

Iratxe Mejias Fernández

**EFEECTO DE LAS MANOPROTEÍNAS DE LEVADURA EN
LA RESPUESTA A ESTRÉS DE *OENOCOCCUS OENI***

TRABAJO DE FINAL DE MÁSTER

Dirigido por: Cristina Reguant Miranda

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

Facultad de Enología



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

Junio de 2023

Índice

Abstract	4
Resumen	5
1. Introducción.....	6
1.1 La fermentación maloláctica.....	6
1.2 Factores de estrés del vino	7
1.3 Manoproteínas de levadura y su uso en bodega.....	8
1.4 Manoproteínas y fermentación maloláctica.....	8
1.5 Metabolismo de la manosa en <i>Oenococcus oeni</i> y posible relación con la respuesta a estrés	9
2. Hipótesis	10
3. Objetivo	10
4. Materiales y métodos	11
4.1 Cepas, medios de cultivo y manoproteínas.....	11
4.2 Curvas de crecimiento	12
4.3 Condiciones de estrés	12
4.4 Análisis de la concentración de manosa	13
4.5 Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	13
4.6 Análisis estadístico.....	14
5. Resultados y discusión	14
5.1 Crecimiento de <i>O. oeni</i> VP41 y PSU-1	14
5.2 Viabilidad y supervivencia de VP41 y PSU-1	15
5.3 Evaluación del consumo de manosa por parte de <i>O. oeni</i>	17
5.4 Análisis transcripcional de genes de <i>O. oeni</i> relacionados con la utilización de manosa y la respuesta a estrés	18

6. Conclusiones y perspectivas	22
Agradecimientos	23
Bibliografía.....	24
Anexos.....	28

Abstract

Recently, the use of commercial mannoprotein extracts in malolactic fermentation has been studied. In this work, the protective effect of adding a commercial mannoprotein extract during the MRS broth cultivation of VP41 (Lallemand) and PSU-1 (ATCC BAA-331) *Oenococcus oeni* strains was tested under different stress conditions: pH (pH 3.2), ethanol (14% (v/v)), and low temperature (4°C).

The results show that the addition of this product has a positive effect on the cell survival of the strains under acid and low-temperature shocks. PSU-1 strain achieved around 95% survival, while VP41 strain had only achieved the half of that. This study was complemented with a transcriptional analysis of *manA*, *manB*, *ptsI*, *ptsH*, and *hsp18* genes related to carbohydrate transport and a stress protein synthesis. The VP41 strain showed overexpression of the genes *manB*, *ptsI*, and *hsp18* in different cases. These results were not observed in PSU-1, as it showed no differences in the expression compared to reference values, and in some cases, there was even an inhibition of these genes. This study shows that PSU-1 is more resistant to the applied stress conditions in this work compared to the VP41 strain, which shows lower survival as well as overexpression of carbohydrate transport and stress response genes.

Key words: mannoprotein, *Oenococcus oeni*, cell survival, stress response.

Resumen

Recientemente, se ha empezado a estudiar el uso de extractos de manoproteína comercial en fermentación maloláctica. En este trabajo se ha comprobado el efecto protector de la adición de un extracto de manoproteína comercial durante el cultivo en medio MRS de las cepas VP41 (Lallemand) y PSU-1 (ATCC BAA-331) de *Oenococcus oeni* cuando es sometida a diferentes condiciones de estrés: pH (pH 3,2), etanol (14% (v/v)) y baja temperatura (4°C).

Los resultados muestran que la adición de dicho producto ejerce un efecto positivo en la supervivencia celular de las cepas cuando están sometidas a los choques de ácido y baja temperatura. La cepa PSU-1 obtuvo alrededor del 95% de supervivencia mientras que en VP41 fue de la mitad. Se complementó este estudio con un análisis transcripcional de los genes *manA*, *manB*, *ptsI*, *ptsH* y *hsp18* relacionados con el transporte de carbohidratos y la síntesis de una proteína de estrés. La cepa VP41 mostró sobreexpresión de los genes *manB*, *ptsI* y *hsp18* en diferentes casos. Estos resultados no se vieron en PSU-1 ya que mostró una expresión sin diferencias significativas respecto los valores de referencia, incluso en algunos casos se vio una inhibición de estos genes. En este estudio se demuestra que PSU-1 es más resistente a las condiciones de estrés aplicadas en este trabajo respecto la cepa VP41 la cual muestra menos supervivencia además de una sobreexpresión de los genes de transporte de carbohidratos y respuesta a estrés.

Palabras clave: manoproteína, *Oenococcus oeni*, supervivencia celular, respuesta a estrés.

1. Introducción

1.1 La fermentación maloláctica

La fermentación maloláctica (FML) es un proceso bioquímico que se da en algunas bebidas fermentadas por parte de las bacterias lácticas (BAL). Es un proceso muy común en el vino y la sidra ya que aporta ciertas características positivas como un ligero aumento del pH, estabilidad microbiana y una mejora en las características organolépticas del producto final (Davis et al., 1985; Sumby et al., 2019). En el caso del vino, este proceso es especialmente interesante en vinos tintos y en blancos de elevada acidez.

La FML consiste en una descarboxilación del ácido L-málico dando lugar al ácido L-láctico, el cual es ligeramente menos ácido que el primero. Esta reacción tiene lugar habitualmente de manera secuencial después de la fermentación alcohólica (FA) y es llevada a cabo en el vino principalmente por *Oenococcus oeni*, una bacteria láctica que prácticamente sólo se encuentra en ambientes relacionados con la elaboración de vino y sidra. Al finalizar la FA por parte de *Saccharomyces cerevisiae* principalmente, en el vino quedan pocos nutrientes además de contar con un pH bajo y una concentración de etanol elevada. Este ambiente no es favorable para el crecimiento de la gran mayoría de microorganismos, exceptuando algunas bacterias como las BAL, más concretamente *O. oeni*, la cual es resistente a estos tipos de estrés (Cinquanta et al., 2018; Guzzon et al., 2009; Sumby et al., 2019).

La FML se puede llevar a cabo de forma espontánea o mediante uso de cultivos iniciadores. Debido a todos los factores de estrés en los que se encuentran las bacterias, es posible que la fermentación se ralentice o en el peor de los casos, que dé lugar una parada de la fermentación. El uso de cultivos iniciadores es una buena alternativa, pero aún existe riesgo a una pérdida de viabilidad en la inoculación. Para evitarlo, existen diferentes estrategias: la inoculación secuencial levadura-BAL, la co-inoculación de dos especies diferentes de BAL y la adición de nutrientes o productos al cultivo iniciador que preparen las membranas de las células para los factores de estrés que se pueden encontrar en el vino (Hua et al., 2009).

1.2 Factores de estrés del vino

Al finalizar la FA, el vino cuenta con una serie de características fisicoquímicas que inhiben en cierta medida la FML y el crecimiento de *O. oeni*. Los principales parámetros que inducen un estrés en *O. oeni* son la elevada concentración de etanol (puede llegar a 16% v/v), el pH bajo (3,0-3,5), las bajas temperaturas (pueden bajar de los 12°C en bodega), el dióxido de azufre (50-100 mg/L), los ácidos grasos de cadena corta (C₁₀, C₁₂) y la ausencia de nutrientes debido a su consumo durante la FA (Betteridge et al., 2015; Yang et al., 2021). Por este motivo es recomendable usar cultivos iniciadores de *O. oeni* para llevar a cabo la FML. A pesar de la tolerancia de *O. oeni* a estos tipos de estrés, en la inoculación, puede haber una pérdida de viabilidad y consecuentemente un retraso en el inicio de la FML.

La variación de la viabilidad de *O. oeni* al estar sometida a factores de estrés ha sido estudiada por Chu-ky, 2005, donde concluyen que la viabilidad de *O. oeni* está directamente relacionada con la capacidad de mantener correctamente la función de la membrana celular. Existen diferentes mecanismos de estrés que consisten en la modulación de la membrana o la síntesis de proteínas de estrés. Uno de los mecanismos de respuesta a estrés es la activación de las ATPasas, que regulan la homeostasis del pH y evitan una acidificación intracelular (Betteridge et al., 2015). Otra manera que tiene *O. oeni* de protegerse frente al estrés celular es la síntesis de proteínas de estrés como la Lo18, codificada por el gen *hsp18*, la cual actúa como chaperona y está relacionada con un choque térmico (Nakamoto & Vigh, 2007; Olgún et al., 2019).

