

**Sergi Forcadell Mulet**

**AÏLLAMENT I IDENTIFICACIÓ DE MICROORGANISMES DE  
L'ENTORN AGRARI DE LO VILOT S.L. PER AL SEU ÚS INDUSTRIAL**

**TREBALL FI DE MÀSTER**

**Dirigit per Dra. Gemma Beltran Casellas**

**Máster en BEGUDES FERMENTADES**

**Facultat d'Enologia**



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Tarragona  
Juliol de 2018**

# ÍNDIX

1. – RESUM.....	2
2. – INTRODUCCIÓ.....	3
3. – OBJECTIU .....	5
4. – METODOLOGIA.....	6
4.1. - Obtenció i aïllament de microorganismes de l'entorn agrícola de Lo Vilot.....	6
4.2. - Identificació dels microorganismes útils per a l'elaboració de cervesa mitjançant sembla en medis selectius, tècniques bioquímiques i moleculars. ....	9
4.3. - Determinació de la utilitat comercial dels microorganismes aïllats. ....	11
5. – RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	12
5.1. - Obtenció i aïllament de microorganismes de l'entorn agrícola de Lo Vilot.....	12
5.2.- Identificació dels microorganismes útils per a l'elaboració de cervesa mitjançant, sembla en medis selectius, tècniques bioquímiques i moleculars. ....	22
5.3.- Determinació de la utilitat comercial dels microorganismes aïllats. ....	31
6. – CONCLUSIONS .....	32
7.- BIBLIOGRAFIA.....	34
ANNEX I.- PROTOCOLS PER A L'ELABORACIÓ DE MEDIS DE CULTIU .....	37
Medis de cultiu per a llevats. ....	37
Medis de cultiu per a bacteris làctics.....	38
ANNEX II.- PROTOCOLS PER A LA IDENTIFICACIÓ DE LLEVATS.....	39
PCR-RFLP per al fragment 5.8S del RNA ribosomal més ITS adjacents (Esteve-Zarzo et al, 1999). ....	39
Identificació bioquímica mitjançant l'estudi de les característiques fisiològiques dels llevats. .....	40
ANNEX III.- PROTOCOLS PER A LA IDENTIFICACIÓ DE BACTERIS LÀCTICS.....	42
Anàlisi del gen ribosomal 16s: ARDRA ( <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i> ) (Rodas et al, 2003). ....	42
ANNEX IV.- TAULES.....	44

## 1. – RESUM

Les cerveses fermentades amb llevats salvatges, *Saccharomyces* o no, així com l'ús d'ingredients de proximitat són dos de les tendències creixents actualment dins del món de la cervesa artesana. L'objectiu del present estudi és el d'aïllar microorganismes de l'entorn agrícola de Lo Vilot amb els quals es puguin realitzar fermentacions de mostos cervesers. Per complir aquest objectiu es van deixar inocular espontàniament mostos cervesers en dos llocs (camp d'ordi i camp de llúpol) i amb diferents tractaments (Acidificació, Llupulització i Blanc sense tractament). Les fermentacions espontànies es van monitoritzar i es va dur a terme un seguiment periòdic de les poblacions de microorganismes, llevats i bacteris, mitjançant la sembra en medis YPD + cloramfenicol (0,01% p/v) i YPD + natamicina (0,01% p/v), respectivament.

Per tal d'aïllar i identificar aquests microorganismes es van utilitzar altres medis selectius o diferencials. A més, els llevats aïllats es van identificar a nivell d'espècie mitjançant l'ampliació i restricció de la regió 5.8S-ITS del RNA ribosomal i, els bacteris làctics es van identificar a nivell d'espècie mitjançant l'ampliació i restricció de la regió 16S del DNA ribosomal. Complementàriament, i també amb la finalitat d'identificar espècies de llevats, es van realitzar proves bioquímiques com un test de metabolisme de sucres. Finalment es va analitzar la capacitat d'atenuar els sucres d'un most dels llevats aïllats mitjançant fermentacions controlades.

