

Laura BATLE SOLER

**SELECCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LLEVATS
AUTÒCTONS**

TREBALL FINAL DE MÀSTER

dirigit per IMMA ANDORRÀ SOLSONA

Màster en BEGUDES FERMENTADES

Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Tarragona
14 de juny del 2018**

SELECCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LLEVATS AUTÒCTONS

Autors: Laura Batle, Gemma Miró, Marta Bargalló, Ana María Mislata, Miquel Puxeu, Imma Andorrà

Direcció: VITEC (Centre Tecnològic del Vi), Ctra. de Porrera, km. 1, 43730 Falset, Tarragona

e-mail: laurabatle@hotmail.com, imma.andorra@vitec.wine

Paraules clau: llevats autòctons, *S. cerevisiae*, no-*Saccharomyces*, microfermentacions, caracterització enològica

Índex

Resum	4
<i>Abstract</i>	4
1. Introducció	5
1.1. Ecologia de la fermentació alcohòlica	5
1.1.1. Llevats no- <i>Saccharomyces</i>	5
1.2. Producció de metabòlits secundaris pels llevats	6
1.3. Inoculació de llevats seleccionats	6
1.4. Selecció de llevats autòctons	7
2. Materials i mètodes	9
2.1. Aïllament de llevats autòctons	9
2.1.1. Aïllament i selecció de llevats directament del raïm	9
2.1.2. Aïllament i selecció de llevats durant la fermentació alcohòlica	9
2.2. Identificació dels llevats aïllats	9
2.3. Tipificació de soques de <i>S. cerevisiae</i>	10
2.4. Microfermentacions amb cultius purs dels llevats aïllats	11
2.5. Microfermentacions amb cultius mixtes dels llevats aïllats	11
2.6. Anàlisi química	11
2.7. Anàlisi estadística	11
3. Resultats i discussió	12
3.1. Microvinificacions inicials	12
3.2. Identificació dels llevats aïllats	13
3.3. Tipificació de soques de <i>S. cerevisiae</i>	13
3.4. Microfermentacions amb cultius purs dels llevats aïllats	14
3.5. Microfermentacions amb cultius mixtes dels llevats aïllats	18
4. Conclusions i perspectives	21
5. Bibliografia	22

Índex de taules i figures

Figures

Figura 1. Evolució de la densitat i de la població de llevats totals i viables durant la fermentació alcohòlica de les tres microvinificacions	12
Figura 2. Diversitat d'espècies de llevats aïllats en cada etapa de les tres microvinificacions	13
Figura 3. Gel d'electroforesi dels fragments amplificats mitjançant els primers Delta 12 i Delta 21 de les 18 soques de <i>S. cerevisiae</i>	14
Figura 4. Evolució de la densitat de les 18 microfermentacions realitzades amb cultius purs de les diferents soques de <i>S. cerevisiae</i>	14
Figura 5. Gels d'electroforesi dels fragments amplificats mitjançant els primers Delta12 i Delta 21 de les soques de llevat aïllades al final de la fermentació amb inoculació massiva	17
Figura 6. Percentatges d'imposició de les soques aïllades al final de la fermentació amb inoculació massiva	17
Figura 7. Evolució de la densitat de les 9 microfermentacions realitzades amb cultius mixtes de les diferents espècies de no- <i>Saccharomyces</i> i la soca F11 de <i>S. cerevisiae</i>	18

Taules

Taula 1. Anàlisi química del most inicial	12
Taula 2. Anàlisi química del vi final	12
Taula 3. Paràmetres analítics mesurats al final de la fermentació de les 18 soques de <i>S. cerevisiae</i>	15
Taula 4. Paràmetres analítics mesurats al final de la fermentació de les inoculacions mixtes	19

Resum

La selecció de llevats autòctons per a la producció de vi es pot utilitzar per a potenciar les característiques enològiques diferencials que determinen una regió vitivinícola. En aquest treball, s'han aïllat, identificat i caracteritzats llevats autòctons a partir de raïm de la varietat Albariño de la D.O. Rías Baixas i durant vinificacions espontànies de vins blancs de la mateixa varietat. Es varen avaluar les aptituds fermentatives i les característiques de les soques de *S. cerevisiae* aïllades mitjançant fermentacions amb cultius purs i inoculació massiva a escala de laboratori. Posteriorment, es realitzaren fermentacions amb cultius mixtes de *S. cerevisiae* i no-*Saccharomyces*. Per a la selecció de les soques dels llevats es consideraren diferents paràmetres enològics (producció d'etanol, acidesa volàtil, glicerol, pH, etc.) i microbiològics (evolució i capacitat d'imposició durant la fermentació alcohòlica). S'han obtingut un total de divuit soques de *S. cerevisiae*, tipificades mitjançant la tècnica dels elements Delta, i s'han identificat nou espècies de llevats no-*Saccharomyces* mitjançant PCR RFLP de la regió 5,8S-ITS (*Rhodotorula glutinis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus flavescens*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia membranaefaciens* i *Candida zemplinina*). Totes les soques de *S. cerevisiae* seleccionades excepte dues varen mostrar aptituds fermentatives òptimes per a la producció de vins que reflecteixin les característiques del *terroir* i de la varietat de raïm i que es diferenciïn de la resta. No obstant, es necessiten treballs futurs per acabar d'estudiar les característiques enològiques dels llevats seleccionats, tant en inoculacions pures de *S. cerevisiae* com en inoculacions mixtes amb no-*Saccharomyces*.

Abstract

The selection of autochthonous yeasts for the production of wine can be used to enhance the differential oenological characteristics that determine a wine-growing region. In this work, autochthonous yeasts have been isolated, identified and characterized, based on the Albariño grape variety of D.O. Rías Baixas and during spontaneous fermentations of white wines from the same variety. We evaluated fermentative abilities and characteristics of *S. cerevisiae* isolated strains by fermentation with pure cultures and massive inoculation at laboratory-scale. Subsequently, fermentations were made with mixed cultures of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces*. For the selection of yeast strains, different oenological (production of ethanol, volatile acidity, glycerol, pH, etc.) and microbiological parameters (evolution and ability to impose during alcoholic fermentation) were considered. A total of eighteen strains of *S. cerevisiae*, typified by Delta technique, have been obtained, and nine non-*Saccharomyces* yeast species have been identified using RFLP-PCR of the 5,8S-ITS region (*Rhodotorula glutinis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus flavescens*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia membranaefaciens* and *Candida zemplinina*). The selected *S. cerevisiae* strains except two showed optimal fermentative aptitudes for the production of wines that reflect the characteristics of the *terroir* and the grape variety and that differ from the rest. However, future work is needed to define the oenological characteristics of selected yeasts, both in pure inoculations of *S. cerevisiae* and in mixed inoculations with non-*Saccharomyces*.

1. Introducció

1.1. Ecologia de la fermentació alcohòlica

El químic i bacteriòleg Louis Pasteur fou el responsable de revelar el paper dels llevats durant la fermentació alcohòlica, demostrant que aquest microorganisme és el principal responsable de la conversió dels sucres en etanol i CO₂. Ell mateix va veure que en la fermentació del most de raïm coexistien una gran diversitat de microorganismes, inclús diferents tipus de llevats (Barnett, 2000). Avui en dia es sap que tot i que *S. cerevisiae* és el principal microorganisme involucrat en la fermentació alcohòlica del most, en l'elaboració del vi intervenen altres llevats. Els llevats que es troben al most provenen, per una banda, de la vinya i del raïm, i per altra, de les superfícies que es troben en contacte amb el most i de l'equipament de la pròpia bodega. La gran diversitat d'espècies no-*Saccharomyces* que formen part del most en les primeres etapes ve determinada per diferents factors que defineixen la microbiota del raïm, com la localització geogràfica, les condicions climàtiques de la regió, l'ús de pesticides, l'etapa de maduració, la salut del raïm, els procediments de recol·lecció i altres pràctiques agrònomes i les condicions meteorològiques específiques de cada any. Malgrat aquesta àmplia variabilitat d'espècies de llevats, durant els primers dies d'una fermentació espontània la població de microorganismes està dominada per llevats apiculats (amb forma de llimona), principalment del gènere *Hanseniaspora*, i per llevats del gènere *Candida*. Altres espècies pertanyents als gèneres *Metschnikowia* i *Pichia*, i ocasionalment *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Rhodotorula*, *Zygosaccharomyces* i *Cryptococcus*, es poden trobar en les primeres etapes de la fermentació en menor proporció. No obstant, a causa de la baixa tolerància a l'etanol d'aquests llevats i la seva incapacitat de fermentar tots els sucres presents al most, de manera natural són reemplaçats per *S. cerevisiae*, que desenvolupa la major part de la fermentació alcohòlica (González et al., 2007; Padilla et al., 2016). Apart de la gran diversitat d'espècies de llevats, cada fermentació sembla tenir la seva pròpia població de soques de *S. cerevisiae* que contribueixen a la composició química i a les qualitats sensorials del vi. Per tant, es pot suposar que els diferents perfils genètics específics de cada soca són únics per a cada fermentació. La variabilitat genètica de les soques de llevat en les fermentacions contribueix a les propietats enològiques dels vins obtinguts (Romano et al., 2003).

