M03 - INCREMENTO DE LA TOLERANCIA AL SECADO DE CEPAS VÍNICAS DE *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

Gemma Roca-Domènech[1], Gema López Martínez[1], Víctor Tirado[1], Montse Poblet[1], Nicolas Ròzes[1], Ricardo Cordero-Otero[1]
[1]Universidad Rovira y Virgili, Dpto. Bioquímica y Biotecnología, Campus Sescelades. Marcel·lí Domingo s/n, 43007 - Tarragona, España
ricardo.cordero@urv.cat

RESUMEN:

En este estudio se evalúan diferentes metabolitos durante el proceso de secado y rehidratación para 9 cepas de *Schiz. pombe* y de este modo determinar si estos metabolitos presentan un efecto positivo para asegurar la viabilidad celular antes de su inoculación en mosto. Se observó que la presencia del 10% de trehalosa durante el secado y la rehidratación con una solución 5mM $MgSO_4$ aumenta la viabilidad hasta un 70% en algunas de las cepas evaluadas.

Palabras clave: Levadura seca activa, viabilidad, *Schizosaccharomyces pombe*

1. Introducción

Actualmente, la mayor parte del vino producido a nivel mundial proviene de mostos inoculados a partir de levaduras vínicas seleccionadas, que a menudo son comercializadas en forma de levadura seca activa (LSA), asegurando así la estabilidad genética durante el almacenado y la pureza e identidad microbiana de la entidad iniciadora de la fermentación del mosto [1].
Por otro lado, inoculaciones mixtas secuenciales del mosto con *S. cerevisiae* y diferentes no-*Saccharomyces* como: *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Torulaspora*, evidencian su capacidad de proporcionar una mayor complejidad aromática, debido a la producción de metabolitos secundarios, tales como glicerol, acetato de 2-feniletilo y acetato de isoamilo [2]. De estos géneros, se muestra especial interés en *Schiz. pombe* por su elevado poder fermentativo, su capacidad de reducir el contenido de ácido glucónico y metabolizar eficientemente el ácido L-málico a etanol y C_2O. En este estudio se desarrolló un protocolo para obtener *Schiz. pombe* en formato de LSA.

2. Material y Métodos

Se evaluaron 9 cepas de *Schiz. pombe* (Sp1 – Sp9), éstas fueron cultivadas en agitación constante a 100 rpm y a 32ºC en EMM (Edinburgh Minimal Medium) e inoculadas con un precultivo a una DO_{600} inicial de 0,250.

Se procedió a la desecación de $5 \cdot 10^7$ células, previamente sonicadas (3 veces durante 3 s con descansos en frío de 4 s), con diferentes concentraciones de trehalosa (5%, 10%, 20% y 30%) durante 20 h con un flujo de aire a 28ºC [3]. Transcurridas las 20 h se rehidrataron las células a: 25ºC, 30ºC, 37ºC y 40ºC; durante: 5min, 15min, 30min y 45min. Además de

rehidratar las células con H_2O se evaluaron la presencia de rafinosa 0,25%, 0,5mM $FeSO_4$, 1mM ácido ascórbico, 5mM $MgSO_4$ y sus combinaciones.

La viabilidad celular fue evaluada mediante siembra en YPD, usando un sembrador automático (AES Laboratoire, Francia). Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC) tras haber sido incubadas a 32ºC durante 48 h, mediante el software ProtoCol SR/HR versión 1.27 de Symbiosis (Cambridge, UK).

Para evaluar la acumulación de ROS se usó dihidroetidio (DHE) realizando el protocolo descrito por López-Martínez *et al*. [4]. La fluorescencia fue cuantificada con el uso de un microscopio de fluorescencia Leica (DM400B, Germany), una cámara digital (Leica DFC300FX) y el Sofware Leica IM50.

