



MILLORA DE L'APLICABILITAT DE LLEVATS AUTÒCTONS COM A EINA PER A LA TIPIFICACIÓ DE PRODUCTE.

MARÇ 2021

RESUM

L'activitat demostrativa proposa un estudi fisiològic i de les condicions d'industrialització d'un llevat autòcton que puguin servir com a punt de partida per a què la indústria enològica incrementi la tipicitat del seu producte mitjançant la selecció i l'ús de llevats propis en formats fàcilment manipulables, a més d'una millora de la qualitat del producte final, com són el vi o el cava. Concretament, aquest estudi es porta a terme amb el llevat P29, aïllat del Penedès i seleccionat a principis dels anys 80 per l'INCAVI. La soca de *Saccharomyces cerevisiae* P29 mostra unes característiques, especialment en segona fermentació dels vins escumosos, que la fan idònia per a obtenir un producte d'alta qualitat, sobretot en criances llargues. Primerament, es van avaluar i seleccionar a escala de laboratori les millors condicions d'assecat i rehidratació per a millorar la viabilitat de la soca P29 com a llevat sec actiu (LSA), aconseguint una viabilitat màxima del 55 % respecte les cèl·lules fresques. Per intentar millorar aquests resultats, es va realitzar un assaig d'assecat de la soca P29 per atomització (*spray drying*), on també es va reduir significativament la viabilitat de les cèl·lules assecades respecte les cèl·lules fresques. Tenint en compte la gran sensibilitat que presenta la soca P29 a l'elevada temperatura, es va valorar l'avaluació de la viabilitat durant la seva conservació a -20 °C emprant crioprotectors. Paral·lelament, també es van realitzar estudis d'evolució dirigida per obtenir possibles mutans espontanis descendents de la soca P29 que presentessin una reducció de la producció d'àcid acètic.

01. Objectius

- Conèixer la resposta que té la soca vànica *Saccharomyces cerevisiae* P29 a la imposició d'estrès al ser deshidratada.
- Establir condicions i paràmetres per al desenvolupament d'un protocol per a l'obtenció de la soca P29 com a llevat sec actiu (LSA), per a la seva aplicació en la producció de vi tranquil i escumós.
- Obtindre una descendent de la P29 que presenti una reducció en la producció d'àcid acètic.
- Dotar al sector de guies i recomanacions per a l'ús directe de la tècnica proposada en els cellers.
- Transferir el coneixement i assessorar als elaboradors interessats.

02. Descripció de les actuacions realitzades

Les accions realitzades van ser les següents:

Avaluació i selecció de diferents condicions d'assecat i rehidratació per a millorar la concentració i viabilitat cel·lular de la P29 com a LSA. Per conèixer la resposta de la soca P29 a la imposició d'estrès per deshidratació, en primer lloc es va avaluar la seva capacitat de tolerància a l'assecat en diferents moments (en hores) del seu creixement. Aquests estudis es van realitzar amb la col·laboració del grup d'investigació Biotecnologia Microbiana dels Aliments (BMA) de la URV. També

es van avaluar les condicions òptimes de temps i temperatura de rehidratació. A més, per incrementar la viabilitat de les cèl·lules de la soca P29 durant el procés de rehidratació, es va estudiar l'impacte de diversos compostos referenciats com a potenciadors de la tolerància a l'estrès per deshidratació, com són el magnesi i la galactosa.

Ús de tècniques d'evolució dirigida (no transgèniques) per obtenir una descendent de la P29 (P29.2) que presenti una reducció de la producció d'àcid acètic. Es van avaluar fins a 15.000 aïllats descendents de la soca P29 per aconseguir obtenir mutans espontanis poc freqüents que produïssin menys àcid acètic. Per a la selecció dels mutans es va utilitzar un medi mínim complementat amb carbonat càlcic (CaCO₃) que va permetre identificar de forma qualitativa aquells mutans que produïssin menys àcid acètic per la menor formació d'un halo al voltant de cada colònia.