A partir dels mostos més poblats i amb millor aroma, mitjançant els mètodes esmentats, es van poder aïllar dues soques de *Saccharomyces cerevisiae* una de les quals amb una capacitat d'atenuar els sucres del most de  $60,67 \pm 0,18\%$ .

## 2. – INTRODUCCIÓ

Les cerveses belgues de fermentació espontània, anomenades làmbiques, són cerveses fermentades espontàniament produïdes a partir de blat sense maltejar i envellides en fusta (Sparrow, 2005).

L'elaboració d'aquesta cervesa comença amb un macerat i bullit més llarg de l'habitual, comparat amb mètodes més moderns. El most es refreda durant la nit en un recipient allargat i pla, obert de dalt, anomenat *coolship*. Després de la nit refredant-se, el most es transfereix a barriques de fusta, on la fermentació pot durar fins a 3 anys. Durant aquest temps, la mescla de microorganismes presents a l'ambient durant el refredament i els residents de les barriques, produeixen una mescla de sabors i aromes única. Generalment aquestes cerveses s'elaboren durant els mesos més freds per mirar d'incidir sobre la població de microorganismes (Sparrow, 2005) i per aconseguir refredar el most fins a 20°C només amb una nit (Spitaels et al., 2014).

Estudis previs han establert 4 fases diferents en el procés de fermentació, dominades per organismes diferents: fase dels *Enterobacteriaceae*, fase principal de fermentació, fase d'acidificació i fase de maduració (Van Oevelen, Spaepen, Timmermans i Verachtert, 1977; Verachtert i Iserentant, 1995).

La microbiota varia lleugerament segons si el procés és artesanal o industrial. No obstant, i exceptuant l'absència dels *Enterobacteriaceae* en el segon cas, els actors principals es repeteixen (Spitaels et al., 2015).

La fase d'*Enterobacteriaceae* comença als 3-7 dies i dura fins a 30-40 dies. Està protagonitzada per *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* i *Hafnia alvei* com a bacteris principals (Martens, Dawoud i Verachtert, 1991) i, *Hanseniaspora uvarum*, *Naumovia* (*Saccharomyces*) *dairensis* i *Saccharomyces uvarum* com a llevats principals (Van Oevelen et al., 1977; Verachtert i Iserentant, 1995).

Seguidament la fermentació principal comença després de 3-4 setmanes i està dominada per *S. cerevisiae*, *S. bayanus/pastorianus* i *S. uvarum* (Van Oevelen et al., 1977; Verachtert i Iserentant, 1995).

Posteriorment i a partir de 3-4 mesos de fermentació, es dona la fase d'acidificació la qual es caracteritza per la presència principal de *Pediococcus* spp. i ocasionalment de *Lactobacillus* spp., mentre que *Brettanomyces* spp. esdevé predominant a partir de 4-8 mesos de fermentació (Van Oevelen et al., 1977; Verachtert i Iserentant, 1995).

Finalment, la fase de maduració comença als 10 mesos i es caracteritza per un descens en la població de bacteris làctics (Van Oevelen et al., 1977; Verachtert i Iserentant, 1995).

Hi ha uns altres bacteris que contribueixen a l'acidificació del most, els bacteris acètics, els quals hi són presents durant tot el procés de fermentació (Van Oevelen et al., 1977; Verachtert i Iserentant, 1995).

La diferència entre l'elaboració artesanal i industrial d'aquestes cerveses de fermentació espontània és que les cerveseries industrials filtren, pasteuritzen i carbonaten forçosament la cervesa. Produeixen aquest tipus de cervesa durant tot l'any ja que poden refredar el most abans d'enviar-lo al *coolship*, sovint acidifiquen el most abans de la fermentació i acostumen a utilitzar contenidors de fusta més grans per a fermentar i madurar la cervesa (Spitaels et al., 2015). *Foedres* enlloc de barriques. Aquestes diferències tenen un impacte en la diversitat i quantitat de microorganismes presents en la fermentació de cada tipus de producció. Així doncs, en la producció industrial hi ha més diversitat de bacteris de l'àcid acètic, no hi creixen *Enterobacteriaceae* degut a la prèvia acidificació del most, la fase de *Brettanomyces* spp. acostuma a començar abans degut a que l'acidificació és més breu (ja es parteix d'un most pre-acidificat) i l'únic bacteri de l'àcid làctic aïllat és *Pediococcus damnosus* (Spitaels et al., 2015).