1.2.1 Efecto del pH

El pH óptimo de crecimiento de *O. oeni* es de 4,3-4,8 (Britz & Tracey, 1990). Una acidificación del medio provoca una modificación reversible de la membrana celular en *O. oeni*, a pesar de este hecho, tiene la capacidad de crecer a un pH de 3,2 por lo que la hace resistente a este tipo de estrés (Betteridge et al., 2015; G-Alegría et al., 2004). La FML ocurre de manera más lenta a pH inferiores a 3,4 (Cinquanta et al., 2018), por lo tanto, es importante realizar una buena selección de cepas o emplear estrategias de inoculación para mantener un buen rendimiento de la fermentación.

1.2.2 Efecto del etanol

La exposición a etanol provoca una desestabilización de los lípidos de la membrana celular, haciéndola más fluida y permeable. Esto provoca una disminución considerable

de la viabilidad de *O. oeni* al ser inoculada en el vino (Graça Da Silveira et al., 2002; Sumbly et al., 2019). Se considera un microorganismo con tolerancia al etanol, pero a concentraciones mayores a 10% (v/v) de etanol sumado de un ambiente con un pH ácido, hace que la membrana de *O. oeni* se desestabilice provocando muerte celular (Chu-ky, 2005; Graça Da Silveira et al., 2002).

1.2.3 Efecto de la baja temperatura

Las bajas temperaturas provocan un ordenamiento de los lípidos de la membrana haciendo que ésta se vuelva rígida. En Chu-ky, 2005 también evaluaron el efecto que tenía el frío sobre cultivos de *O. oeni* y se observó que la bacteria conservaba casi el 100% de su viabilidad. Además, se observó que al mantener a temperaturas bajas los crecimientos donde se le había aplicado un choque de etanol, la membrana plasmática de las células recuperaba parcialmente su rigidez mejorando a su vez la viabilidad.

El momento y duración de la FML depende en muchos casos de la zona vitivinícola. En esas zonas donde la vendimia ocurre más tarde (finales de septiembre u octubre) o en lugares que se encuentran en mayores alturas, el frío puede considerarse un factor de estrés si la bodega no cuenta con salas climatizadas para llevar a cabo la FML.

1.3 Manoproteínas de levadura y su uso en bodega

Las manoproteínas son unas macromoléculas compuestas por un 90% de manosa y un 10% de parte proteica, generalmente aminoácidos (De Felice et al., 2020). Se encuentran de manera natural en la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, que al finalizar la fermentación, se produce una lisis celular liberando las manoproteínas en el vino.

Además de las manoproteínas liberadas en el vino de forma natural, algunas bodegas optan por añadir extractos de manoproteína purificada ya que aporta ciertas características organolépticas positivas (Guadalupe et al., n.d.; Li et al., 2018). Por ejemplo, en el trabajo de Rinaldi et al., 2021, se relacionó la adición de manoproteínas con una disminución de la astringencia y amargor de los vinos estudiados.

1.4 Manoproteínas y fermentación maloláctica

El efecto de las manoproteínas comerciales en las características físico-químicas y sensoriales del vino está bien descrito. Recientemente se ha empezado a estudiar el

posible efecto que tienen las manoproteínas frente a *O. oeni* y por consecuencia, en la fermentación maloláctica.

Un estudio reciente, dio nueva información sobre la utilización de extractos de manoproteínas por parte de *O. oeni* durante la FML (Balmaseda et al., 2021). Se vio que la bacteria era capaz de metabolizar la manoproteína cuando se añadía en vino sintético hecho que provocara una mejora en la FML. Además, los genes relacionados con el transporte de manosa y otros azúcares se sobreexpresaron en presencia de ésta.

1.5 Metabolismo de la manosa en *Oenococcus oeni* y posible relación con la respuesta a estrés

El metabolismo de carbohidratos de *O. oeni* está bien estudiado (Balmaseda et al., 2021; Cibrario et al., 2016; Jamal et al., 2013; Lorca et al., 2007). Los sistemas fosfoenolpiruvato (las siglas en inglés, PEP) y fosfotransferasas (las siglas en inglés, PTS), son los más importantes en cuanto al metabolismo de carbohidratos y azúcares de *O. oeni* (Jamal et al., 2013). Concretamente, el sistema de PTS juega un papel muy importante ya que son proteínas integrales de membrana capaces de translocar los sustratos a través de la membrana mediante una cascada de fosforilación (Balmaseda et al., 2021). Este sistema, además de regular parte del metabolismo de carbohidratos, también participa en las respuestas a estrés y permite una rápida absorción de azúcares del medio sin necesidad de un gradiente de concentración. En varios trabajos se ha visto que las hexosas (manosa y fructosa), derivados de hexosas y oligosacáridos de hexosas son sustratos de *O. oeni* (Cibrario et al., 2016; Jamal et al., 2013).

Los genes que regulan el sistema PTS de *O. oeni* son muy diversos. Se ha visto que el gen *ptsI*, que codifica para la Enzima I (EI); y *ptsH*, que codifica para la proteína portadora de fosfato de histidina (HPr); están muy conservados en la mayoría de las cepas de *O. oeni*. Otros genes importantes en el sistema PTS son *manA*, *manB* y *manC*, que se sobreexpresan sobre todo en presencia de glucosa y manosa, en especial *manA* y *manB* (Balmaseda et al., 2021; Jamal et al., 2013). La activación de algunos de estos genes podría estar asociada a la mejora de la respuesta a las condiciones de estrés del vino (Balmaseda et al., 2021).

A parte del sistema PTS existen otros genes con importancia en la respuesta a estrés. El más importante es *hsp18*, que se encuentra sobreexpresado en aquellas cepas cuya supervivencia es mayor en condiciones vónicas (Olguín et al., 2019). El gen *hsp18* codifica para la proteína Lo18 (*small heat shock protein*) (Horwitz 1992 y Gyzzo 1994). Se sabe que este gen se expresa sobre todo cuando han pasado 24 horas des de el inicio de la fase estacionaria de *O. oeni* (Guzzo et al., 2000). La síntesis de la proteína Lo18 también se ve inducida en presencia de pH, etanol y cambios de temperatura (Darsonval et al., 2016). La función de esta proteína, que tiene actividad chaperona, es preservar la calidad y estructura de la membrana celular cuando ésta se expone a situaciones de estrés (Nakamoto & Vígh, 2007).

El estudio transcripcional de los genes que regulan el sistema PTS y la síntesis de proteínas de estrés como Lo18, es importante para poder seleccionar cepas resistentes a los ambientes de estrés como es el vino.

2. Hipótesis

La adición de un extracto de manoproteínas de levadura durante el crecimiento de *Oenococcus oeni* puede ejercer un efecto protector frente diferentes situaciones de estrés asociadas al vino. Este hecho podría ser útil para la obtención de cultivos iniciadores que mejoren la eficiencia de las fermentaciones malolácticas en bodega.

3. Objetivo

El objetivo principal de este trabajo es determinar el efecto que tiene la adición de un extracto de manoproteína comercial sobre la viabilidad de dos cepas de *O. oeni* cuando ésta está bajo condiciones de estrés.

Los objetivos secundarios del trabajo son:

- Determinar si hay diferencia en cuanto a la viabilidad y porcentaje de supervivencia de *O. oeni* cuando se le añade manoproteína durante el crecimiento y se aplican choques de pH (pH 3,2), etanol (14% (v/v)) y baja temperatura (4°C).

- Estudiar la expresión de diferentes genes de *O. oeni* relacionados con la metabolización de la manosa y de respuesta a estrés.

4. Materiales y métodos

4.1 Cepas, medios de cultivo y manoproteínas

4.1.1 Cepas de bacteria usadas

Para realizar este estudio, se usaron diferentes cepas de *O. oeni*. Concretamente, dos cepas: VP41 (Lallemand) y PSU-1 (ATCC BAA-331). Ambas cepas se mantenían a -80°C en glicerol y para su crecimiento se incubaron a 27°C con 10% de CO₂ durante 3 días.

