	20	Petita blanca
58	20	Petita-mitjana
59	20	Gran

Verd → Mutants aïllats amb perfil genètic igual a la soca de *Saccharomyces cerevisiae* P29 i morfologia de colònia de mida mitjana i gran.

Gris → Mutants aïllats amb perfil genètic diferent a la soca de *Saccharomyces cerevisiae* P29 (lletra vermella) i/o morfologia de colònia de mida petita blanca o groga.

Annex V: Classificació dels aïllats obtinguts mitjançant el tractament amb EMS.

AÏLLAT	CONCENTRACIÓ EMS	MORFOLOGIA
A	5%	Mitjana
B	5%	Mitjana estrellada
C	5%	Mitjana
D	5%	Mitjana estrellada
E	5%	Mitjana estrellada
F	5%	Gran
G	5%	Mitjana blanquinosa
H	5%	Petita
I	5%	Petita blanquinosa
J	5%	Petita groga
K	5%	Mini
L	6%	Mitjana
M	6%	Mitjana
N	6%	Mitjana arrugada
O	6%	Mitjana arrugada
P	6%	Mitjana arrugada
Q	6%	Mitjana
R	6%	Mitjana
S	6%	Petita
T	6%	Petita
U	6%	Petita
V	6%	Mini
W	5%	Petita amb bony

Verd → Mutants aïllats amb perfil genètic igual a la soca de *Saccharomyces cerevisiae* P29 i morfologia de colònia de mida mitjana i gran.

Gris → Mutants aïllats amb perfil genètic diferent a la soca de *Saccharomyces cerevisiae* P29 (**lletra vermella**) i/o morfologia de colònia de mida petita blanca o groga.