Caracterització del perfil fermentatiu de les soques P29 i de la P29.2. Es van realitzar 4 microvinificacions de 100 mL de volum de most de la varietat Ull de llebre per quintuplicat cadascuna. Per una banda, dues microvinificacions control, inoculades amb la soca P29 fresca i amb la soca comercial *S. cerevisiae* EC-1118 fresca, respectivament. D'altra banda, una microvinificació inoculada amb la soca P29 assecada (LSA P29) i una altra amb la soca P29.2 assecada (LSA P29.2). Es va dur a terme una anàlisi dels paràmetres enològics i dels principals compostos volàtils dels vins obtinguts.

Per tal d'avaluar el perfil fermentatiu de la soca P29.2 a més gran escala, a la verema del 2020 es

van realitzar vinificacions de 50 L amb la soca control P29 i amb la soca P29.2, ambdues per duplicat, amb most de raïm de la varietat Xarel·lo.

Obtenció de nous mutants espontanis de la soca P29 que produeixin menys àcid acètic. Per tal d'obtenir nous fenotips que produïssin menys àcid acètic es van induir mutacions espontànies mitjançant l'exposició de la soca P29 a radiacions UV a diferents temps d'exposició. Per a la selecció dels mutants es va usar el medi mínim amb CaCO_3 ja descrit.

Assecat de la soca P29 mitjançant atomització. Es va realitzar un estudi exploratori del procés d'assecatge per atomització (*spray drying*) amb col·laboració amb el Centre Tecnològic AINIA situat al Parc Tecnològic de València. Concretament, es van realitzar dues proves d'estabilització amb l'equip d'assecatge per atomització a escala de laboratori utilitzant l'equip "Spray Drying Büchi B-290" (Foto 1).



Foto 1. Equip Spray Drying Büchi B-290 (Font: AINIA).

Escalatge de la producció de peus de cup de la P29 i ús de crioprotectors per a la seva conservació. Am la finalitat d'estudiar la conservació de la viabilitat de la soca P29 al llarg del temps a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, actualment s'estan realitzant proves de conservació de la P29 a petita escala amb varis crioprotectors (glicerol, llet descremada en pols i goma àrabiga) a diferents concentracions. Paral·lelament, s'està duent a terme una col·laboració amb la Planta Pilot de Bioprocessos de l'Institut Químic de Sarrià (IQS), per tal d'escalar la producció de peus de cup (PC) de la soca P29, que actualment són com a màxim de 25 L (en les instal·lacions d'INCAVI), fins a 100 L i la posterior concentració de la biomassa cel·lular fins a 1/3 del volum mitjançant la centrifugació. Amb la biomassa concentrada obtinguda es té previst provar els crioprotectors amb els que s'obtinguin millors resultats a escala de laboratori.

03. Resultats

Avaluació i selecció de diferents condicions d'assecat i rehidratació per a millorar la concentració i viabilitat cel·lular de la P29 com a LSA. Es va avaluar la tolerància a la deshidratació de la P29 en diferents fases del seu creixement, després de l'assecat durant 24h a 28°C (amb i sense

presència de trehalosa) i de la rehidratació de les cèl·lules durant 30 min a 37°C . La major viabilitat de les cèl·lules es va aconseguir quan aquestes van ser assecades en **fase estacionària** (a les **32 h de creixement**) i en presència del **10% de trehalosa** (Figura 1).

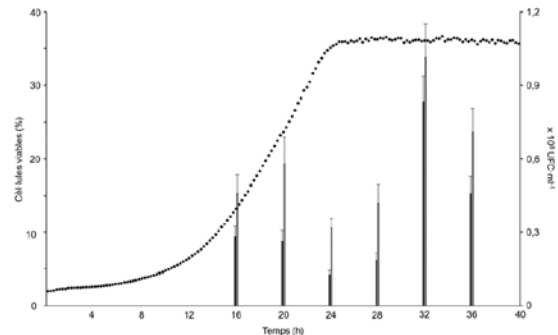


Figura 1. Viabilitat cel·lular de la soca P29 basada en l'estat fisiològic cel·lular durant el creixement. La corba de creixement (línia de punts) i la viabilitat (%) en presència de trehalosa durant l'assecat cel·lular (barres blanques, dreta) enfront de la no presència de trehalosa (barres negres, esquerra). Els valors representen la mitjana de 5 repeticions biològiques \pm desviació estàndard.