4.1.2 Medios de cultivo

Para conseguir un crecimiento óptimo de *O. oeni* se emplea el medio MRS (Difco™ Lactobacilli MRS Broth, Becton, Dickinson and CO, Le Part de Claix, Francia). El medio MRS favorece el crecimiento de bacterias lácticas en general, pero para mejorar el crecimiento de *O. oeni*, se puede añadir 5g/L de D-Fructosa y 4 g/L de ácido D/L-málico (medio denominado MRSmf). En todas las preparaciones basadas en medio MRS usadas en este estudio, se ajustó el pH a 5 usando soluciones de HCl o NaOH concentradas. Para las curvas de crecimiento, se usó medio MRS líquido sin adicionar otros componentes y para la siembra de placas se usó medio MRSmf con 20g/L de agar.

4.1.3 Manoproteínas usadas en los crecimientos

Se evaluaron tres productos diferentes de extracto de manoproteína pura comercial (99% de pureza): α , β y γ . En estudios preliminares, se analizó la composición de estos tres productos y se observó que eran diferentes en cuanto a contenido de azúcares y proteínas. Se seleccionó el producto β para llevar a cabo los experimentos debido a que es el que más favorecía a *O. oeni* en el *screening* inicial.

El extracto de manoproteína se añadió durante los crecimientos de las diferentes cepas de *O. oeni* a una concentración de 2 g/L y en este caso se disolvió en el propio medio de crecimiento.

4.2 Curvas de crecimiento

Para llevar a cabo el estudio, es necesario que las cepas de bacteria lleguen a la fase estacionaria de crecimiento, para ello se hizo una curva de crecimiento para cada cepa. El experimento se realizó en botellas de 100 mL en MRS líquido con dos condiciones y por triplicado: control sin producto (C) y con el producto β (β). Se inoculó a una concentración inicial de $1 \cdot 10^5$ UFC/ml en cada una de las diferentes condiciones y en este caso el seguimiento se hizo tomando la densidad óptica a 600 nm cada 24 horas y crecimientos en placa sólo a tiempo inicial de inoculación (t_0) y a tiempo final una vez la densidad óptica era estable (t_f).

En todos los crecimientos estuvo presente un control negativo con MRS sin ninguna cepa de *O. oeni* inoculada y sin ningún producto añadido. Las placas se incubaron a 27°C con 10% de CO₂ durante 7 días.

En paralelo a los crecimientos, se usó parte del volumen de la condición control para crear una nueva condición (C + β) donde se le añadió el producto β a una concentración de 2g/L antes de someterlas a condiciones de estrés.

4.3 Condiciones de estrés

Una vez las bacterias han llegado a la fase estacionaria de crecimiento, se dividieron los volúmenes en tubos de 10 mL para cada condición, réplica y tipo de estrés. Se aplicaron diferentes condiciones de estrés que comprometieran la viabilidad y tasa de supervivencia de las bacterias. Este procedimiento se hizo después del muestreo a t_f y tras 30 minutos se realizaron crecimientos en placa. La viabilidad se expresó como unidades formadoras de colonia (UFC/mL) en placa y la tasa de supervivencia como el porcentaje entre la viabilidad a t_f y la viabilidad tras la aplicación de las condiciones de estrés.

4.3.1 Estrés por pH 3,2

Esta condición de estrés consiste en una bajada de pH de 5 a 3,2 añadiendo una solución de HCl 2M. Se comprobó el pH al final del proceso.

4.3.2 Estrés por etanol 14% (v/v)

Para lograr una concentración de etanol del 14% v/v, se añadieron 1400 μ L de etanol puro en cada tubo de 10 ml, lentamente y agitando por inversión.

4.3.3 Estrés por frío (4°C)

Los tubos de 10 mL se mantuvieron en la cámara fría a 4°C durante 30 minutos. Pasado ese tiempo se tomó la muestra para los crecimientos en placa.

4.4 Análisis de la concentración de manosa

Al finalizar los crecimientos, se guardaron los sobrenadantes de MRS de cada muestra a t_f y se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis. El método de cuantificación se basa en el elaborado en Quirós et al., 2011 adaptado a las muestras obtenidas. Se hizo una extracción e hidrólisis de los sobrenadantes con H₂SO₄ y posteriormente una cuantificación enzimática con el kit D-manosa D-glucosa K-MANGL (Megazyme, Wicklow, Irlanda).

4.5 Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Durante los crecimientos y después de aplicar estrés, se guardó el pellet de *O. oeni* de cada muestra. Se tomó 1 mL del medio de crecimiento a t_f y de cada estrés correspondiente (pH, etanol y baja temperatura) y se centrifugó a 8500 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue congelado con nitrógeno líquido y posteriormente guardado a -80°C hasta su posterior análisis. La extracción de ARN y el análisis transcripcional por RT-qPCR se hicieron siguiendo Balmaseda et al., 2021; Olguín et al., 2009.

Los pellets fueron lavados dos veces con 1 mL de tampón Tris-HCl 10 mM estéril a pH 8 centrifugando a 2000 x g durante 5 minutos. Después se resuspendió el pellet en 200 µL del mismo tampón con 50 mg/mL de lisozima (Roche Life Science, Mannheim, Alemania) y se incubó en un baño a 37°C durante 30 minutos. Se purificó el ARN siguiendo las instrucciones del kit *High Pure RNA Isolation Kit Version 13* (Roche Life Science).

Para limpiar los restos de ADN contaminante que puedan quedar en las muestras, se usó el TURBO DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la transcripción reversa (RT) del ARN purificado como se especifica en N. Olguín et al., 2009 usando un termociclador (Thermo Fisher,

Applied Biosystems). Se realizó una RT qPCR donde se evaluaron cinco genes: *manA*, *manB*, *ptsI*, *ptsH*, *hsp18*. Los cuatro primeros genes están relacionados con el metabolismo de la manosa, el último con la respuesta a estrés y a parte se usó el gen *gyrB* como control interno (gen constitutivo). Para obtener la expresión relativa de cada gen en las dos cepas se usó el método $\Delta\Delta C_t$ de Livak & Schmittgen, 2001.

4.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se hizo usando el software XLSTAT versión 2020.2.3 (Addinsoft, Paris, Francia). El análisis de varianza fue llevado a cabo por ANOVA con un test HSD de Tukey para determinar las diferencias significativas entre las muestras. El intervalo de confianza usado fue del 95% y el nivel de significancia estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

5. Resultados y discusión

5.1 Crecimiento de *O. oeni* VP41 y PSU-1

Se evaluó el efecto de la adición del extracto de manoproteína β sobre el crecimiento de las cepas PSU-1 y VP41 de *O. oeni*. Dicho extracto fue seleccionado en un estudio preliminar puesto que mostró un mejor resultado que otros productos probados. En la Figura 1 se representa la densidad óptica a 600 nm a lo largo del tiempo de los crecimientos para ambas cepas. No se aprecia ningún efecto de la adición del extracto de manoproteína β en los crecimientos, ya que las condiciones C y β crecen siguiendo una tendencia similar hasta el inicio de la fase de latencia. La cepa VP41 (Figura 1B) alcanza el punto máximo de crecimiento en 5 días y PSU-1 en 6 días. Son crecimientos más lentos debidos a la ausencia de fructosa y compuestos reductores beneficiosos para *O. oeni*, cuyo crecimiento se ve favorecido por la presencia de fructosa y glucosa en el medio de cultivo (Zhang & Lovitt, 2005).