1.1.1. Llevats no-*Saccharomyces*

Fa uns anys, els llevats distints de *Saccharomyces* que es trobaven al most o al vi eren considerats com una font de possibles problemes de deteriorament durant la vinificació. De fet, la presència d'algunes d'aquestes espècies sovint es relacionava amb fermentacions lentes o aturades de fermentació, o amb la producció de compostos desagradables per les característiques sensorials del vi (Padilla et al., 2016). És cert que la utilització d'espècies no-*Saccharomyces* en cultiu pur pot tenir un impacte negatiu sobre les característiques fermentatives, motiu pel qual s'exclou el seu ús com a cultius iniciadors únics. En general, aquestes espècies es caracteritzen per la producció de metabòlits que poden deteriorar el producte final, com l'àcid acètic, l'acetaldehid, l'acetoina, l'acetat d'etil, així com compostos amb aromes desagradables com el vinil fenol o l'etil fenol, relacionats amb el desenvolupament d'espècies de *Brettanomyces/Dekkera*. A més, la majoria d'espècies no-*Saccharomyces*

presenten aptituds fermentatives limitades, com baixa taxa i baix poder de fermentació així com molt poca resistència al SO₂ (Ciani et al., 2010). No obstant això, algunes espècies de no-*Saccharomyces* són capaces de millorar les aptituds fermentatives de cultius comercials de *S. cerevisiae*, així com la composició analítica del vi, donant lloc a un perfil aromàtic més complex. S'ha vist que determinades activitats enzimàtiques característiques d'algunes espècies de llevats no-*Saccharomyces*, així com la capacitat de sintetitzar certs metabòlits desitjables, poden contribuir en el perfil aromàtic i gustatiu del vi. Per exemple, s'han estudiat les activitats poligalacturonasa i β -D-xilosidasa d'aquests llevats en la vinificació i s'ha vist que poden millorar la qualitat del vi. Altres activitats enzimàtiques observades en aquests llevats com la β -glucosidasa tenen la capacitat de potenciar les aromes del vi, ja que aquest enzim està involucrat en l'alliberament de terpenols durant la fermentació (Esteve-Zarzoso et al., 1998; Fernández et al., 2000).

1.2. Producció de metabòlits secundaris pels llevats

Tot i que els principals productes de la fermentació són l'etanol i el diòxid de carboni, els llevats produeixen també altres metabòlits secundaris en menors concentracions, però molt importants per definir les aromes i els sabors del producte final. Aquests metabòlits secundaris, que comprenen èsters, alcohols superiors, carbonils, èsters etílics d'àcids grassos, compostos derivats del sofre, substàncies acetoíniques i compostos fenòlics, deriven del metabolisme de sucres i aminoàcids. D'aquesta manera, els llevats poden aportar característiques sensorials desitjables ajudant a extreure compostos del raïm, modificant aquestes molècules i produint substàncies aromàtiques i gustatives gràcies al seu propi metabolisme. Alguns d'aquests compostos secundaris són, per exemple, l'àcid acètic, que per damunt del seu lliandar olfactiu aporta al vi aroma de vinagre, l'acetaldehid, que dona olor a poma verda o a agre, el diacetil, que aporta aroma de mantega, l'acetat d'etil, que fa olor a pinta-ungles, l'acetat d'hexil, que aporta aromes dolços i afruitats, alguns compostos derivats del sofre, com l'àcid sulfhídric o el mercaptoetanol, que aporten olors molt desagradables d'ous podrits i de quadra, respectivament, entre molts altres (Swiegers et al., 2005; Walker et al., 2016). Les soques de llevat amb les que s'inocula el most poden arribar a tenir un impacte important en el perfil sensorial del producte final, tant a nivell d'aroma com de sabor. Per aquest motiu, resulta interessant el fet de poder seleccionar llevats específics per a produir vins amb unes característiques concretes i així satisfer les demandes canviants dels consumidors (Swiegers et al., 2005).

1.3. Inoculació de llevats seleccionats

Actualment, les fermentacions de vi a nivell industrial es realitzen habitualment a partir de cultius purs de soques de *S. cerevisiae* seleccionades i comercialitzades en forma de llevats secs actius, sent avui en dia una de les pràctiques més habituals en l'elaboració de vi. La utilització de soques seleccionades amb característiques metabòliques específiques de la soca, pot afectar positivament la qualitat final del vi. El mercat enològic ofereix una gran varietat de soques de llevats seleccionades que asseguren la seva implantació i el fi de la fermentació, amb aptituds específiques per els diferents tipus de vi, així com altres característiques desitjables com la capacitat de potenciar aromes varietals i fermentatives, la producció de glicerol, la

tolerància a l'etanol, o fins i tot activitats enzimàtiques específiques. D'aquesta manera, la utilització de cultius iniciadors seleccionats facilita el control de la fermentació i permet obtenir vins amb una qualitat uniforme any rere any, evitant així la variabilitat associada a les fermentacions espontànies i el risc d'aturades de fermentació i deteriorament del vi. No obstant, tot i els avantatges d'utilitzar cultius purs de *S. cerevisiae*, el vi obtingut no té la complexitat d'aromes i sabors que s'obtenen per l'acció dels llevats indígenes i que permeten l'obtenció de vins singulars i la distinció dels vins d'una regió vitivinícola determinada. Estudis fets en els darrers anys han demostrat que la utilització de llevats que no pertanyen al gènere *Saccharomyces* pot aportar característiques positives al producte final (Padilla et al., 2016; Romano et al., 2003). Per exemple, s'ha vist que algunes soques de l'espècie *Candida zemplinina* produeixen altes concentracions de glicerol, baixos nivells d'àcid acètic i aporten un caràcter fructífic, propietats desitjables per al vi final (Tofalo et al., 2012). Per aquest motiu, ja fa uns anys es va suggerir la inclusió d'espècies no-*Saccharomyces* com a cultius iniciadors mixtes juntament amb *S. cerevisiae*, com una forma d'emular les fermentacions espontànies però sense el risc d'aturades de fermentació i deteriorament del vi i així millorar la qualitat del vi. Aquesta pràctica ha obert la porta a nous estudis sobre la selecció de soques de no-*Saccharomyces* adequades segons la varietat de raïm o les característiques desitjades, la tècnica d'inoculació apropiada, la proporció de llevats en el cultiu, les possibles interaccions entre els microorganismes, etc. (Teixeira et al., 2015; Padilla et al., 2016).

1.4. Selecció de llevats autòctons

En els últims anys, hi ha hagut un interès creixent per part dels productors de vi d'oferir als consumidors vins d'alta qualitat, amb complexitat aromàtica i que reflecteixin la seva identitat geogràfica. D'aquí va sorgir el concepte de *terroir*, que vincula les característiques sensorials del vi amb les condicions ambientals de la vinya, i engloba el clima, el tipus de sòl, la varietat de raïm i la microbiota, entre altres factors (Padilla et al., 2017). Per tal d'obtenir vins que reflecteixin un determinat *terroir*, s'ha estès recentment la selecció i utilització de cultius iniciadors de llevats procedents de la pròpia vinya, mitjançant un estudi inicial de la biodiversitat de llevats de la regió vitícola o de la bodega. En una fermentació espontània durant el procés de vinificació, alguns llevats autòctons es poden trobar en anys consecutius com a predominants, considerant-se representatius d'una regió vitícola determinada (Vilanova et al., 2011). D'aquesta manera, avui en dia es poden aïllar diferents espècies de llevats i soques de *S. cerevisiae* a partir de raïm o de fermentacions espontànies al laboratori i identificar-los gràcies a tècniques moleculars. Un cop seleccionats aquells llevats que presenten les millors aptituds fermentatives gràcies a la realització de fermentacions a escala de laboratori, es podran fer fermentacions a major escala per obtenir vins que seran analitzats tant químicament com sensorialment. Els llevats que produeixen els millors vins, depenent sempre dels objectius de la bodega, podran ser utilitzats com a cultius iniciadors (ja sigui cultius purs d'una soca de llevat o bé mixtes, combinant amb llevats no-*Saccharomyces*), simulant una fermentació espontània però amb un control microbiològic dels llevats que estan actuant i evitant la uniformització i la pèrdua de singularitat dels vins a causa de la utilització de cultius iniciadors comercials (Mas et al., 2014).

La Denominació d'Origen Rías Baixas és una petita zona vitivinícola ubicada al nord-oest d'Espanya (Galícia), principalment a la província de Pontevedra i una petita part a A Coruña. Quan es va establir el seu Consell Regulador, l'any 1988, el sector vitivinícola va esdevenir un gran pilar per l'economia d'aquest territori. Els viticultors aposten per les varietats de raïm autòctones, com l'Albariño, adaptades a la climatologia i al sòl d'aquest territori i que permeten obtenir vins de qualitat amb un marcat caràcter atlàntic. La varietat per excel·lència d'aquesta D.O. es l'Albariño. Es tracta d'una varietat blanca que posseeix una gran capacitat per a produir sucres, el que li permet superar el 12% de grau alcohòlic probable; així com una gran riquesa en àcids i en components aromàtics que fa que els vins elaborats a partir d'aquesta varietat presentin aromes característiques afruitades i florals i siguin fàcilment identificables (Carrascosa et al., 2012).

Així doncs, l'objectiu d'aquest treball és aïllar, identificar i caracteritzar llevats autòctons a partir de raïm de la varietat Albariño de la D.O. Rías Baixas i de fermentacions espontànies d'aquest raïm per utilitzar-los com a cultiu iniciador per a l'elaboració de vins amb unes característiques organolèptiques úniques, pròpies de la zona vitivinícola i diferenciant el producte de la competència, evitant així l'efecte uniformitzador dels llevats comercials i assegurant la reproductibilitat dels seus vins i l'èxit de la fermentació alcohòlica.