A continuació es va avaluar la viabilitat de la P29 després de la rehidratació a diferents temps (5 – 30 min) a 37°C , i a diferents temperatures ($28 - 42\text{ }^\circ\text{C}$) durant 20 min (Figura 2). Els resultats obtinguts van permetre afirmar que els valors òptims de temperatura i temps d'incubació **durant la rehidratació** van ser **28°C durant 20 min** per a la soca P29.

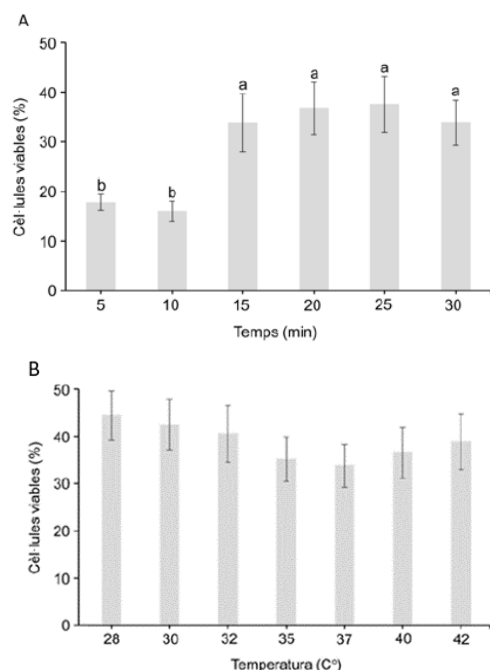


Figura 2. Efecte de la durada (A) i de la temperatura (B) de rehidratació sobre la viabilitat cel·lular de la soca P29. Els valors representen la mitjana de 3 repeticions biològiques \pm desviació estàndard. a, b indica $p < 0.05$.

Per tal d'incrementar la viabilitat de la P29 durant la rehidratació, es va avaluar la viabilitat de les cèl·lules assecades en presència o no de trehalosa, i rehidratades (20 min a 28 °C) en presència de 0,5 mM de sulfat de magnesi i/o 0,5 % de galactosa. Els resultats van mostrar una tendència a incrementar la viabilitat cel·lular respecte al control (rehidratació amb aigua), però sense ser estadísticament significativa, en les cèl·lules **assecades en presència de trehalosa i rehidratades amb magnesi** amb una viabilitat del 55 % (Figura 3).

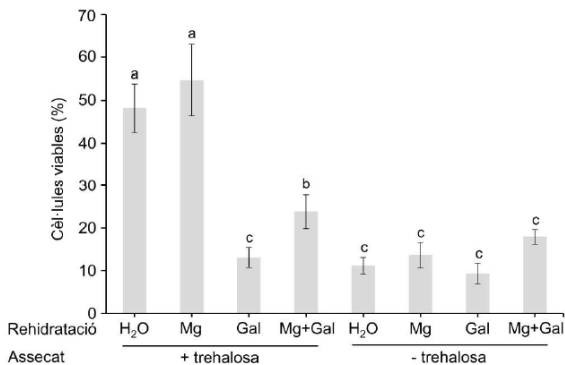


Figura 3. Viabilitat cel·lular del soca P29 complementades amb potenciadors de tolerància de l'assecat durant la rehidratació. Les cèl·lules assecades en presència (+) o absència (-) de trehalosa es van rehidratar en aigua pura (H₂O), complementades amb magnesi (Mg), amb galactosa (Gal) o amb tots dos (Mg + Gal). Els valors representen la mitjana de al menys 3 repeticions biològiques ± desviació estàndard. a, b, c indica p < 0,05.

Ús de tècniques d'evolució dirigida (no transgèniques) per obtenir una descendent de la P29 (P29.2) que presenti una reducció de la producció d'àcid acètic. A través de l'evolució dirigida es van obtenir varis aïllats que presentaven una reducció en el diàmetre de l'halo d'entre un 10 % i un 30 %, respecte la soca P29 control. A continuació, es van caracteritzar els aïllats en front a la seva tolerància a la deshidratació, i es va seleccionar l'aïllat anomenat "P29.2" el qual va presentar un increment del 10% de viabilitat cel·lular (65%) respecte la soca P29 en presència de trehalosa i magnesi durant l'assecatge i rehidratació, respectivament.