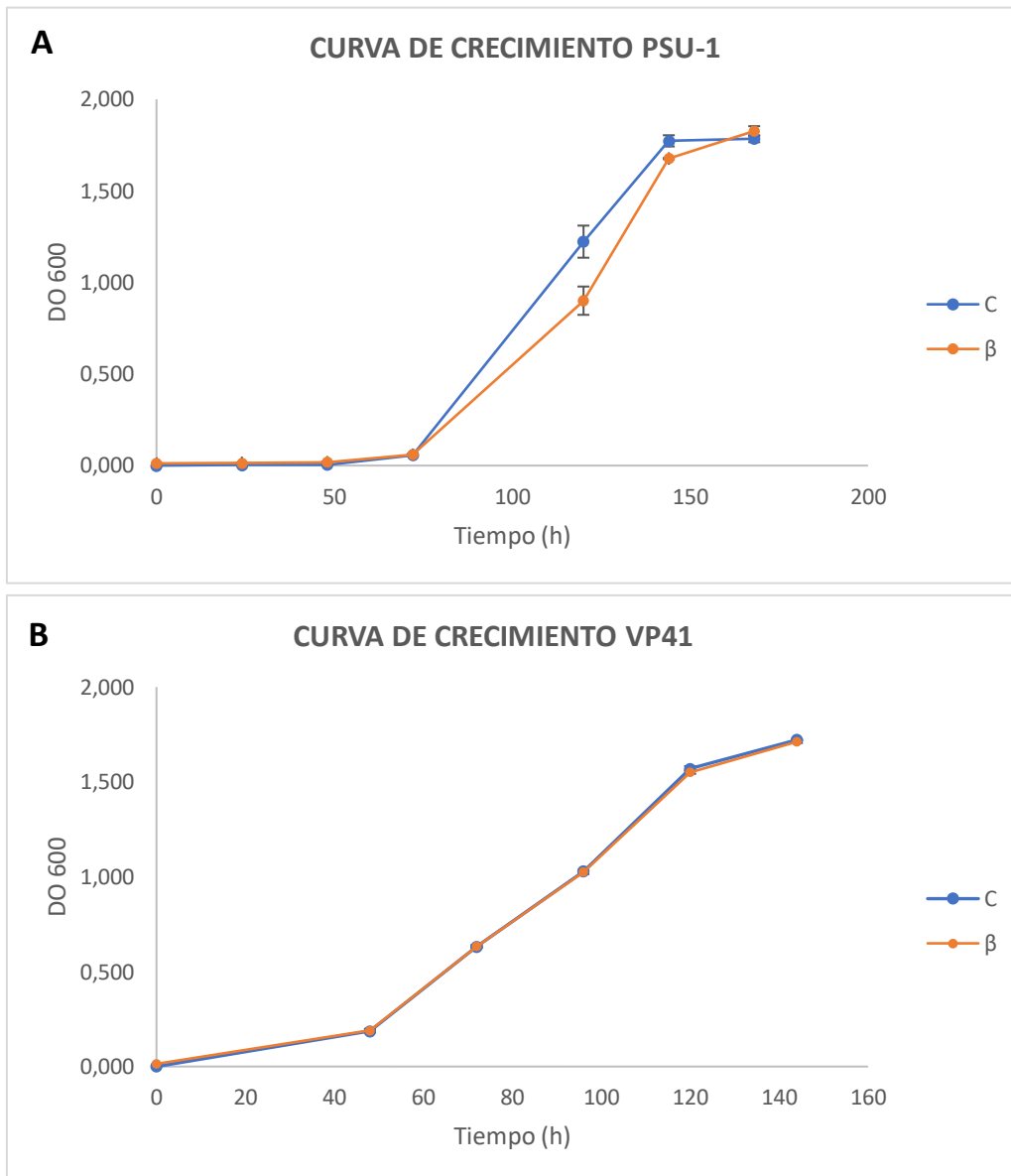


Figura 1. Densidad óptica a 600nm de las condiciones Control (C) y con producto (β) de las cepas PSU-1 (A) y VP41 (B).

5.2 Viabilidad y supervivencia de VP41 y PSU-1

Una vez ambas cepas llegaron a su fase estacionaria, en el momento que la densidad óptica se estabiliza, se aplicaron diferentes condiciones de estrés (pH, etanol y baja temperatura), se analizó la viabilidad y supervivencia de cada condición, estrés y cepa. La supervivencia de las cepas PSU-1 y VP41 para las tres condiciones de estrés estudiadas se muestra en la *Figura 2*. Se puede ver como la adición de etanol 14% (v/v) fue la condición de estrés que más efecto negativo tuvo sobre la viabilidad de las dos cepas. En

cambio, la aplicación de frío es la condición que menos efecto tuvo sobre la supervivencia, especialmente en la cepa VP41. Este efecto negativo también fue observado por Cibrario et al., 2016; Jamal et al., 2013.

En aquellas condiciones de la cepa PSU-1 donde se le había añadido el producto al inicio del crecimiento y donde se aplicó un choque ácido y frío, obtuvieron los mejores resultados de supervivencia, prácticamente del 100%. Se puede ver como este resultado muestra diferencias significativas respecto la cepa VP41 en las mismas condiciones.

La condición control donde se le añadió el producto β a final de crecimiento (t_f) (C + β), sigue prácticamente la misma tendencia que las condiciones controles de sus respectivas condiciones de estrés y cepas. En resumen, la adición del extracto de manoproteína antes de someter a *O. oeni* a estrés, no provoca ningún efecto significativo en la supervivencia, en cambio, la adición de este producto al inicio de los crecimientos permite mantener mejor la viabilidad en condiciones de pH y temperaturas bajas para las dos cepas. Por este motivo, se descartó la condición control con producto (C+ β) en posteriores análisis.

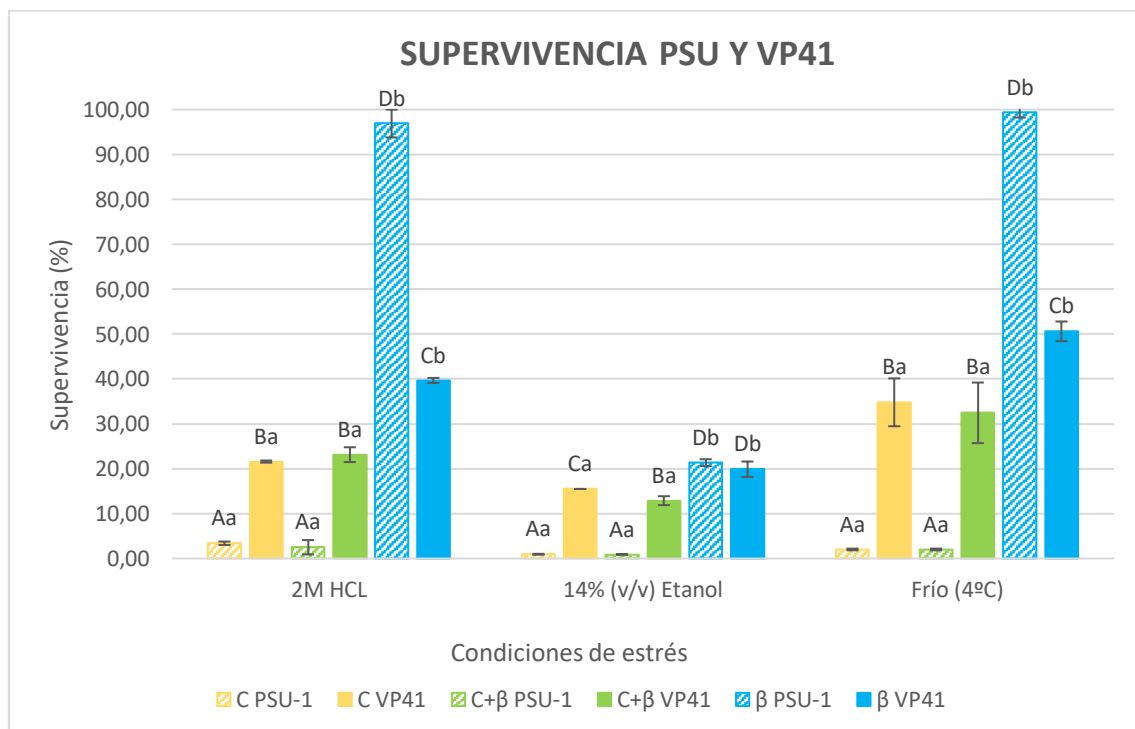


Figura 2. Supervivencia representada en porcentaje de las cepas *O. oeni* PSU-1 y VP41 a los 30 minutos de haber aplicado las condiciones de estrés: 2M HCl pH 3,2, 14% (v/v) etanol y frío (4°C). Los resultados son la media de los triplicados, las etiquetas con letra mayúscula (A, B, C, D) representan las diferencias significativas entre condiciones independientemente de la cepa y las etiquetas con letra minúscula (a, b, c, d) representan diferencias significativas entre condiciones de cada cepa según ANOVA, test Tuckey $p < 0,05$.