Aquest estil ha sofert una popularització creixent fins a aconseguir que desenes de cerveseries d'E.E.U.U. l'elaborin actualment (*Cascade Brewing, Russian River Brewing, The bruery, New Belgium Brewing Company, The lost Abbey, Pizza Port, Crooked Stave, Jolly Pumpkin Artisan Ales...*). No obstant això, i per qüestions de denominació d'origen, aquestes cerveses no es poden anomenar làmbiques, així doncs, queden emmarcades en un estil denominat *American Wild Ale* (BJCP, 2015).

Aquesta passió, que en un inici va viatjar de Bèlgica als Estats Units, està retornant al continent europeu per mitjà de les petites cerveseries. Sense anar més lluny i, a Catalunya, unes quantes microcerveseries ja estan elaborant cerveses que no solament són de fermentació espontània, sinó també amb microorganismes que, si bé són presents en les fermentacions espontànies, no

es troben en altres estils de cerveses més convencionals. Alguns exemples són Sediton de La Calavera Brewing Coop (*Sour Ale Barrel Aged*), Saison Foudre Blend de Garage Beer Co. (una *Farmhouse Ale* envellida en un *Foudre* i posteriorment mesclada amb una altra cervesa) i Brettas & Hops de Lo Vilot (IPA fermentada al 100% amb *Brettanomyces* sp.).

L'última cerveseria esmentada, Lo Vilot, és el que es coneix com una *Farm Brewery*, és a dir, una cerveseria que elabora els seus propis ingredients. Des del cultiu del llúpul i de l'ordi fins a la seva transformació per ser aptes per a l'elaboració de cervesa. No obstant, encara els hi manca un ingredient: una soca de *Saccharomyces cerevisiae* pròpia per fermentar la cervesa (o, en la línia de les cerveses espontànies, qualsevol altra espècie capaç de transformar un most en cervesa).

### 3. – OBJECTIU

L'objectiu d'aquest treball és el d'**aïllar i identificar microorganismes procedents de l'entorn agrícola de Lo Vilot per, posteriorment, provar-ne la seva utilitat en la fermentació de mostos cervesers.**

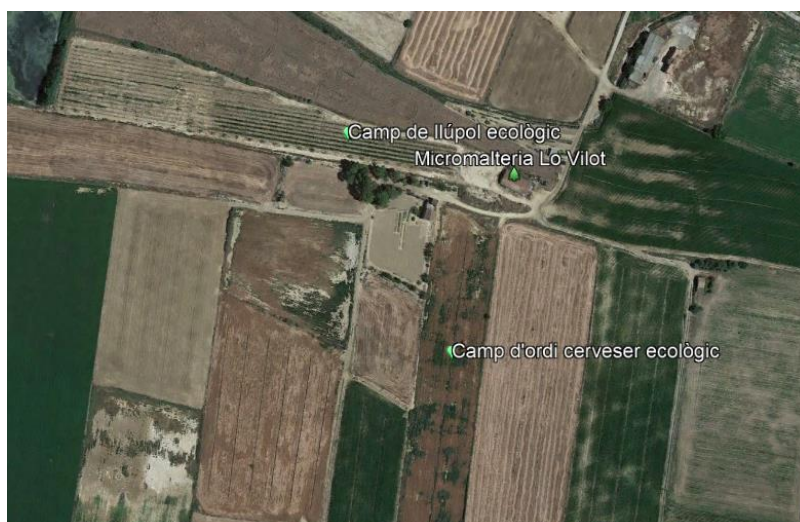
Aquest objectiu es pot dividir en tres subapartats que són el full de ruta del treball:

- Obtenció i aïllament de microorganismes de l'entorn agrícola de Lo Vilot.
- Identificació dels microorganismes útils per a l'elaboració de cervesa mitjançant tècniques bioquímiques i moleculars.
- Determinació de la utilitat dels microorganismes aïllats.