2. Materials i mètodes

2.1. Aïllament de llevats autòctons

2.1.1. Aïllament i selecció de llevats directament del raïm

Es varen aïllar llevats presents al raïm de la varietat Albariño procedent de Bodegas Martín Códax de la D.O. Rías Baixas, recol·lectat de tres parcel·les diferents (Freixo, Cortiñas i Prado de Allos) durant la verema del 2017. De cada mostra es varen introduir 50 grams de raïm en una botella amb aigua de peptona estèril (0,1%) en agitació a 165 rpm durant 24 hores a temperatura ambient. Diferents alíquotes es varen sembrar en medi YPDA (2% glucosa, 2% peptona, 1% extracte de llevat i 2% agar) i es varen incubar a 28°C durant 24-48 hores, fins a l'obtenció de colònies diferenciades. Aquestes colònies es varen transferir a un medi Lisina per a diferenciar les del gènere *Saccharomyces* de les no-*Saccharomyces*. Les colònies seleccionades es varen guardar per la seva posterior identificació.

2.1.2. Aïllament i selecció de llevats durant la fermentació alcohòlica

Es varen realitzar tres microvinificacions amb 50 l de most del raïm procedent de les tres parcel·les de manera espontània, sense inocular cap llevat. Les fermentacions es realitzaren a 17°C amb aportació de nutrients nitrogenats a l'inici, meitat i final de fermentació. Durant el transcurs de la fermentació alcohòlica es va analitzar periòdicament la densitat, la temperatura i la població de llevats totals i viables de cada depòsit. A l'inici, meitat, i final de fermentació es varen extreure mostres de vi per aïllar-ne els llevats i posteriorment identificar-los. Els llevats es varen sembrar en medi YPDA (2% glucosa, 2% peptona, 1% extracte de llevat i 2% agar) i es varen incubar a 28°C durant 24-48 hores. Les colònies es varen transferir a un medi Lisina per a diferenciar les *Saccharomyces* de les no-*Saccharomyces*. Les colònies seleccionades es guardaren per la seva posterior identificació.

2.2. Identificació dels llevats aïllats

Per a la identificació de les colònies aïllades en primer lloc es va realitzar l'extracció d'ADN de les 288 mostres obtingudes anteriorment mitjançant el protocol descrit per Querol et al. (1992). A continuació es varen identificar els llevats a nivell d'espècie mitjançant la tècnica RFLP de l'ADN ribosomal descrita per Esteve-Zarzoso et al. (1999). La tècnica es basa en una amplificació mitjançant una PCR de la regió que abasta l'ITS1, l'ITS2 i el gen de l'ARNr 5.8S (regió 5.8S-ITS) i el subseqüent anàlisi de restricció amb diferents endonucleases. La mix de la PCR es va preparar amb Reaction Buffer 1X, MgCl₂ [3 mM], primer ITS1 [0,2 µM] (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), primer ITS4 [0,2 µM] (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), dNTPs [0,8 mM] i Taq Polimerasa [0,01 U/µl] (Bioline, Londres, Regne Unit). L'amplificació es va dur a terme amb un termociclador T100™ de Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, EUA). Per a l'amplificació es va seguir el següent protocol: un cicle de desnaturalització a 95°C durant 5 minuts, seguit de quaranta cicles de desnaturalització a 95°C durant 30 segons, unió dels encebadors a 52°C durant 1 minut i extensió a 72°C durant 1 minut i finalment un cicle d'elongació final a 72°C durant 7 minuts. A continuació es va realitzar una electroforesi amb els

productes de la PCR en un gel a l'1,6% d'agarosa en tampó TBE 1X (Tris 0,089 M; Àcid Bòric 0,089 M; EDTA 0,002 M, pH 8), usant RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20000X) com agent intercalant (Labotaq, Sevilla, Espanya) i HyperLadder™ 100bp com a marcador de pes molecular (Bioline, Londres, Regne Unit). Els productes de la PCR es varen visualitzar gràcies a un transil·luminador Gel Doc™ XR de Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, EUA).

Els productes de la PCR varen ser digerits mitjançant diferents enzims de restricció: *HaeIII*, *Hinfl*, *CfoI* i *DdeI* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA). Les mostres, un cop digerides, es varen separar mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa al 3% en tampó TBE 1X (Tris 0,089 M; Àcid Bòric 0,089 M; EDTA 0,002 M, pH 8), usant RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20000X) com agent intercalant (Labotaq, Sevilla, Espanya) i HyperLadder™ 100bp com a marcador de pes molecular (Bioline, Londres, Regne Unit). Els productes de la digestió enzimàtica es varen visualitzar gràcies a un transil·luminador Gel Doc™ XR de Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, EUA). La comparació de les longituds dels fragments de l'amplificat i de les digestions enzimàtiques amb les establertes per Esteve-Zarzoso et al. (1999) en el seu treball va permetre la identificació a nivell d'espècie dels llevats aïllats.

Per a confirmar la identificació de les espècies no-*Saccharomyces* aïllades, es va realitzar la seqüenciació dels dominis D1/D2 del gen de l'ARNr 26S. En primer lloc es va realitzar una amplificació de la regió mitjançant els primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') i NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Kurtzman et al., 1998). El producte de la PCR va ser enviat a seqüenciar per Macrogen Inc. (Seül, Corea del Sud) utilitzant un seqüenciador d'ADN capil·lar automatitzat (ABI3730XL). Les seqüències obtingudes es compararen amb les de la base de dades GenBank utilitzant l'eina Nucleotide BLAST (NCBI).

2.3. Tipificació de soques de *S. cerevisiae*

La tipificació dels llevats identificats com a *S. cerevisiae* es va fer mitjançant la tècnica dels elements Delta (δ) descrita per Legras et al. (2003). La mix de la PCR es va preparar amb Reaction Buffer 1X, MgCl₂ [2,5 mM], primer Delta 12 [1 μ M] (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3'), primer Delta 21 [1 μ M] (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'), dNTPs [0,2 mM], Taq Polimerasa [0,02 U/ μ l] i BSA [0,20 mg/ml] (Bioline, Londres, Regne Unit). L'amplificació es va dur a terme amb un termociclador T100™ de Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, EUA). Per a l'amplificació es va seguir el següent protocol: un cicle de 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. Tot seguit es va realitzar una electroforesi en gel d'agarosa a l'1,6% en tampó TBE 1X (Tris 0,089 M; Àcid Bòric 0,089 M; EDTA 0,002 M, pH 8), usant RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20000X) com agent intercalant (Labotaq, Sevilla, Espanya) i HyperLadder™ 1kb com a marcador de pes molecular (Bioline, Londres, Regne Unit). Els productes de la PCR es varen visualitzar gràcies a un transil·luminador Gel Doc™ XR de Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, EUA). La visualització de perfils de bandes diferents va permetre identificar les diferents soques de *S. cerevisiae*.

2.4. Microfermentacions amb cultius purs dels llevats aïllats

Es varen realitzar fermentacions a escala de laboratori en erlenmeyers amb 200 ml de most congelat simulant les característiques de l'Albariño (pH, acidesa total tartàrica, densitat, sucres, etc.). Aquestes es varen realitzar a 16°C i sense agitació. Es varen inocular les diferents soques aïllades per separat i també es va realitzar una inoculació massiva amb totes les soques juntes per fer un estudi de competitivitat. En tots els casos es va inocular una concentració de $2 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml i en la inoculació massiva es varen inocular tots els llevats a la mateixa proporció a una concentració final de $2 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml. Totes les microfermentacions es varen dur a terme per duplicat i periòdicament es va mirar la densitat del most i la població de llevats totals i viables, mitjançant càmera de recompte i sembra en plaques YPDA, respectivament. Les fermentacions es consideraren acabades quan la concentració de sucres residuals era inferior a 1 g/l. Finalitzada la fermentació es va analitzar el perfil genètic mitjançant la tècnica dels elements Delta per a determinar quina soca s'havia imposat.

2.5. Microfermentacions amb cultius mixtes dels llevats aïllats

La soca amb major percentatge d'imposició en la fermentació amb inoculació massiva de totes les soques identificades es va utilitzar per realitzar fermentacions mixtes amb *S. cerevisiae* i les no-*Saccharomyces* aïllades. Es varen realitzar fermentacions en erlenmeyers amb 200 ml de most congelat, totes per duplicat, a 16°C i sense agitació. Es va inocular una concentració total de $2 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml (un 90% de l'espècie no-*Saccharomyces* i un 10% de la soca de *S. cerevisiae*). Periòdicament es va mirar la densitat del most i la població de llevats totals i viables. Les fermentacions es consideraren acabades quan la concentració de sucres residuals era inferior a 1 g/l.

2.6. Anàlisi química

De totes les microfermentacions realitzades es varen analitzar els següents paràmetres enològics: sucres residuals, grau alcohòlic, acidesa volàtil, acidesa total tartàrica, pH, sulfits totals, àcid L-làctic, àcid L-màlic i glicerol. El grau alcohòlic, l'acidesa volàtil, l'acidesa total tartàrica i el pH es varen determinar mitjançant espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR) amb un equip WineScan FT120 (Foss Electric, Barcelona, Espanya). Les concentracions de sucres residuals (D-glucosa/D-fructosa), de sulfits totals, d'àcid L-làctic, d'àcid L-màlic i de glicerol es varen mesurar mitjançant mètodes enzimàtics o colorimètrics amb un analitzador automàtic (Random Access Analyzer Y15) amb els seus corresponents kits enzimàtics (BioSystems S.A., Barcelona, Espanya).

2.7. Anàlisi estadística

Les diferències significatives es van determinar mitjançant anàlisi unidireccional de variància (ANOVA) mitjançant el test Tukey (HSD) amb el paquet XLSTAT per al programari d'Excel. El nivell estadístic de significació es va fixar en $P \leq 0,05$.