5.3 Evaluación del consumo de manosa por parte de *O. oeni*

En (Balmaseda et al., 2021) se vio que *O. oeni* es capaz de metabolizar manosa procedente de extractos de manoproteína durante la FML.

Los resultados del análisis, indican que en el medio MRS se encuentra una pequeña parte de manosa que *O. oeni* puede consumir, probablemente del extracto de levadura que contenía el medio. En el caso de aquellas condiciones donde se le había añadido el extracto de manoproteína a final de crecimiento (C + β), no hay prácticamente consumo siendo 0,0 g/L en el caso de la cepa VP41. En cambio, cuando el producto había sido añadido al inicio de los crecimientos (β), se consume una pequeña parte de manosa, siendo 54 mg/L en PSU-1 y 21 mg/L en VP41 (Tabla 1). En trabajos previos del grupo pendientes de publicación, se evaluó la capacidad de diferentes cepas para consumir manoproteína, donde se observó que PSU-1 era ligeramente más consumidora que VP41. Esta información concuerda con los datos obtenidos en este análisis. El consumo de manosa por parte de estas cepas sigue siendo bajo, en Cibrario et al., 2016; Jamal et al., 2013 indican que esta especie tiene preferencia por diferentes azúcares y carbohidratos, es por eso que *O. oeni* podría estar consumiendo otros substratos provenientes del medio MRS.

Tabla 1. Consumo de equivalentes de manosa de PSU-1 y VP41 de las muestras control (C) y las muestras con producto (C + β y β) respecto las condiciones iniciales (MRSi y MRS + β i). Los resultados son las medias de los triplicados de las diferentes condiciones.

Consumo de manosa PSU-1		
Muestra	Manosa (mg/L)	Consumo de equivalentes de manosa (mg/L)
MRS i	229	
MRS + βi	981	
C	128 \pm 9,00	41,0 \pm 4,00
C+β	898 \pm 8,00	28,0 \pm 3,00
β	846 \pm 38,0	54,0 \pm 15,0
Consumo de manosa VP41		
Muestra	Manosa (mg/L)	Consumo de equivalentes de manosa (mg/L)
MRS i	225	
MRS + βi	961	
C	182 \pm 5,00	17,0 \pm 9,00
C+β	966 \pm 7,00	0,00 \pm 0,00
β	920 \pm 2,00	21,0 \pm 1,00

Para completar este análisis sería conveniente realizar una caracterización y cuantificación de otros azúcares del medio empleado, así como del posible uso por parte de *O. oeni* de los aminoácidos presentes en las manoproteínas. En estudios previos del grupo con vino blanco sintético se apreció un mayor consumo de la manoproteína durante la FML con las mismas cepas de *O. oeni*, pero dado que en este caso se ha estudiado la fase de crecimiento (no FML) en medio rico, es posible que las células no tengan la necesidad de consumir el producto que se le ha añadido y tengan otro tipo de nutrientes disponibles para metabolizar. Sin embargo, el efecto notable observado sobre la supervivencia frente a los choques de estrés (pH y baja temperatura) denota que las manoproteínas tienen un impacto evidente sobre la mejora de la respuesta a estrés, a pesar de que el consumo de manosa haya sido mínimo. La presencia de dichas manoproteínas podría estar activando mecanismos de transporte de carbohidratos, peptidasa u otros que podrían mejorar la resistencia de *O. oeni*.

5.4 Análisis transcripcional de genes de *O. oeni* relacionados con la utilización de manosa y la respuesta a estrés

Los resultados del análisis transcripcional se muestran en la *Figura 3*. Se considera que hay una sobreexpresión de genes significativa cuando la expresión relativa de éstos (expresada como fold change, FC) supera el valor 2, y una inhibición de la expresión cuando es inferior a 0,5 (marcados ambos valores con línea discontinua). Para el análisis se seleccionaron las condiciones control (C) y producto (β) a t_f y las condiciones control y producto después de haber aplicado el choque con ácido (CpH y β pH respectivamente) de cada cepa. Se tomaron diferentes muestras de referencia para calcular los valores de expresión relativa de las muestras y así evaluar tres aspectos diferentes: efecto de la adición de extracto de manoproteína β (*Figura 3A*), efecto del pH (2M HCl pH 3,2) (*Figura 3B*) y efecto de ambos combinados (*Figura 3C*).

Por un lado, en la cepa PSU-1 no se observa sobreexpresión en ninguno de los genes estudiados en ninguna de las representaciones, en su lugar, algunos genes se encuentran por debajo de 0,5 lo que indica una inhibición. Esto no significa que no haya expresión, sino que PSU-1 tiene una expresión que no es significativamente diferente en las condiciones de estrés respecto las muestras de referencia. Como se ha comentado en el apartado anterior (5.3 Evaluación del consumo de manosa por parte de *O. oeni*, el

consumo de manoproteína fue muy poco por parte de las dos cepas (sobre todo PSU-1). Esto sugiere que la adición de este producto y la aplicación un choque de pH (pH 3,2) no genera una respuesta de estrés que pueda apreciarse en base a los genes estudiados. Es decir, al menos la cepa PSU-1 puede lograr sobrevivir a esas condiciones de estrés sin necesidad de sobreexpresar los genes de respuesta a estrés (*hsp18*) ni los genes del sistema PTS (*manA*, *manB*, *ptsI*, *ptsH*), aunque probablemente sí esté activando otros mecanismos de respuesta a estrés no evaluados en este trabajo.

En la *Figura 3A*, se representa el efecto que tiene la adición de extracto de manoproteína tantes de las condiciones de estrés (β vs C) y cuando se le ha aplicado un choque de ácido (β pH vs CpH). En el primer caso, se detecta una sobreexpresión del gen *manB* en la cepa VP41 cuando se añade extracto de manoproteína al inicio del crecimiento. El gen *manB* codifica para una permeasa PTS activa cuya función es translocar azúcares del medio al interior. Se ha descrito que el gen *manB* se sobreexpresa en *O. oeni* cuando ésta crece en medios ricos en glucosa y fructosa (Cibrario et al., 2016). Por otro lado, si comparamos esto mismo una vez aplicado el choque (β pH vs CpH), el gen que se sobreexpresa es el *hsp18*. Esto indica que la bajada de pH logra poner en situación de estrés a la cepa VP41 aún añadiendo manoproteína en el medio, ya que este gen está relacionado con la respuesta a estrés de *O. oeni* (Guzzo et al., 2000; Olguín et al., 2009). Por otro lado, en este gráfico se observa que, en los genes *manA* y *hsp18* de las dos condiciones representadas, los valores de fold change (FC) están por debajo de 0,5 puntos en la cepa PSU-1, lo que indica que esos genes presentan una expresión ligeramente menor en esas condiciones respecto a la condición de referencia.

El efecto del pH se muestra en la *Figura 3B*. En este caso, se representan aquellas muestras que han recibido el choque de pH comparado con ellas mismas antes de la aplicación de la condición de estrés, con y sin la adición de producto β (β pH vs β ; CpH vs C). Se observa una sobreexpresión del gen *manB* en la condición control y una sobreexpresión de los genes *ptsI* y *hsp18* en las muestras que llevaban producto en VP41. Se activaron algunos genes del sistema PTS independientemente de si la muestra llevaba producto o no durante el choque ácido y además también el gen *hsp18* sólo cuando había presencia del extracto de manoproteína. Esto sugiere que un choque de pH 3,2 provoca estrés en la cepa VP41 del que la expresión de *hsp18* es el indicador. Si se compara este hecho con la *Figura 2*, VP41 tuvo menos supervivencia a la aplicación de ácido que PSU-1 en que esta última tampoco muestra sobreexpresión del sistema PTS ni del gen de estrés *hsp18*. Puede ser

que la respuesta a estrés de PSU-1 se refleje en otros genes no estudiados en este trabajo y por ello se aprecia una expresión sin diferencias o incluso una ligera menor expresión de algunos de los genes estudiados.