Finalmente, se evaluaron los parámetros biológicos, tiempo de duplicación (TD) y la fase lag (λ), usando los datos obtenidos de las curvas de crecimiento con el modelo de Baranyi y Roberts [5] con el Software MicroFit. Las curvas fueron obtenidas mediante el seguimiento del crecimiento en microplacas con un inóculo inicial de 0,6 DO_{600} durante 24 h a 32ºC, con mediciones cada 10 min y agitación en un lector de placas (POLARstar OMEGA).

3. Resultados y Discusión

Se evaluó la tolerancia a la deshidratación de las 9 cepas de *Schiz. pombe* con el protocolo de Rodríguez *et al.* [6]. Se agruparon en tres grupos según su viabilidad celular: Sp3, Sp5 y Sp6 (< 8% de viabilidad); Sp1, Sp4 y Sp7 (8-17 % de viabilidad) y Sp2, Sp8 y Sp9 (>17 % de viabilidad). Luego, se escogieron las cepas Sp2, Sp3 y Sp4 para evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de rehidratación en la viabilidad celular. Se evaluó la viabilidad rehidratando las células entre 20ºC y 60ºC durante 30 min; y también se evaluaron los tiempos entre 5min y 45min a 37ºC (Fig. 1). Se observó una disminución significativa de la viabilidad en los casos en que se incubaron las células a 55ºC y 60ºC, pero no se observaron diferencias significativas en el rango de 20ºC y 50ºC (Fig. 1A). Tampoco se observaron diferencias significativas de la viabilidad a diferentes tiempos con una temperatura de 37ºC (Fig. 1B). Por ello, a continuación se rehidrataron las células a 37ºC durante 5 min.

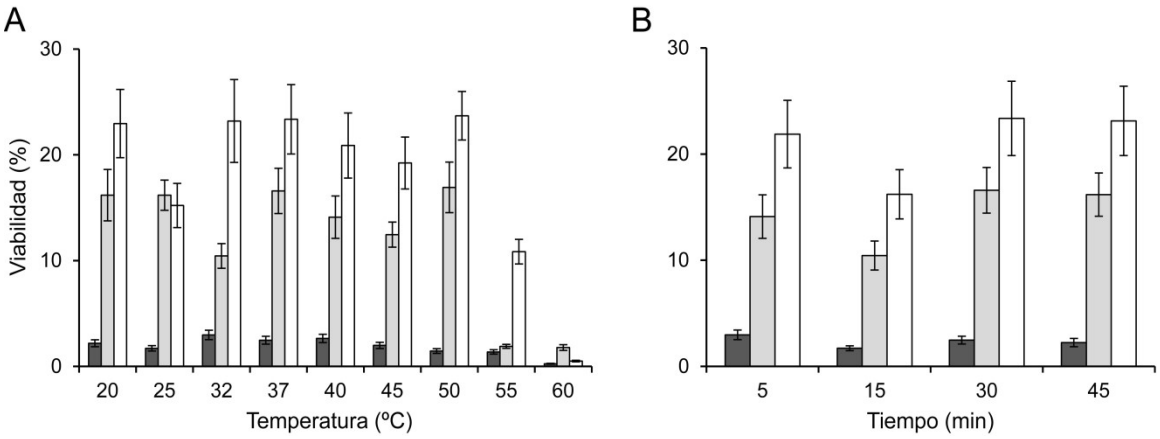


Fig. 1. Efecto de la temperatura y el tiempo de rehidratación vs la viabilidad celular de Schiz. pombe (Sp2 barras blancas, Sp3 barras grises y Sp4 barras negras. La viabilidad se encuentra representada como la mediana de 3 réplicas biológicas ±SD. A) Rehidratación a diferentes temperaturas durante 30 min. B) Rehidratación a 37ºC durante diferentes tiempos.

A continuación, se evaluó la viabilidad de las células secadas en presencia de trehalosa 5%, 10%, 20% y 30% o H_2O pura como referencia. Se observó un incremento significativo de la viabilidad en 5% y 10% de trehalosa respecto del control (Fig. 2). Se eligió la condición 10% trehalosa para seguir con el estudio.