3. Resultats i discussió

3.1. Microvinificacions inicials

Inicialment es varen realitzar tres microvinificacions espontànies amb el most Albariño per aïllar-ne els llevats a l'inici, meitat i final de fermentació i identificar-los. A la *Taula 1* i a la *Taula 2* es mostren els resultats de l'anàlisi química del most inicial i del vi final, respectivament. A la *Figura 1* es mostra l'evolució de la densitat i de la població de llevats totals i viables durant la fermentació alcohòlica de cada una de les microvinificacions. En els tres casos, l'evolució de la densitat mostra una fase de latència bastant llarga, ja que al tractar-se de vinificacions espontànies, les fermentacions varen tardar entre 10 i 15 dies en començar. Les tres fermentacions acabaren als 33 dies, amb una concentració de sucres residuals inferior a 2 g/l.

Taula 1. Anàlisi química del most inicial

	º Brix	Sucres (g/l)	PAN (g/l)	Amonia (g/l)	NFA (g/l)	pH	Acidesa total (g/l)	Glucònic
GL1	17,3	161,6	57,7	47,0	94,4	3,01	8,93	0,014
GL2	19,3	184,0	98,7	76,0	158,0	3,05	9,28	0,013
GL3	24,7	246,0	71,1	64	121,0	3,06	10,22	0,012

Taula 2. Anàlisi química del vi final

	Glu+Fru (g/l)	pH	Acidesa total (g/l)	Grau alcohòlic (%)	Àcid L-màlic (g/l)	Àcid L-làctic (g/l)
GL1	0,39	2,84	10,22	11,5	4,85	0,12
GL2	0,73	2,89	10,25	11,9	4,56	0,00
GL3	1,90	2,94	9,37	13,3	3,69	0,01

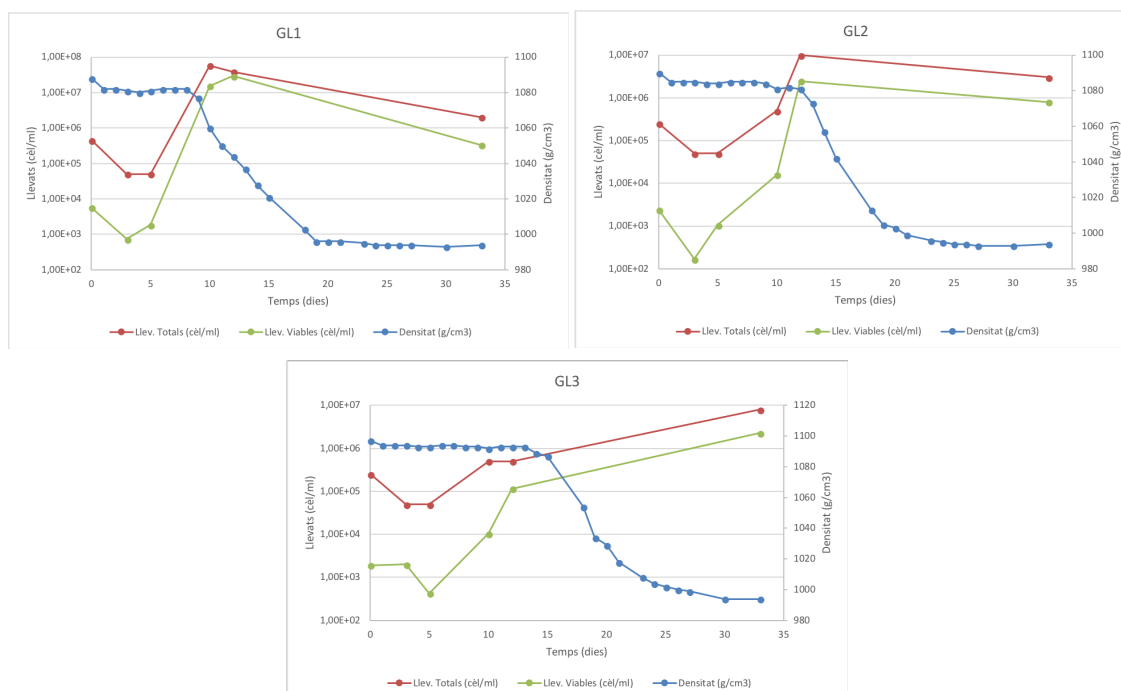


Figura 1. Evolució de la densitat i de la població de llevats totals i viables durant la fermentació alcohòlica de les tres microvinificacions.

3.2. Identificació dels llevats aïllats

Es varen identificar sis espècies diferents entre les tres parcel·les. La parcel·la Freixo és la que conté més biodiversitat de llevats, ja que es varen identificar fins a sis espècies diferents: *Rhodotorula glutinis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus flavescens*, *Hanseniaspora uvarum* i *Hanseniaspora guilliermondii*. A la parcel·la Prado de Allos s'identificaren tres espècies diferents: *Rhodotorula glutinis*, *Hanseniaspora uvarum* i *Hanseniaspora guilliermondii*, i a la parcel·la Cortiñas es varen trobar quatre espècies de llevats: *Rhodotorula glutinis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum* i *Hanseniaspora guilliermondii*. A les tres parcel·les, els llevats del gènere *Hanseniaspora* (principalment *H. uvarum*) es varen trobar en major percentatge que les altres espècies (els resultats no es mostren). En el raïm provinent de les parcel·les no es varen identificar soques de *S. cerevisiae*.

A la primera microvinificació (GL1) només es varen aïllar llevats de l'espècie *S. cerevisiae* en els tres punts de la fermentació. De la segona microvinificació (GL2) es varen aïllar, a més, dues espècies diferents a *S. cerevisiae* a l'inici de la fermentació (*Pichia membranaefaciens* i *Metschnikowia pulcherrima*). La tercera microvinificació (GL3) va ser la que va presentar major diversitat d'espècies de llevats, ja que a l'inici de fermentació es varen aïllar cinc espècies diferents (*Pichia membranaefaciens*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida zemplinina* i *Saccharomyces cerevisiae*). A meitat i a final de fermentació l'única espècie aïllada en les tres microvinificacions va ser *S. cerevisiae*. A la Figura 2 es mostra la diversitat d'espècies de llevats aïllats en cada etapa de les tres microvinificacions. A l'inici de fermentació destaca, en el cas de les microvinificacions GL2 i GL3, l'elevat percentatge de l'espècie *Pichia membranaefaciens*. Altres autors ja han documentat la seva presència a l'inici de la fermentació alcohòlica (Pramateftaki et al., 2000).

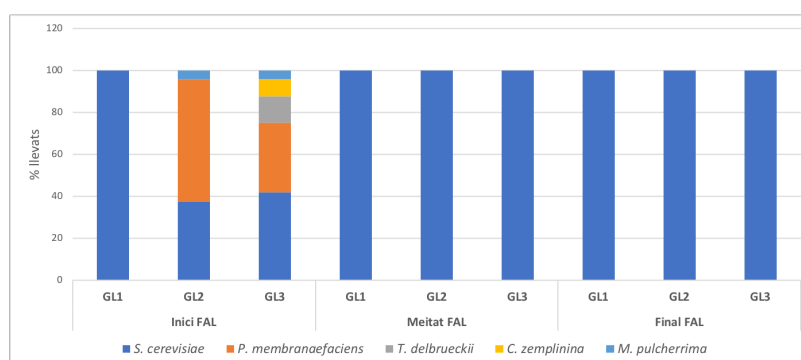


Figura 2. Diversitat d'espècies de llevats aïllats en cada etapa de les tres microvinificacions.

3.3. Tipificació de soques de *S. cerevisiae*

La comparació dels perfils dels fragments amplificats mitjançant els primers Delta ens va permetre diferenciar fins a divuit soques de *S. cerevisiae* diferents. A la Figura 3 es mostra el gel d'electroforesi amb els perfils dels amplificats de les divuit soques identificades.

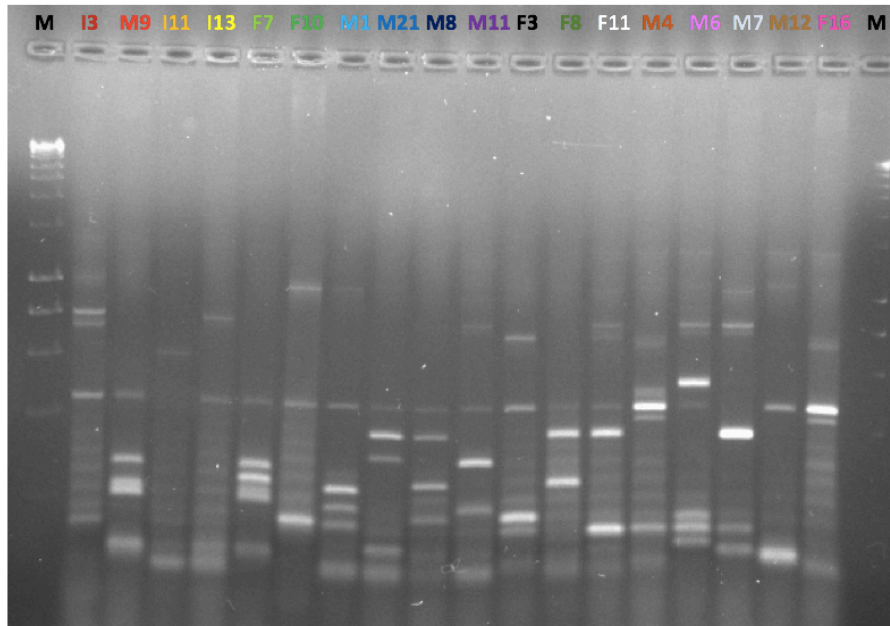


Figura 3. Gel d'electroforesi dels fragments amplificats mitjançant els primers Delta 12 i Delta 21 de les 18 soques de *S. cerevisiae* (M: marcador molecular 1kb).