Por último, en la *Figura 3C* se puede ver el efecto combinado de las dos condiciones anteriores: el efecto de la adición de producto y el choque ácido. De nuevo se observa que en la cepa VP41 hay sobreexpresión de los genes *ptsI* y *hsp18*. Esto concuerda con las gráficas de la *Figura 3 A y B* donde para la misma cepa había sobreexpresión de estos mismos genes donde se evaluaba el efecto del pH y de la adición de producto por separado.

En resumen, la adición de extracto de manoproteína en el medio durante el crecimiento de *O. oeni* provoca una sobreexpresión en los genes *manB* y *ptsI*. Dado que las cepas VP41 y PSU-1 tenían mayor supervivencia frente a las condiciones de estrés cuando se le añadía un producto, estos genes pueden tener un rol importante en cuanto a la respuesta a estrés y supervivencia de *O. oeni*. Ambos genes codifican para unas fosfotransferasas integrales de membrana del sistema PTS, las cuales participan activamente en el metabolismo de carbohidratos como la glucosa, fructosa y manosa de esta especie (Cibrario et al., 2016; Jamal et al., 2013).

El hecho de que en la cepa PSU-1 no haya habido sobreexpresión de estos genes puede ser por varias razones, por un lado, esta cepa estaría activando otros mecanismos de estrés y genes diferentes a los estudiados, se conoce que la respuesta a estrés puede ser variable en función de la cepa en *O. oeni*. Por otro lado, al estar creciendo en un medio rico como es el MRS, tiene disponibilidad plena de nutrientes que han podido jugar un papel para su supervivencia junto a la manoproteína.

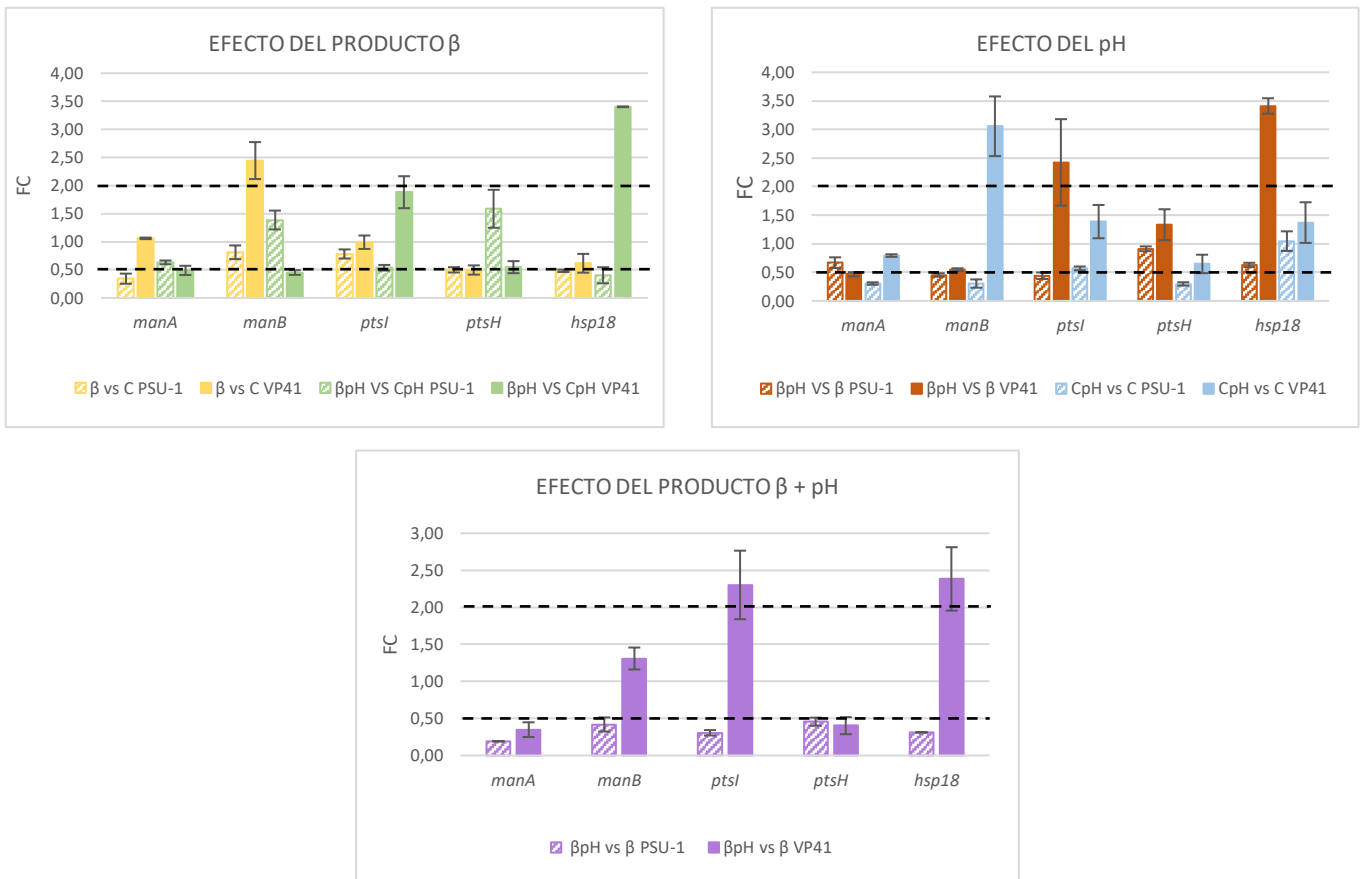


Figura 3. Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ expresado en fold change, FC) de los genes *manA*, *manB*, *ptsI*, *ptsH*, *hsp18* de las muestras de los crecimientos con producto (β), control y muestra con producto añadido después de recibir el choque ácido (CpH y β pH respectivamente) de cada cepa comparándolas con diferentes muestras de referencia donde se evalúan tres parámetros: efecto del producto β (A), efecto del pH (B) y efecto de ambos a la vez (C). Las líneas discontinuas indican sobreexpresión (2 puntos) e inhibición de genes (0,5 puntos) de manera significativa.

6. Conclusiones y perspectivas

La adición del extracto de manoproteína β durante los crecimientos de las cepas VP41 y PSU-1 ejerce un efecto protector frente a las condiciones de estrés de bajo pH (3,2) y baja temperatura (4°C), siendo este efecto mayor en la cepa PSU-1. Además, para lograr dicho efecto, se requiere que la manoproteína sea añadida al inicio del crecimiento ya que aquellas condiciones donde se había adicionado en el momento de realizar los choques, mostraron la misma supervivencia que las condiciones control. Por ese motivo se descarta que la manoproteína ejerza función protectora a nivel físico (no metabólico).

A pesar de aumentar la supervivencia frente a condiciones de estrés, las cepas VP41 y PSU-1 no mostraron un consumo significativo de manoproteína, lo que sugiere que pueden estar consumiendo otros azúcares disponibles en el medio o bien que el propio medio de cultivo sea una interferencia en el momento de realizar la cuantificación de manosa. Por ello, se propone realizar otros métodos de cuantificación de dicho compuesto y a la vez de otros azúcares preferentes para *O. oeni*.

En cuanto al análisis transcripcional, PSU-1 mostró una activación muy leve o incluso inhibitoria de los cuatro genes del sistema PTS estudiados (*manA*, *manB*, *ptsI* y *ptsH*) y del gen de estrés *hsp18*, en cambio, la cepa VP41 si logró sobreexpresar los genes *ptsI* y *hsp18* en la condición de estrés de pH y con producto añadido. Para poder hacer un mejor análisis de la respuesta a estrés de estas cepas, sería necesario escoger un mayor número de genes que puedan participar en esta respuesta además de realizar este mismo análisis para las condiciones de estrés restantes en este estudio: etanol 14% (v/v) y frío (4°C). Una opción interesante sería realizar estudios transcriptómicos para observar la respuesta global.

Por último, el objetivo de este trabajo era saber la eficacia de las manoproteínas en la supervivencia de *O. oeni*. En los próximos estudios, se evaluará este mismo efecto aplicado a inóculos en vino sintético y posteriormente en vino natural.