Caracterització del perfil fermentatiu de les soques P29 i de la P29.2. Les microvinificacions de 100 mL van presentar una cinètica fermentativa molt similar entre elles, finalitzant transcorreguts 15 dies des de l'inici de la fermentació. Es va observar que els vins inoculats amb la soca LSA P29.2 presentaven 2 dècimes menys de pH que els vins inoculats amb la P29 fresca i la LSA P29. Totes les condicions van acabar amb un grau alcohòlic de 12 – 13 % v/v. Pel que fa als valors dels compostos volàtils aromàtics es van observar poques diferències significatives. Ara bé, els nivells d'àcid acètic en el vi inoculat amb la LSA P29.2 van reduir-

se un 24 % respecte els dels vins inoculats amb la P29 fresca o amb la LSA P29.

Per tal de corroborar les tendències que s'havien observat a petita escala, es va avaluar el perfil fermentatiu de la soca P29.2 en vinificacions de 50 L. Les vinificacions van presentar una cinètica fermentativa molt similar entre elles, finalitzant als 14 dies des de l'inici de la fermentació. Ara bé, els resultats no van mostrar cap disminució de l'acidesa volàtil (àcid acètic) en cap dels dipòsits inoculats amb la soca P29.2 en comparació amb els dipòsits controls, inoculats amb la soca P29.

Obtenció de nous mutants espontanis de la soca P29 que produeixin menys àcid acètic.

Actualment, s'estan induint mutacions espontànies mitjançant l'exposició de la soca P29 a radiacions UV a diferents temps d'exposició (5" – 30"). Fins al moment s'han obtingut un total de 53 aïllats que presenten una reducció dels halos significativa respecte a la soca control (P29) (Foto 2).

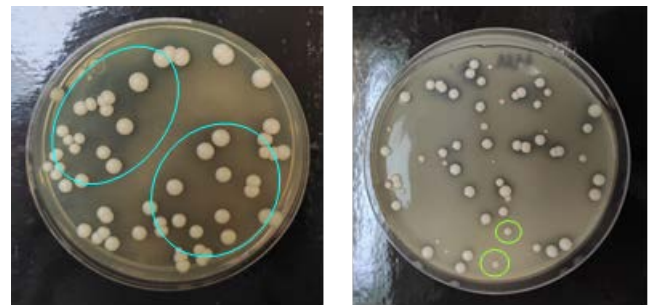


Foto 2. Alguns dels aïllats que presenten reducció dels halos (verd) respecte control (blau) (Font: INCAVI).

Assecat de la soca P29 mitjançant atomització. El producte de les dues proves d'estabilització amb l'equip d'assecatge per atomització presentava un aspecte correcte, obtenint-se una pols seca de color blanc/crema amb una humitat del 4,4 i 5,9 %, respectivament. No obstant, es van observar reduccions de l'ordre de 3 – 4 unitats logarítmiques en el número d'unitats formadores de colònies (ufc) de les mostres obtingudes respecte el cultiu de P29 de partida, sens dubte com a conseqüència de la seva elevada sensibilitat a la temperatura. Per tant, la viabilitat de la soca P29 no va ser suficientment elevada com per a acceptar-la com a LSA.

Escalatge de la producció de peus de cup de la P29 i ús de crioprotectors per a la seva conservació. S'està realitzant un escalatge de la producció de peus de cup de la soca P29 (Foto 3) fins a 100 L en les instal·lacions de l'IQS i la seva concentració fins a 1/3 del volum inicial mitjançant centrifugació. A continuació, es té previst realitzar assajos amb els crioprotectors que millors viabilitats hagin donat al llarg del temps en les proves a escala de laboratori.

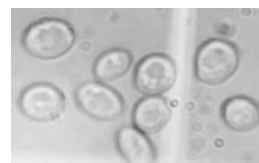


Foto 3. S. cerevisiae P29 (Font: INCAVI).