3.4. Microfermentacions amb cultius purs dels llevats aïllats

El most inicial amb el que es varen realitzar les fermentacions tenia una concentració de sucres de 233,0 g/l, una acidesa total tartàrica de 8 g/l, i un pH de 3,1. Les fermentacions alcohòliques inoculades amb les divuit soques autòctones es varen realitzar correctament, amb una concentració final de sucres residuals (D-glucosa/D-fructosa) inferior a 1 g/l. A la *Figura 4* es mostra l'evolució de les densitats per cada una de les microfermentacions realitzades. L'evolució de les poblacions de llevats totals i viables no es mostren. Per cada microvinificació es va determinar el percentatge d'imposició al final de la fermentació, obtenint-se una imposició del 100% en tots els casos (els resultats no es mostren).

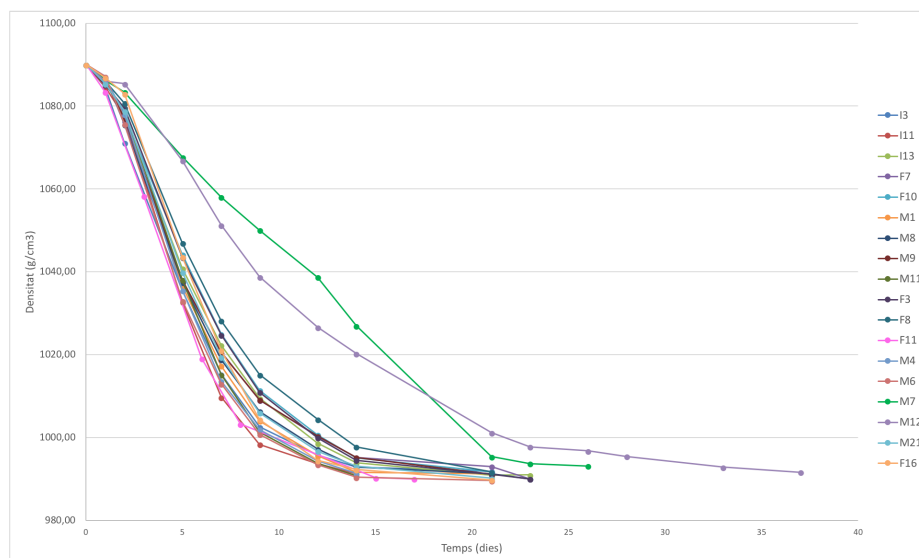


Figura 4. Evolució de la densitat de les 18 microfermentacions realitzades amb cultius purs de les diferents soques de *S. cerevisiae*.

A la *Figura 4*, on es representa l'evolució de la densitat del most per cada microvinificació, es pot observar que les soques M7 i M12, tot i aconseguir finalitzar la fermentació, necessitaren més temps per a fer-ho en comparació amb les altres (26 i 37 dies, respectivament). Les altres soques finalitzaren la fermentació amb una mitjana de 20 dies: quatre d'elles ho feren en 23 dies (I13, F7, M8 i F3), vuit ho feren en 21 dies (I3, F10, M1, M9, F8, M6, M21 i F16), una ho va fer en 17 dies (F11), i tres ho varen fer en 14 dies (I11, M11 i M4).

Finalitzada la fermentació, es va realitzar una anàlisi d'alguns paràmetres químics del vi final. Els resultats dels diferents paràmetres químics per cada una de les divuit microfermentacions es mostren a la *Taula 3*.

Taula 3. Paràmetres analítics mesurats al final de la fermentació de les 18 soques de S. cerevisiae. Els resultats s'expressen com la mitjana dels duplicats i la seva desviació estàndard (Mitjana ± Desv. Est). Lletres diferents en una mateixa columna indiquen diferències significatives (P<0,05)

	Grau alcohòlic (%)	Acidesa volàtil (g/l)	Acidesa total (g/l)	pH	Sulfits totals (mg/l)	Àcid L-làctic (g/l)	Àcid L-màlic (g/l)	Glicerol (g/l)
I3	12,91±0,09 cd	0,55±0,06 ab	8,01±0,43 ab	3,13±0,04 bci	21,50±2,12 abh	0,00±0,00 a	2,24±0,03 bcd	4,70±0,13 cdefgn
I11	12,94±0,06 cd	0,60±0,00 abcd	8,15±0,08 ab	3,06±0,01 ab	19,00±1,41 abe	0,02±0,01 a	2,48±0,04 defj	4,31±0,07 abcdf
I13	12,60±0,03 bc	0,61±0,01 abcd	8,88±0,06 abc	3,09±0,01 abce	17,00±1,41 a	0,01±0,01 a	2,62±0,11 defgl	4,06±0,07 abcd
F7	12,72±0,03 bcd	0,59±0,01 abc	8,78±0,01 abc	3,12±0,01 abch	25,00±0,00 bm	0,00±0,00 a	2,50±0,01 defgk	4,57±0,04 bcdefgj
F10	12,82±0,10 cd	0,64±0,03 bcd	8,52±0,01 ab	3,16±0,01 cl	21,50±2,12 abh	0,02±0,01 a	2,37±0,07 cdeh	4,61±0,19 bcdefgl
M1	12,78±0,13 cd	0,60±0,05 abcd	8,21±0,34 ab	3,10±0,06 abcf	20,50±0,71 abg	0,01±0,01 a	2,25±0,03 bcde	4,53±0,05 bcdefgi
M8	12,78±0,04 cd	0,59±0,01 abc	8,62±0,05 ab	3,12±0,01 abch	18,00±2,83 abc	0,02±0,02 a	2,33±0,00 cdeg	4,25±0,07 abce
M9	12,72±0,08 bcd	0,64±0,03 bcd	8,88±0,06 abc	3,11±0,01 abcg	23,50±0,71 abk	0,01±0,01 a	2,54±0,06 efgl	4,76±0,04 defgo
M11	12,98±0,01 cd	0,51±0,01 ab	8,01±0,04 ab	3,08±0,01 abcd	22,50±0,71 abi	0,00±0,00 a	2,46±0,04 defi	5,01±0,16 gs
F3	12,72±0,07 bcd	0,74±0,02 d	8,93±0,05 abc	3,12±0,02 abch	20,00±1,41 abf	0,01±0,01 a	2,46±0,00 defi	4,52±0,05 bcdefh
F8	12,80±0,11 cd	0,53±0,01 ab	8,84±0,06 abc	3,08±0,01 abcd	18,50±2,12 abd	0,02±0,02 a	2,60±0,01 fgim	4,00±0,20 a
F11	12,89±0,01 cd	0,48±0,03 a	8,41±0,08 ab	3,14±0,01 bck	23,50±0,71 abj	0,01±0,00 a	2,18±0,09 abc	4,61±0,01 bcdefgk
M4	12,96±0,02 cd	0,64±0,03 bcd	8,17±0,11 ab	3,07±0,00 abc	23,50±0,71 abk	0,00±0,00 a	2,32±0,05 cdf	4,96±0,04 fgq
M6	12,83±0,05 cd	0,65±0,04 bcd	7,92±0,40 a	3,14±0,04 bck	16,50±2,12 ab	0,00±0,00 a	2,09±0,04 ab	4,26±0,10 abc
M7	12,39±0,13 ab	1,44±0,01 e	9,77±0,17 c	3,12±0,02 abch	16,00±1,41 a	0,01±0,00 a	2,24±0,04 bcd	6,05±0,19 ht
M12	12,07±0,13 a	0,58±0,01 ab	8,95±0,07 bc	3,03±0,01 a	20,00±2,83 abf	0,01±0,00 a	2,60±0,00 go	4,40±0,14 abcdeg
M21	12,92±0,09 cd	0,73±0,02 cd	8,19±0,45 ab	3,13±0,03 bcj	18,50±2,12 abd	0,02±0,01 a	2,01±0,07 a	4,80±0,04 fgfp
F16	13,02±0,06 d	0,63±0,08 abcd	8,50±0,46 ab	3,08±0,01 abce	26,00±1,41 bn	0,01±0,01 a	2,25±0,00 bcde	4,99±0,08 fgr