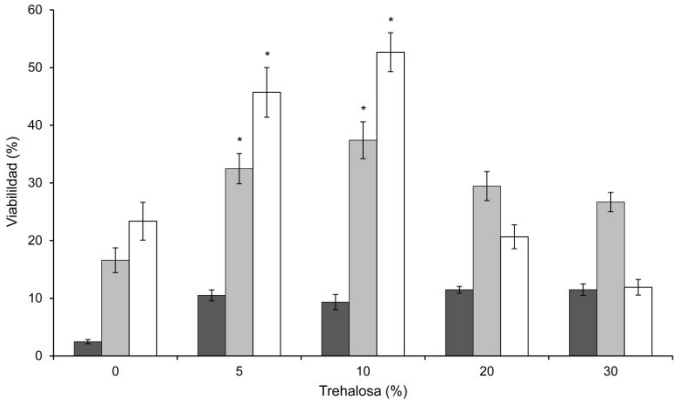


*Fig. 2. Efecto de la trehalosa a diferentes concentraciones en la viabilidad celular de Sp2 (barras blancas), Sp3 (barras grises) y Sp4 (barras negras). Resultados de 3 réplicas biológicas ± SD. * Indica p<0.01 en referencia al 0% de trehalosa.*

Además, para la cepa Sp2 se evaluó la rehidratación en presencia de: rafinosa 0,25%, Fe^{+2} 0,5mM y $MgSO_4$ 5mM, que mostraron un incremento en la viabilidad del 15%, 65% y 74% respectivamente, respecto del control. Finalmente, también se evaluó el efecto del antioxidante ácido ascórbico, pero no se observó un incremento significativo de viabilidad (dato no mostrado). Los estudios de rehidratación posteriores se realizaron en $MgSO_4$ 5mM.

A continuación, se evaluó si la rehidratación con $MgSO_4$ se correlaciona con la reducción de ROS durante el proceso de rehidratación. Para ello, se realizó el ensayo con dihidroetidio (DHE) tras 5 min de rehidratación con agua, ácido ascórbico 1mM o $MgSO_4$ 5mM (Fig. 3A). Se observó que después de 1h y 2h en YPD las células rehidratadas en agua o ácido ascórbico presentan 10% de reducción del ROS respecto de las células rehidratadas, 5 min. En cambio, las células rehidratadas en presencia de $MgSO_4$ presentan una acumulación reducida de ROS a los 5 min. Esto sugiere que $MgSO_4$ permite que las células prevengan la acumulación de ROS durante la exposición al estrés.