04. Àmbit d'aplicació

L'establiment d'un itinerari de producció semi-industrial de LSA de soques de llevat autòctones seleccionades de l'àmbit vitivinícola català, com és en aquest cas la soca P29, obre diferents possibilitats als cellers:

- Apropar una nova tecnologia en el sector enològic que suposi tant una millora organolèptica dels vins produïts, com des de la perspectiva de la seguretat alimentària.
- Personalitzar els productes finals obtinguts.
- Fer aquest producte més atractiu per a nous mercats, on l'augment del consum de productes de "terroir" o de proximitat és cada vegada més rellevant.
- L'ús de la soca seleccionada P29 pot servir com a exemple per a què el sector aposti per a una major identificació del territori mitjançant l'aplicació de llevats autòctons.

05. Conclusions i accions futures

Degut al gran interès i demanda per part del sector per a la soca P29, es van realitzar les experiències descrites en l'activitat demostrativa. A continuació es valoren els resultats obtinguts i es plantegen propostes de futur:

A escala de laboratori, es va aconseguir una viabilitat màxima del 55 % de les cèl·lules de la soca P29 després de l'assecat a 28 °C durant 24 h en presència de trehalosa i de la rehidratació a 28 °C durant 20 min en presència de magnesi, respecte la viabilitat de les cèl·lules fresques, és a dir, abans d'exposar les cèl·lules a la dessecació. Aquesta viabilitat era insuficient per a ser acceptada com a LSA.

Com alternativa, es va provar l'estudi d'assecat per atomització que es va dur a terme utilitzant l'equip "Spray Drying Büchi B-290". Tampoc es van obtenir viabilitats acceptables per poder produir la soca P29 com a LSA, ja que la viabilitat de les cèl·lules va disminuir varis ordres de magnitud respecte a les cèl·lules fresques (cultiu en líquid).

Ha quedat demostrat doncs, que la soca P29 és una soca que té una alta sensibilitat a l'exposició a elevades temperatures durant la dessecació. Per aquest motiu, en l'actualitat estem focalitzant els esforços en produir lots de peu de cup de la soca P29 de majors volums i concentrar la biomassa d'aquests, per a després millorar la seva conservació al llarg del temps en congelació utilitzant crioprotectors. En el futur, ens plantegem seguir estudiant diferents crioprotectors per avaluar el seu efecte sobre les cèl·lules i d'aquesta manera obtenir lots de P29 amb viabilitats òptimes que es puguin emmagatzemar a baixa temperatura durant un període concret de temps i d'aquesta manera facilitar la seva distribució i manipulació.

Paral·lelament, es va concloure que la soca P29.2, obtinguda mitjançant evolució dirigida, no presentava disminució en la producció d'àcid acètic en les vinificacions de 50 L en Xarel·lo. Per aquest motiu, s'ha plantejat seguir buscant nous mutants espontanis mitjançant radiacions UV. Les accions futures en aquesta línia serien l'avaluació del poder fermentatiu de cadascun dels mutants seleccionats i la caracterització del producte final per valorar si algun dels mutants obtinguts produeix menys àcid acètic i per tant l'acidesa volàtil dels vins és menor que la produïda pel la soca P29 control.

DADES DEL CENTRE DE RECERCA

Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI)
Plaça Àgora 2, Pol. Domenys II
08720 Vilafranca del Penedès
Telèfon: 93 890 02 11
<http://incavi.gencat.cat>



PRESSUPOST

Pressupost total del projecte: 28.850 €
Contribució de la UE al pressupost: 12.405,50 €

DIFUSIÓ DEL PROJECTE

- Presentació realitzada en la Jornada PATT el 18 de juny de 2020.
- Fitxa tècnica d'ús de la soca P29

Amb el finançament de:



Generalitat de Catalunya
**Departament d'Agricultura,
Ramaderia, Pesca i Alimentació**



**Fons Europeu Agrícola
de Desenvolupament Rural:**
Europa inverteix en les zones rurals

Projecte finançat a través de l'operació 01.02.01 de Transferència Tecnològica del Programa de desenvolupament rural de Catalunya 2014-2020.

Ref.: 031_2018.