El grau alcohòlic del vi obtingut en totes les fermentacions va ser pròxim a un 13% (% vol), típic de vins de la varietat Albariño (Vilanova et al., 2011). S'observen diferències significatives entre les soques M12 i F16, amb un grau de diferència entre elles. L'acidesa volàtil, representada en grams d'àcid acètic per litre està entre 0,5 i 0,7 g/l, excepte la soca M7 que presenta una acidesa volàtil de 1,44 g/l. La soca que ha produït menor acidesa volàtil és la F11 (0,48 g/l). S'ha vist que en baixes concentracions (entre 0,2 i 0,6 g/l), típicament trobades al vi, aquest compost pot aportar una acidesa agradable i, a més, serveix com a precursor dels èsters d'acetat, responsables del caràcter afruitat de molts vins. No obstant, a nivells superiors l'àcid acètic es considera un signe de deteriorament del vi, ja que confereix al vi un gust agre i aroma de vinagre, i la seva producció pot conduir a la formació de compostos volàtils desagradables, com l'acetat d'etil que fa olor a pinta-angles. De fet, la OIV estableix que el límit màxim acceptable per a l'acidesa volàtil en la majoria dels vins és d'1,2 g/l d'àcid acètic (Vilela-Moura et al., 2011). L'acidesa total, expressada en aquest cas en grams d'àcid tartàric per litre està entre 8 i 9 g/l. Aquest compost juga un paper important en el manteniment de l'estabilitat microbiològica i química dels vins. En vins de la varietat Albariño, l'acidesa total sol ser relativament alta (entre 7,5 i 8,5 g/l d'àcid tartàric) (Vilanova et al., 2005). En aquest cas, la soca M7 i la M6 presenten diferències significatives, presentant una diferència de 1,85 g/l d'àcid

tartàric. El pH és un paràmetre molt relacionat amb l'acidesa total del vi. En tots els casos el pH està entre 3 i 3,2, típic de vins d'aquesta varietat (Vilanova et al., 2006), i no s'observen diferències significatives entre les soques. La concentració de sulfits totals en els vins obtinguts està entre 16 i 26 mg/l. Les soques M7 i I13 són les que presenten concentracions més baixes i les soques F7 i F16 les més altes. Durant la fermentació, és freqüent que els llevats formin quantitats mínimes d'anhidrid sulfurós o sulfits, normalment de 10 a 30 mg/l, depenent de la soca i de les condicions de fermentació, encara que alguns llevats poden arribar a sintetitzar fins a 100 mg/l. A més, s'ha vist que temperatures de fermentació baixes afavoreixen la producció de sulfits (Hidalgo Togores, 2011). Les al·lèrgies causades pels sulfits són cada vegada més freqüents i causen símptomes com mal de cap, nàusees, irritació gàstrica i dificultats per respirar en persones asmàtiques, motiu pel qual la seva concentració màxima permesa als vins s'ha anat reduint cada cop més (Santos et al., 2012). Els nivells d'àcid L-làctic són inferiors a 0,05 g/l en tots els casos. L'àcid làctic és un compost produït pels llevats durant la fermentació alcohòlica i procedent de la reducció de l'àcid pirúvic, encara que la síntesi de l'isòmer àcid D-làctic és major que la síntesi d'àcid L-làctic, que es forma en petites quantitats a l'inici de la fermentació (Hidalgo Togores, 2011). Les concentracions d'àcid L-màlic estan entre 2 i 2,6 g/l, sent la soca M21 la que presenta un nivell més baix. L'àcid màlic és un dels àcids orgànics més abundants del raïm i en elevades concentracions aporta un gust herbaci i a verd, i un aroma que recorda a pomes verdes. S'ha vist que la majoria de soques de *S. cerevisiae* normalment degraden entre un 3 i un 45% de l'àcid màlic present al most durant la fermentació i, per tant, no és una degradació completa (Swiegers et al., 2005). Finalment, els nivells de glicerol estan entre 4 i 6 g/l, sent la soca F8 la que dóna una concentració menor i la M7 la que produeix major concentració. El glicerol és un compost sintetitzat pels llevats i es troba als vins en concentracions entre 4 i 11 g/l. Posseeix un gust dolç i aporta una certa untuositat als vins, per la qual cosa és considerat com un paràmetre de qualitat (Hidalgo Togores, 2011).

La fermentació realitzada amb inoculació massiva de les divuit soques juntes es va realitzar correctament i va acabar en 16 dies, amb una concentració final de sucres residuals inferior a 1 g/l. Un cop finalitzada la fermentació, es varen analitzar diferents paràmetres químics. Es va obtenir un grau alcohòlic de 12,8 % (% vol), una acidesa volàtil de 0,46 g/l d'àcid acètic, una acidesa total tartàrica de 8,7 g/l, un pH de 3, una concentració de SO₂ total de 23,5 g/l, una concentració d'àcid L-làctic de 0,02 g/l, una concentració d'àcid L-màlic de 2,4 g/l i una concentració de glicerol de 5,1 g/l. A la *Figura 5* es mostren els gels d'electroforesi dels patrons de bandes de les soques aïllades a final de fermentació. Dels llevats aïllats, la soca amb major percentatge d'imposició va ser la F11 (23,73%), seguida de la M4 (18,64%) i la F8 (16,95%) (*Figura 6*).

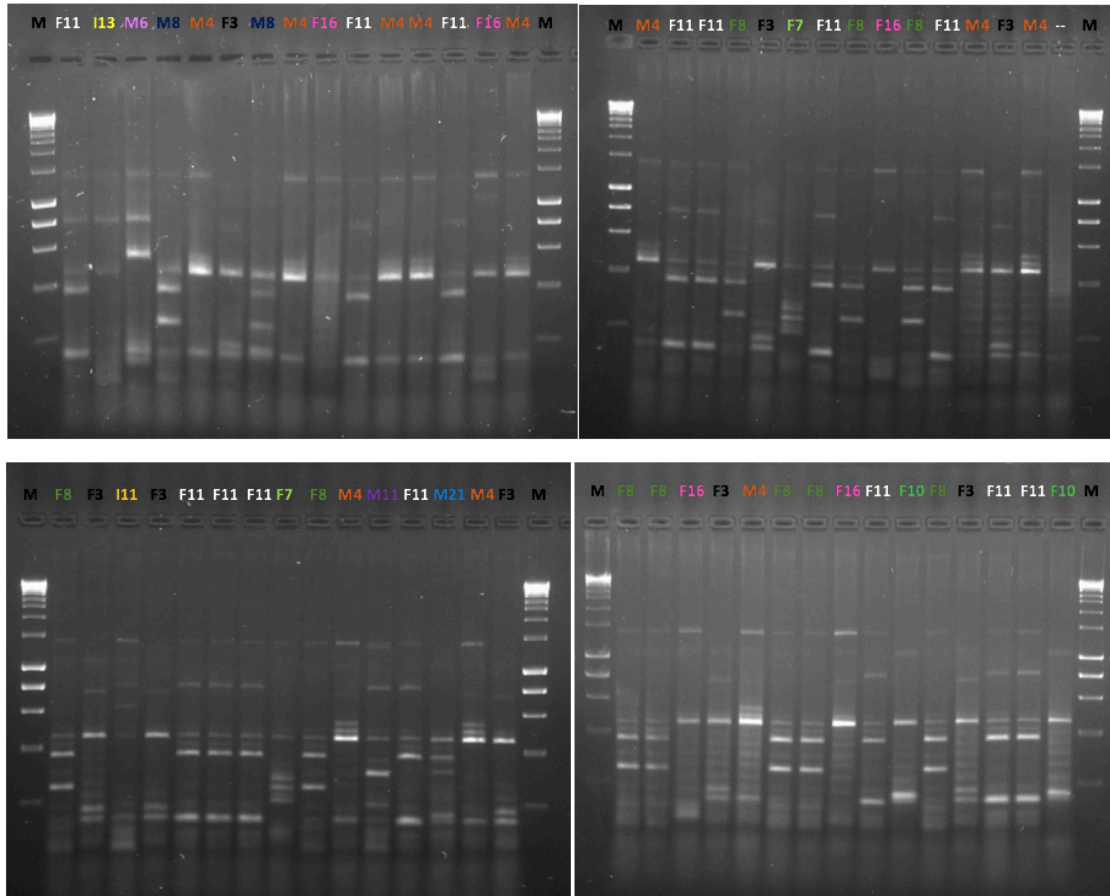


Figura 5. Gels d'electroforesi dels fragments amplificats mitjançant els primers Delta12 i Delta 21 de les soques de llevat aïllades al final de la fermentació amb inoculació massiva (M: marcador molecular 1 kb).

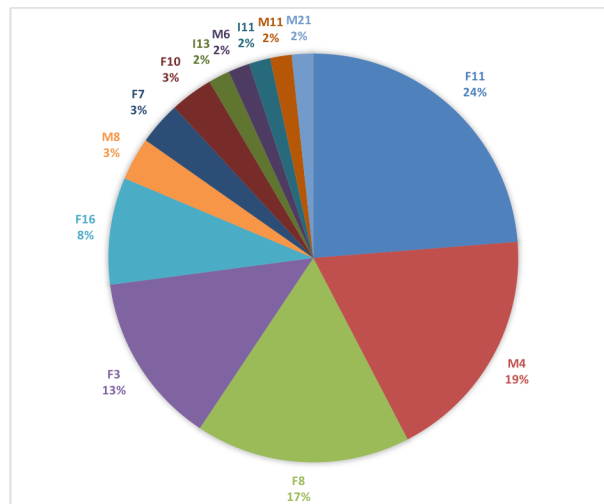


Figura 6. Percentatges d'imposició de les soques aïllades al final de la fermentació amb inoculació massiva.

De les soques amb major percentatge d'imposició (F11, M4 i F8), la primera va ser l'elegida per a realitzar les fermentacions amb cultius mixtes de les espècies no-*Saccharomyces* identificades inicialment, ja que en l'anàlisi química de les microfermentacions amb cultius purs era la que presentava menor acidesa volàtil ($0,48 \pm 0,03$ g/l) i, a més, va donar una concentració de glicerol relativament alta ($4,61 \pm 0,01$ g/l). De les altres dues, la M4 presentava una acidesa volàtil major ($0,64 \pm 0,03$ g/l) i la F8 una concentració de glicerol menor ($4,00 \pm 0,20$ g/l) (Taula 3).