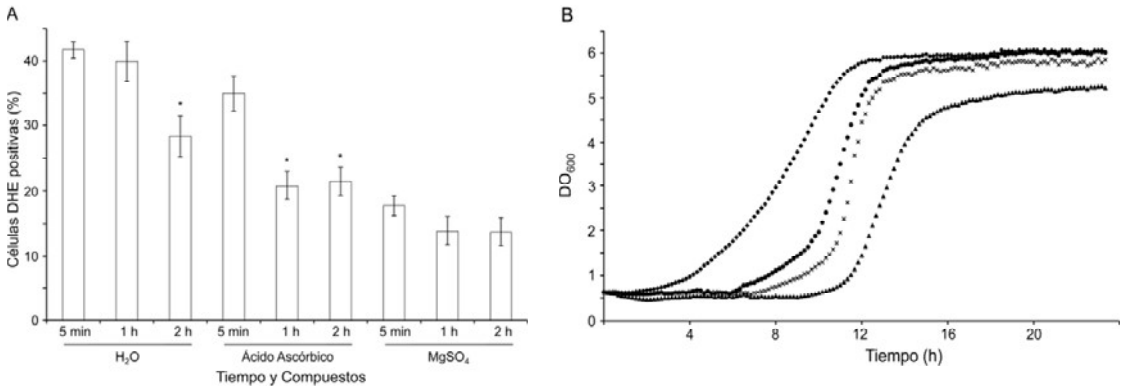


*Fig. 3. A) Acumulación de compuestos ROS durante la imposición de estrés. Cuantificación de las células acumulando ROS después de la rehidratación, a los 5min y una vez transcurridas 1h o 2h en YPD. Los valores son resultado de la evaluación de n = 4 réplicas biológicas ± SD y por cada experimento se evaluaron al menos $1{\cdot}10^3$ células. *Diferencias significativas ($p \leq 0.05$) respecto a los valores obtenidos a los 5min de rehidratación de cada compuesto.*

B) Curva de crecimiento de células rehidratadas con agua ( ), 1mM ácido ascórbico Δ ( ), 5mM Mg_2SO_4 (Δ) y el combo 1mM ácido ascórbico + 5mM Mg_2SO_4 (x).

Finalmente, se evaluó la vitalidad celular de las células rehidratadas en presencia de ácido ascórbico para las cuales se observó un aumento de 1,53 veces el tiempo de duplicación (TD) en relación al control agua. Por el contrario, en el caso de $MgSO_4$ se observó una disminución de 1,51 veces el TD respecto de la condición de referencia y la rehidratación con el mix de ácido ascórbico y $MgSO_4$ no presentó diferencias significativas en el TD (Fig. 3B). No obstante, las células tratadas con ácido ascórbico presentan una reducción de 2 h de su fase λ y las rehidratadas en presencia $MgSO_4$ un incremento de 4 h respecto a las rehidratadas en agua. Por lo que se puede concluir que un incremento en la vitalidad, mediante la reducción de la fase λ de las células rehidratadas, no se correlaciona con la reducción del ROS acumulado por las células durante el proceso de secado y rehidratación.

4. Conclusiones

Se ha podido demostrar que la presencia de trehalosa durante el proceso de secado y de Mg durante la rehidratación tiene un efecto sinérgico en la mejora de la viabilidad celular en la preparación de *Schiz. pombe* en forma de LSA. Por otro lado, el Mg promueve una fase λ más larga lo cual es indicador de una actividad celular más lenta.

5. Bibliografía

1. Dupont, S., Rapoport, A., Gervais, P., and Beney, L. 2014. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. Appl Microbiol Biot 98: 8821-8834.
2. Viana, F., Belloch, C., Vallés, S., and Manzanares, P. 2011. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae-Saccharomyces cerevisiae* in natural must: impact on 2-phenylethyl acetate production. Int J Food Microbiol 151: 235-240.
3. Rodríguez-Porrata, B., Carmona-Gutierrez, D., Reisenbichler, A., Bauer, M., López, G., Escoté, X., Madeo, F., Cordero-Otero, R. 2012. Sip18 hydrophilin prevents yeast cell death during desiccation stress. J Appl Microbiol 112: 512-25.
4. López-Martínez, G., Rodríguez-Porrata, B., Margalef-Catalá, M., and Cordero-Otero, R. 2012. The STF2p hydrophilin from *Saccharomyces cerevisiae* is required for dehydration stress tolerance. PLoS One: 7(3):e33324.
5. Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int J Food Microbiol 23: 277–294.
6. Rodríguez-Porrata, B., Lopez-Martinez, G., Redón, M., Sancho, M., Mas, A., Rozès, N., Cordero-Otero, R. 2011. Enhancing yeast cell viability after dehydration by modification of the lipid profile. W J Microbiol Biotech 27: 75-83.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2012-40018-CO1-01), a la Generalitat de Cataluña por la beca doctoral de GL (FI-DGR 2012 AGAUR) y a la Universidad Rovira y Virgili por la beca doctoral de GR (2014PMF-PIPF-47).