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a todo el equipo de los laboratorios 119-120, en especial a Paloma por su ayuda, paciencia y consejos.

También agradecer a mi tutora académica, la Dra. Cristina Reguant por brindarme la oportunidad y haber hecho posible la realización de este trabajo.

A mi familia por nunca dejar de confiar en mi y a mis compañeros y amigos que me he llevado del Máster en Bebidas Fermentadas, gracias.

Bibliografía

- Balmaseda, A., Anibaldi, L., Rozès, N., Bordons, A., & Reguant, C. (2021). Use of yeast mannoproteins by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation under different oenological conditions. *Foods*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/FOODS10071540/S1>
- Betteridge, A., Grbin, P., & Jiranek, V. (2015). Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends in Biotechnology*, *33*(9), 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.008>
- Britz, T. J., & Tracey, R. P. (1990). The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology*, *68*(1), 23–31. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1990.TB02544.X>
- Chu-ky, S. (2005). Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *1717*, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.015>
- Cibrario, A., Peanne, C., Lailheugue, M., Campbell-Sills, H., & Dols-Lafargue, M. (2016). Carbohydrate metabolism in *Oenococcus oeni*: a genomic insight. *BMC Genomics*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/S12864-016-3338-2>
- Cinquanta, L., De Stefano, G., Formato, D., Niro, S., & Panfili, G. (2018). Effect of pH on malolactic fermentation in southern Italian wines. *European Food Research and Technology*, *244*(7), 1261–1268. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3041-4>
- Darsonval, M., Msadek, T., Alexandre, H., & Grandvalet, C. (2016). The antisense RNA approach: A new application for in vivo investigation of the stress response of *Oenococcus oeni*, a wine-associated lactic acid bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(1), 18–26. <https://doi.org/10.1128/AEM.02495-15>
- Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., & Fleet, G. H. (1985). Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review. *American*

Journal of Enology and Viticulture, 36(4), 290–301.
<https://doi.org/10.5344/ajev.1985.36.4.290>

De Felice, D. V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., Lima, G., Visconti, A., & Castoria, R. (2020). Non-*Saccharomyces* in Winemaking: Source of Mannoproteins, Nitrogen, Enzymes, and Antimicrobial Compounds. *Fermentation* 2020, Vol. 6, Page 76, 6(3), 76. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6030076>

G-Alegría, E., López, I., Ruiz, J. I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., & Ruiz-Larrea, F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), 53–61. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00854-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00854-1)

Graça Da Silveira, M., Vitória, M., Romão, S., Loureiro-Dias, M. C., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2002). Flow Cytometric Assessment of Membrane Integrity of Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 68(12), 6087–6093. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6087-6093.2002>

Guadalupe, Z., Bel', B., Ayestar'an, B., & Ayestar'an, A. (n.d.). Effect of Commercial Mannoprotein Addition on Polysaccharide, Polyphenolic, and Color Composition in Red Wines. <https://doi.org/10.1021/jf801535k>

Guzzo, J., Jobin, M. P., Delmas, F., Fortier, L. C., Garmyn, D., Tourdot-Maréchal, R., Lee, B., & Diviès, C. (2000). Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), 27–31. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00209-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00209-9)

Guzzon, R., Poznanski, E., Conterno, L., Vagnoli, P., Krieger-Weber, S., & Cavazza, A. (2009). Selection of a new highly resistant strain for malolactic fermentation under difficult conditions. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 30(2), 133–141. <https://doi.org/10.21548/30-2-1433>

Hua, L., WenYing, Z., Hua, W., ZhongChao, L., & AiLian, W. (2009). Influence of culture pH on freeze-drying viability of *Oenococcus oeni* and its relationship

- with fatty acid composition. *Food and Bioproducts Processing*, 87(1), 56–61. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2008.06.001>
- Jamal, Z., Miot-Sertier, C., Thibau, F., Dutilh, L., Lonvaud-Funel, A., Ballestra, P., Le Marrec, C., & Dols-Lafargue, M. (2013). Distribution and Functions of Phosphotransferase System Genes in the Genome of the Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00380-13>
- Li, S., Bindon, K., Bastian, S., & Wilkinson, K. (2018). Impact of Commercial Oenotannin and Mannoprotein Products on the Chemical and Sensory Properties of Shiraz Wines Made from Sequentially Harvested Fruit. *Foods* 2018, Vol. 7, Page 204, 7(12), 204. <https://doi.org/10.3390/FOODS7120204>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Lorca, G. L., Barabote, R. D., Zlotopolski, V., Tran, C., Winnen, B., Hvorup, R. N., Stonestrom, A. J., Nguyen, E., Huang, L. W., Kim, D. S., & Saier, M. H. (2007). Transport Capabilities of Eleven Gram-positive Bacteria: Comparative Genomic Analyses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(6), 1342. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2007.02.007>
- Nakamoto, H., & Víggh, L. (2007). The small heat shock proteins and their clients. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(3), 294–306. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6321-2>
- Olguín, N., Bordons, A., & Reguant, C. (2009). Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology*, 26(2), 197–203. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2008.09.004>
- Olguín, N. T., Valdés, D., Hens, L., Delfederico, L., & Semorile, L. (2019). Relative expression of stress-related genes during acclimation at low temperature of psychrotrophic *Oenococcus oeni* strains from Patagonian wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(3), 5. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2577-6>

- Quirós, M., Morales, P., Pérez-Través, L., Barcenilla, J. M., & Gonzalez, R. (2011). A new methodology to determine cell wall mannoprotein content and release in wine yeasts. *Food Chemistry*, 125(2), 760–766. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.08.066>
- Rinaldi, A., Gonzalez, A., Moio, L., & Gambuti, A. (2021). Commercial Mannoproteins Improve the Mouthfeel and Colour of Wines Obtained by Excessive Tannin Extraction. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 4133, 26(14), 4133. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26144133>
- Sumby, K. M., Bartle, L., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2019). Measures to improve wine malolactic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(5), 2033–2051. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09608-8>
- Yang, K., Dai, X., Fan, M., & Zhang, G. (2021). Influences of acid and ethanol stresses on *Oenococcus oeni* SD-2a and its proteomic and transcriptional responses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7), 2892–2900. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10921>
- Zhang, D. S., & Lovitt, R. W. (2005). Studies on growth and metabolism of *Oenococcus oeni* on sugars and sugar mixtures. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 565–572. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02628.x>

Anexos

Anexo 1: protocolo de extracción de ARN de *Oenococcus oeni* y RT-qPCR.

(Balmaseda et al., 2021; N. Olgún et al., 2009)

Para realizar el aislamiento de ARN de *O. oeni* PSU-1 y VP41, se siguió el siguiente protocolo:

Pretratamiento de la muestra:

- Lavado del pellet con 1 mL de tampón Tris 10 mM estéril pH 8,00.
- Recolección de la muestra por centrifugación a $2000 \times g$ durante 5 minutos en una centrífuga estándar de mesa, descartar el sobrenadante.
- Resuspensión suave del pellet en 200 μ L de solución de Tampón Tris 10mM pH 8,00 con 50mg/ml de lisozima (Roche Life Science, Mannheim, Alemania).
- Incubación de la muestra durante 30 minutos en un baño a 37°C , para romper las paredes celulares bacterianas favoreciendo la extracción de los ácidos nucleicos.

Extracción de ARN de *O. oeni*. Kit de aislamiento de ARN de alta pureza, versión 13 (Roche Life Science):

- Adición a la muestra lisada de 400 μ L de Lysis/Binding Buffer [4,5 M guanidina-HCl, 50 mM, Tris-HCl, 30% Triton X-100 (p/v), pH 6,6 (25°C)].
- Colocar el tubo de filtro *High Pure* en el tubo de recolección y transferir la muestra en el depósito superior.
- Centrifugación de la muestra durante 15 segundos a $8000 \times g$.
- Descartar el sobrenadante del tubo colector y volver a colocar este último con el tubo de filtro.
- Adición de 500 μ L de *wash Buffer I* [clorhidrato de guanidina 5 M y Tris-HCl 20 mM , pH 6,6 (25°C)] al depósito superior (tubo del filtro) y centrifugar durante 15 segundos a $8000 \times g$.
- Desechar el sobrenadante del tubo colector y volver a colocar este último con el tubo filtro.