3.5. Microfermentacions amb cultius mixtes dels llevats aïllats

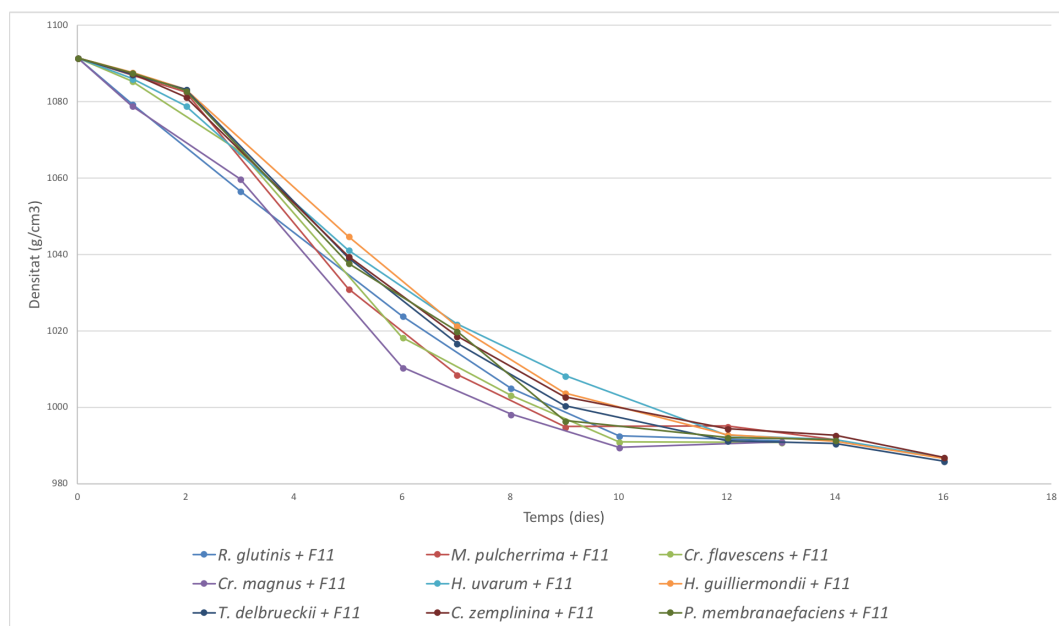


Figura 6. Evolució de la densitat de les 9 microfermentacions realitzades amb cultius mixtes de les diferents espècies de no-Saccharomyces i la soca F11 de *S. cerevisiae*.

Les microfermentacions realitzades amb cultius mixtes amb les espècies de no-Saccharomyces aïllades inicialment i la soca F11 de *S. cerevisiae* es varen realitzar totes correctament i varen finalitzar amb una concentració de sucres residuals inferior a 1 g/l. A la Figura 7 es mostra l'evolució de la densitat d'aquestes microfermentacions. Es pot observar que les fermentacions amb les espècies *Rhodotorula glutinis* i *Cryptococcus magnus* sembla que inicialment varen anar més ràpid i varen finalitzar als 13 dies, juntament amb la fermentació amb *Cryptococcus flavescens*. Les fermentacions amb les espècies *Metschnikowia pulcherrima* i *Pichia membranaefaciens* varen tardar 14 dies en finalitzar i la resta de fermentacions varen acabar en 16 dies. Tenint en compte que la fermentació amb el cultiu pur de la soca F11 va tardar 17 dies en finalitzar, totes les fermentacions amb cultius mixtes van trigar menys, especialment les fermentacions mixtes amb *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus magnus* i *Cryptococcus flavescens*.

Els resultats de l'anàlisi química dels diferents paràmetres mesurats al final de la fermentació es mostren a la Taula 4. El grau alcohòlic obtingut en les fermentacions amb inoculacions mixtes va ser en tots els casos pròxim al 13% (% vol), sense diferències significatives entre les espècies. Pel que fa a l'acidesa volàtil, la concentració d'àcid acètic està entre 0,35 i 0,50 g/l. L'espècie que va produir major nivell d'àcid acètic va ser *H. guilliermondii*, mentre que la *C. zemplinina* i la *Cr. magnus* foren les que produïren menors nivells d'aquest compost. L'acidesa total tartàrica està entre 7,30 i 8,45 g/l. La fermentació amb *H. uvarum* va donar la menor concentració d'àcid tartàric, mentre que en la fermentació amb *Cr. magnus* es va obtenir el major nivell d'aquest àcid orgànic. El pH de tots els vins va ser pròxim a 3, sense diferències significatives entre les espècies. La concentració de sulfits totals va des de 11,50 mg/l a 20,50 mg/l, sent *H. uvarum* la que va donar menors nivells de sulfits i *P. membranaefaciens* la que va donar majors concentracions. Els nivells d'àcid L-làctic són inferiors a 0,05 g/l en tots els casos, sense diferències significatives entre les espècies. Tampoc es varen trobar diferències

significatives entre els llevats pel que fa als nivells d'àcid L-màlic, que van des de 2,05 g/l a 2,40 g/l. Finalment, les concentracions de glicerol produïdes estan entre 4,40 i 5,60 g/l, sent la fermentació amb *C. zemplinina* la que va donar menors nivells i la fermentació amb *Cr. magnus* la que va donar la major concentració d'aquest compost. Tot i la diversitat d'espècies no-*Saccharomyces*, és cert que en general no s'observen grans diferències entre elles com s'esperaria. Així i tot, els paràmetres que mostren majors diferències són l'acidesa volàtil, la concentració de sulfits totals i els nivells de glicerol.

Taula 4. Paràmetres analítics mesurats al final de la fermentació de les inoculacions mixtes. Els resultats s'expressen com la mitjana dels duplicats i la seva desviació estàndard (Mitjana ± Desv. Est). Lletres diferents en una mateixa columna indiquen diferències significatives ($P \leq 0,05$)

	Grau alcohòlic (%)	Acidesa volàtil (g/l)	Acidesa total (g/l)	pH	Sulfits totals (mg/l)	Àcid L-làctic (g/l)	Àcid L-màlic (g/l)	Glicerol (g/l)
<i>R. glutinis</i> + F11	12,85±0,01 a	0,46±0,01 cd	8,34±0,01 de	3,09±0,02 a	17,00±1,41 bc	0,01±0,00 a	2,41±0,33 a	4,88±0,04 ab
<i>Cr. magnus</i> + F11	12,82±0,25 a	0,36±0,01 a	8,45±0,04 e	3,08±0,01 a	17,00±1,41 bc	0,02±0,01 a	2,24±0,23 a	5,64±0,21 d
<i>M. pulcherrima</i> + F11	12,85±0,02 a	0,42±0,00 bc	8,03±0,05 cd	3,06±0,03 a	18,50±0,71 bc	0,01±0,01 a	2,19±0,05 a	4,95±0,06 abc
<i>T. delbrueckii</i> + F11	12,93±0,13 a	0,43±0,01 bc	7,62±0,08 ab	3,06±0,02 a	12,00±1,41 a	0,03±0,02 a	2,20±0,04 a	5,50±0,19 cd
<i>Cr. flavescens</i> + F11	12,80±0,06 a	0,42±0,01 b	8,32±0,04 de	3,08±0,01 a	17,50±0,71 bc	0,00±0,00 a	2,16±0,20 a	5,11±0,07 bcd
<i>P. membranaefaciens</i> + F11	12,80±0,06 a	0,42±0,01 b	7,86±0,24 bc	3,07±0,02 a	20,50±2,12 c	0,01±0,00 a	2,06±0,23 a	5,10±0,20 bcd
<i>H. guilliermondii</i> + F11	12,82±0,08 a	0,48±0,02 d	7,49±0,01 a	3,07±0,01 a	15,50±0,71 ab	0,01±0,01 a	2,12±0,04 a	4,94±0,19 ab
<i>H. uvarum</i> + F11	12,82±0,00 a	0,41±0,00 b	7,28±0,01 a	3,08±0,00 a	11,50±0,71 a	0,02±0,00 a	2,20±0,08 a	4,95±0,07 abc
<i>C. zemplinina</i> + F11	12,94±0,04 a	0,35±0,01 a	7,45±0,07 a	3,08±0,01 a	15,50±0,71 ab	0,01±0,00 a	2,05±0,07 a	4,41±0,06 a

L'anàlisi química de la fermentació amb el cultiu pur de la soca F11 va donar un 12,9% d'etanol, un pH de 3,14 i les següents concentracions: 0,48 g/l d'àcid acètic, 8,41 g/l d'àcid tartàric, 23,50 mg/l de sulfits totals, 0,01 g/l d'àcid L-làctic, 2,18 g/l d'àcid L-màlic, i 4,61 g/l de glicerol (Taula 3). Si comparem aquests resultats amb els de la Taula 4, el grau alcohòlic, el pH, l'acidesa total i els nivells d'àcid L-làctic i àcid L-màlic pràcticament no mostren diferències entre la fermentació amb cultiu pur i les fermentacions mixtes. No obstant, alguns estudis han mostrat que determinades espècies de no-*Saccharomyces* poden ajudar a disminuir el grau alcohòlic del vi. Per exemple, Zhang et al. (2018) varen veure que la co-inoculació de *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* permetia reduir el contingut d'etanol del vi, i Contreras et al. (2014) determinaren que la inoculació seqüencial de *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae* també era capaç de disminuir el grau alcohòlic. Les fermentacions mixtes amb *Cr. magnus* i amb *C. zemplinina* donaren una acidesa volàtil bastant inferior a la produïda en la fermentació amb cultiu pur. Rantsiou et al. (2012) varen veure que la co-inoculació de *C. zemplinina* i *S. cerevisiae* disminuïa l'acidesa volàtil del vi, resultats que es confirmarien en el nostre treball. Per altra banda, també s'ha vist que tant la co-inoculació com la inoculació seqüencial de *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* produïen una acidesa volàtil menor (Ciani et al., 2006). En el nostre cas, sí que es va veure una disminució de l'àcid acètic en la fermentació mixta amb *T. delbrueckii* però no molt significativa. Les concentracions de sulfits totals obtingudes en les fermentacions amb co-inoculació són menors que l'obtinguda en la fermentació amb cultiu pur de la soca F11. Aquest resultat pot ser interessant ja que avui en dia hi ha molt d'interès en el sector alimentari per la reducció d'aquest compost en els aliments i, en particular, en el vi (Santos et al., 2012). Pel que fa als nivells de glicerol, totes les fermentacions mixtes, excepte la realitzada amb *C. zemplinina*, donaren nivells majors d'aquest compost que la fermentació amb l'inòcul pur. Altres autors han demostrat l'increment en la concentració de glicerol en fermentacions mixtes amb no-*Saccharomyces*. Per exemple, es sap que els llevats apiculats, com els del gènere *Hanseniaspora*, i l'espècie *C. zemplinina* són grans productors de glicerol (Jolly et al., 2006). En el nostre cas, sí que sembla que la co-inoculació amb *H. uvarum* i amb *H. guilliermondii* incrementa lleugerament els nivells

de glicerol en comparació amb la fermentació amb cultiu pur. No obstant, els resultats obtinguts per l'espècie *C. zemplinina* no mostren un increment d'aquest compost com s'esperaria.