- Adición de 500 μ L de *Wash Buffer II* [(20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25°C)] al depósito superior (tubo del filtro) y centrifugar durante 15 segundos a 8000 \times g.
- Descartar el sobrenadante del tubo colector y volver a colocar este último con el tubo filtro.
- Adición de 200 μ L de *Wash Buffer II* al depósito superior del tubo del filtro y centrifugar durante 2 minutos a 16000 \times g.
- Desechar el tubo colector e insertar el tubo de filtro en un tubo Eppendorf de 1,5 mL limpio, estéril y libre de ARN-asa.
- Adición de 60 μ L de *Elution Buffer* al depósito superior del tubo del filtro, incubación de la muestra durante 2 minutos y centrifugación del conjunto del tubo durante 1 minuto a 8000 \times g.
- Desechar el tubo del filtro.
- El tubo Eppendorf de 1,5 mL, después de este procedimiento contiene el RNA; Se transfirieron 5 μ L del ARN a un tubo nuevo para su cuantificación con un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania); la muestra restante se almacenó a -80°C.

DNA-free kit

Para eliminar trazas de ADN contaminante del ARN extraído de *O. oeni* PSU-1 y VP41, que se usará para la qPCR en tiempo real, se ha utilizado el kit Invitrogen TURBO DNA-free.

Procedimiento empleado:

- Transferencia de 40 μ L de ARN en un tubo PCR Eppendorf de 1,5 mL .
- Adición de los reactivos de digestión de ADNasa a la muestra de ARN: consistían en 5 μ L de 10X TURBO DNaseTM Buffer, 0,5 μ L de TURBO DNaseTM Enzyme y 4,5 μ L de agua estéril libre de nucleasas. El volumen de reacción final es de 50 μ L.
- Incubación de la muestra a 37°C durante 30 minutos.

- Resuspensión del *DNase Inactivation Reagent* mezclando el tubo antes de su uso.
- Adición de 2 μL de *DNase Inactivation Reagent* a la muestra.
- Incubación de 5 minutos a temperatura ambiente con agitación suave cada poco tiempo para redistribuir la enzima.
- Centrifugación de la muestra durante 5 minutos a $10000 \times g$.
- Transferencia de la muestra a un nuevo tubo estéril.
- Conservación de la muestra a -80°C o en hielo para uso inmediato.

Transcripción inversa del ARN

Para convertir el ARN, que se extrajo de *O. oeni* PSU-1 y VP41 purificado en ADNc, se utilizaron reactivos de transcripción inversa Applied Biosystems™ TaqMan™; los reactivos están diseñados para la transcripción inversa (RT) de las poblaciones de ARN purificado.

Procedimiento empleado:

- Descongelación previa de los reactivos (a excepción de las enzimas, que se han mantenido a -20°C el mayor tiempo posible) y preparación de la RT *master mix* que consta de 4,4 μL de solución de MgCl_2 25 mM, 4,0 μL de mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno), 2,0 μL de tampón RT 10x, 1,0 μL de hexámeros aleatorios, 0,4 μL de inhibidor de ARNasa y 0,5 μL de transcriptasa inversa MultiScribe (se ha preparado una única mezcla para minimizar los errores de pipeteo).
- El volumen de reacción final es de 20 μL , de los cuales 12,3 μL son reactivos de transcripción inversa; el volumen restante (7,7 μL) se compone de agua libre de ARNasa y ARN. La concentración deseada del cDNA es de 10 ng/ μL : conociendo la concentración del RNA que se ha extraído (por medida espectrofotométrica) y el volumen de reacción final, se calcula el volumen de RNA a utilizar; luego se agregará tanta agua libre de ARNasa como sea necesario para llegar a 7,7 μL .
- Incubación de la reacción en termociclador (los parámetros de ciclo recomendados para el tipo de cebador seleccionado son 10 minutos a 25°C , 30 minutos a 37°C , 5 minutos a 95°C y 4°C indefinidamente) y almacenamiento de la muestra a -80°C hasta su uso.

PCR cuantitativa

- La reacción de qPCR en tiempo real se realizó en un volumen final de 25 μL , que contenía 5 μL de ADNc diluido (2 $\text{ng}/\mu\text{L}$, concentración final 0,4 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 7,5 μL del mix de primers (0,2 μM concentración final del mix) y 12,5 μL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.).
- Las reacciones se realizaron en MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific), que cuenta con una plataforma basada en la nube, que permite el seguimiento de las muestras y el análisis de conjuntos de datos sofisticados.
- Las condiciones de los ciclos térmicos se designaron de la siguiente manera: paso inicial a 50°C durante 2 minutos, seguido de un paso de activación de la polimerasa a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos para la desnaturalización, 60°C durante 1 minuto para el recocido y 72°C durante 30 segundos para la extensión.

Para analizar los datos obtenidos del experimento, se eligió el método de expresión relativa: en este estudio, de hecho, la determinación del número absoluto de copias del transcrito fue innecesaria y la observación del cambio relativo en la expresión se consideró más relevante (Livak & Schmittgen, 2001). El método de cuantificación relativa describe el cambio en la expresión del gen objetivo en relación con un grupo de referencia, que debe elegirse cuidadosamente para cada experimento.

El valor de umbral fue determinado automáticamente por el instrumento, y así se determinó un valor de ciclo de umbral (Ct) para cada medición: definido como el número de ciclos necesarios para alcanzar un punto en el que la señal fluorescente se registra por primera vez como estadísticamente significativa por encima del fondo. El valor de Ct está inversamente relacionado con la cantidad inicial de amplicón en la reacción, por lo que cuanto menor sea el Ct, mayores serán las cantidades de amplicón en la muestra. Los resultados se analizaron utilizando el método de umbral crítico comparativo ($\Delta\Delta\text{Ct}$), en el que la cantidad de ARN objetivo se ajusta a una referencia, es decir, un ARN objetivo interno. Para analizar los datos de la PCR cuantitativa en tiempo real, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$\Delta\text{CT} = \text{CT del gen de interés} - \text{CT del control interno}$

$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT de la muestra} - \Delta\text{CT del calibrador}$

Nivel de expresión relativo = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$

Tabla anexo 1. Cebadores usados en la RT-qPCR

Gen	Secuencia de primers (5'→3')
<i>manA</i>	F - TTCATTGGCGCAGCCCGTTT R - GCCGTTGCTAAAATCGTCCC
<i>manB</i>	F - AGTCCAGTGGGCTTCTTTCT R - TTGGTTCCAACGATTCAGGC
<i>ptsI</i>	F - GACGAACAGCTCATGCTTCG R - ATCGATTAAGACCTGGCCGG
<i>ptsH</i>	F - CGATTACTGCTGACTCTGGC R - TACCCGCGCCAAGACTCATT
<i>hsp18</i>	F - CGGTATCAGGAGTTTTGAGTTC R - CGTAGTAACTGCGGGAGTAATTC
<i>gyrB</i>	F - GAGGATGTCCGAGAAGGATTA R - ACCTGCTGGGCATCTGTATTG

ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFM

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: Iratxe Mejias Fernández

Nom i Cognoms del Tutor/a: Cristina Reguant Miranda

Data de la entrevista amb l'alumne: Diverses entrevistes. Darrera comunicació online 11/06/23

Recomanacions durant el seguiment: Millora de la estructura i continguts del treball, així com de la representació i discussió de resultats.

Observacions: L'estudiant ha anat incorporant les modificacions i correccions suggerides.

Observacions Darrera revisió: L'estudiant ha realitzat totes les modificacions indicades.

Signatura del Tutor/a


UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Cristina Reguant
Miranda - DNI
39882121Y
(TCAT)
2023.06.11
20:00:07 +02'00'

Signatura del Alumne/a

MEJIAS
FERNAND
EZ IRATXE
-
24416885
Q
Firmado digitalmente por MEJIAS FERNANDEZ IRATXE - 24416885Q
Fecha: 2023.06.11 20:16:54 +02'00'

Tarragona a 11 de juny 2023