Cr. magnus, *Cr. flavescens* i *R. glutinis* són espècies que s'han trobat a la superfície del raïm i a la bodega, però hi ha poca informació sobre la capacitat fermentativa d'aquests llevats i, per tant, són espècies poc estudiades (González et al., 2007; Li et al., 2010). La resta d'espècies no-*Saccharomyces* aïllades estan més àmpliament estudiades i s'ha vist que tenen capacitat fermentativa i s'utilitzen habitualment en la vinificació com a cultius iniciadors mixtes amb *S. cerevisiae* (Varela et al., 2017). Les fermentacions realitzades amb cultius mixtes d'aquestes espècies més habituals i la soca F11 no presenten gaires diferències rellevants, encara que en general sembla que totes elles millorarien les característiques enològiques del vi en comparació amb les fermentacions amb cultiu pur de la soca F11. Per definir millor les diferències i poder seleccionar una espècie o l'altra, es podrien realitzar fermentacions amb inoculació seqüencial, és a dir, inocular inicialment l'espècie no-*Saccharomyces* i al cap d'uns dies inocular la soca de *S. cerevisiae*, per comparar amb els resultats de la co-inoculació.

4. Conclusions i perspectives de futur

L'aïllament de llevats autòctons a partir de raïm de tres parcel·les diferents i de microvinificacions espontànies i la seva identificació mitjançant tècniques moleculars ens ha permès identificar fins a deu espècies de llevats diferents (*Rhodotorula glutinis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus flavescens*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida zemplinina* i *Saccharomyces cerevisiae*). A més, també s'ha observat una gran diversitat intra-específica dintre de l'espècie *S. cerevisiae*, ja que s'han identificat divuit soques diferents. D'aquestes soques, totes, excepte la M7 i la M12, presenten característiques fermentatives òptimes per a ser utilitzades com a cultius iniciadors, destacant la soca F11. Aquesta, va ser la que va presentar un major percentatge d'imposició en la fermentació amb inoculació massiva i, a més, va produir nivells relativament baixos d'àcid acètic. Per altra banda, tot i la diversitat d'espècies de llevats no-*Saccharomyces*, no es varen observar grans diferències entre elles i, a més, alguns resultats obtinguts no s'ajustaren amb la bibliografia. La realització de fermentacions amb inoculació seqüencial d'aquestes espècies i les soques autòctones de *S. cerevisiae* probablement ajudaria a diferenciar millor les espècies. Per fer una selecció òptima dels llevats autòctons, en un futur s'haurien de realitzar fermentacions a escala industrial per a comprovar les aptituds fermentatives dels llevats i, a més, avaluar el perfil sensorial dels vins obtinguts. Així i tot, la decisió final dependrà del que interressi a la bodega, segons les característiques pròpies dels vins obtinguts.

5. Bibliografía

Barnett, J. A., 2000: A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast.*, **16**, 755–771.

Carrascosa, A. V.; Bartolome, B.; Robredo, S.; Leon, A.; Cebollero, E.; Juega, M.; Nunez, Y. P.; Martinez, M. C.; Martinez-Rodriguez, A. J., 2012: Influence of locally-selected yeast on the chemical and sensorial properties of Albariño white wines. *LWT - Food Science and Technology.*, **46**, 319–325.

Ciani, M.; Beco, L.; Comitini, F., 2006: Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology.*, **108**, 239–245.

Ciani, M.; Comitini, F.; Mannazzu, I.; Domizio, P., 2010: Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research.*, **10**, 123–133.

Contreras, A.; Hidalgo, C.; Henschke, P. A.; Chambers, P. J.; Curtin, C.; Varela, C., 2014: Evaluation of non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and Environmental Microbiology.*, **80**, 1670–1678.

Esteve-Zarzoso, B.; Manzanares, P.; Ramón, D.; Querol, A., 1998: The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology.*, **1**, 143–148.

Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A., 1999: Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology.*, **49**, 329–337.

Fernández, M.; Úbeda, J. F.; Briones, A. I., 2000: Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *International Journal of Food Microbiology.*, **59**, 29–36.

González, S. S.; Barrio, E.; Querol, A., 2007: Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *Journal of Applied Microbiology.*, **102**, 1018–1025.

Hidalgo Togores, J., 2011: *Tratado de enología*. Mundi-Prensa.

Jolly, N. P.; Augustyn, O. P. H.; Pretorius, I. S., 2006: The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. *South African Journal of Enology and Viticulture.*, **27**, 15–39.

Kurtzman, C. P.; Robnett, C. J., 1998: Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **73**, 331–371.

Legras, J. L.; Karst, F., 2003: Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS microbiology letters.*, **221**, 249–255.

Li, S. S.; Cheng, C.; Li, Z.; Chen, J. Y.; Yan, B.; Han, B. Z.; Reeves, M., 2010: Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology.*, **138**, 85–90.

Mas, A.; Reguant, C.; Beltran, G.; Esteve-Zarzoso, B.; Bordons, A., 2014: Cepas autóctonas del Priorat de Saccharomyces y no-Saccharomyces, y de bacterias lácticas, como iniciadores de vinificación: proyecto europeo Wildwine. *Acenología*.

Padilla, B.; Gil, J. V.; Manzanares, P., 2016: Past and future of non-Saccharomyces yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1–20.

Padilla, B.; Zulian, L.; Ferreres, À.; Pastor, R.; Esteve-Zarzoso, B.; Beltran, G.; Mas, A., 2017: Sequential inoculation of native non-Saccharomyces and Saccharomyces cerevisiae strains for wine making. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 1–12.

Pramateftaki, P. V.; Lanaridis, P.; Typas, M. A., 2000: Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: A case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *Journal of Applied Microbiology*, **89**, 236–248.

Querol, A.; Barrio, E.; Huerta, T.; Ramón, D., 1992: Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and environmental microbiology*, **58**, 2948–2953.

Rantsiou, K.; Dolci, P.; Giacosa, S.; Torchio, F.; Tofalo, R.; Torriani, S.; Suzzi, G.; Rolle, L.; Cocolin, L., 2012: Candida zemplinina can reduce acetic acid produced by Saccharomyces cerevisiae in sweet wine fermentations. *Applied and environmental microbiology*, **78**, 1987–1994.

Romano, P.; Caruso, M.; Capece, A.; Lipani, G.; Paraggio, M.; Fiore, C., 2003: Metabolic diversity of Saccharomyces cerevisiae strains from spontaneously fermented grape musts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **19**, 311–315.

Santos, M. C.; Nunes, C.; Saraiva, J. A.; Coimbra, M. A., 2012: Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, **234**, 1–12.

Swiegers, J. H.; Bartowsky, E. J.; Henschke, P. A.; Pretorius, I. S., 2005: Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **11**, 139–173.

Teixeira, A.; Caldeira, I.; Duarte, F. L., 2015: Molecular and oenological characterization of Touriga Nacional non-Saccharomyces yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, **118**, 658–671.

Tofalo, R.; Schirone, M.; Torriani, S.; Rantsiou, K.; Cocolin, L.; Perpetuini, G.; Suzzi, G., 2012: Diversity of Candida zemplinina strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiology*, **29**, 18–26.

Varela, C.; Borneman, A. R., 2017: Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, **34**, 111–128.

Vilanova, M.; Masneuf-Pomarède, I.; Dubourdieu, D., 2005: Influence of Saccharomyces cerevisiae strains on general composition and sensorial properties of white wines made from Vitis vinifera cv. albariño. *Food Technology and Biotechnology*, **43**, 79–83.

Vilanova, M.; Sieiro, C., 2006: Contribution by Saccharomyces cerevisiae yeast to fermentative flavour compounds in wines from cv. Albariño. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **33**, 929–933.

Vilanova, M.; Zamuz, S.; da Silva, A. F.; Masa, A.; Sieiro, C., 2011: Intraspecific diversity of yeast associated to vitis vinifera albariño must from different vineyard ecosystems. *Journal of the Institute of Brewing.*, **117**, 224–229.

Vilela-Moura, A.; Schuller, D.; Mendes-Faia, A.; Silva, R. D.; Chaves, S. R.; Sousa, M. J.; Côrte-Real, M., 2011: The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: Reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, **89**, 271–280.

Walker, G.; Stewart, G., 2016: *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages.*, **2**, 30.

Zhang, B. Q.; Luan, Y.; Duan, C. Q.; Yan, G. L., 2018: Use of *Torulaspota delbrueckii* Co-fermentation with two *Saccharomyces cerevisiae* Strains with different aromatic characteristic to improve the diversity of red wine aroma profile. *Frontiers in Microbiology.*, **9**.