## 4. – METODOLOGIA

### 4.1. - Obtenció i aïllament de microorganismes de l'entorn agrícola de Lo Vilot.

Per a l'obtenció de microorganismes autòctons es va deixar el most cerveser en llocs escollits per tenir vegetació fresca, una bona circulació de l'aire, estar allunyats de potencials agents contaminants (Mello et al., 2013) i, a més, pel fet de pertànyer a la pròpia empresa. Tot i que algun autor també esmenta la possibilitat de capturar microorganismes on es tenen les barriques (Tonsmeire, 2011), en el cas de Lo Vilot es va desestimar la idea pel fet de tenir mostos fermentant amb soques comercials de *Brettanomyces* sp. que emascararien la possible captura d'un *Brettanomyces* sp. salvatge. Els dos camps escollits, un de llúpul i l'altre d'ordi cerveser, d'ara en endavant ubicació L i O respectivament, es mostren a la **Figura 1**.



**Figura 1.** Fotografia aèria de la zona on es van deixar els mostos per tal d'obtenir microorganismes. Extret de Google Earth Pro 23/06/2016

Per tal d'incidir sobre la composició de microorganismes capturats en cada most i, partint d'un most d'una densitat inicial de 1039 g/L i pH 5,51 elaborat al 100% amb malta *pale ale* pròpia de Lo Vilot, es van realitzar els següents tractaments:

- Acidificació del most (A). El most es va acidificar fins a un pH de 3,1 amb àcid làctic del 80% apte per al consum. El motiu d'aquesta acidificació es deu a la inhibició d'un pH inferior a 4,5 sobre el creixement de bacteris entèrics. Així doncs, amb aquest tractament es volia evitar la presència d'aquests microorganismes perjudicials per a la salut humana (Tonsmeire, 2011).

- Llopulització del most (H). L'objectiu d'aquest tractament va ser el de reduir el creixement de bacteris per l'efecte inhibitori dels iso- $\alpha$ -àcids del llúpul i, d'aquesta forma afavorir als llevats. 15 IBUS alenteixen de forma considerable el creixement de bacteris (Tonsmeire, 2011). Així doncs es van utilitzar 3,52 g de pèl·lets varietat Magnum de producció pròpia de Lo Vilot (10,47%  $\alpha$ -àcids, 15 minuts bullint) per a 3,8 L de most.
- Most sense modificar (B). El most es va deixar sense cap tractament per permetre-hi el creixement de tots els microorganismes.

Els mostos amb els diferents tractaments (A, H i B) es van distribuir equitativament en safates d'alumini per al forn cobertes amb una malla plàstica, per evitar l'entrada d'insectes (**Figura 2**) (Mello et al, 2013; Tonsmeire, 2011; Heit, 2014), en les dues ubicacions esmentades anteriorment (L i O). Es van realitzar tres rèpliques per tractament (**Taula 1**).

*Taula 1. Codis assignats a les mostres segons variable i rèplica. Primera lletra del codi fa referència a la ubicació (camp de llúpul L i camp d'ordi O), la segona lletra fa referència al tractament que ha rebut el most (acidificació A, llopulització L i blanc B) i el número fa referència a la rèplica (1, 2 i 3)..*

	Camp de llúpul			Camp d'ordi		
Acidificació	LA1	LA2	LA3	OA1	OA2	OA3
Llopulització	LH1	LH2	LH3	OH1	OH2	OH3
Blanc	LB1	LB2	LB3	OB1	OB2	OB3



**Figura 2.** Fotografia de les safates d'alumini amb la malla de plàstic. Font: Òscar Mogilnicki.

Els mostos es van deixar a l'aire lliure el vespre del dia 17 d'abril i es van recollir el matí del 18 d'abril (**Figura 3**). Posteriorment es van transvasar en ampolles de plàstic d'1,5 L a les quals se'ls hi havia col·locat un tub per un forat real·litzat expressament amb un trepant. El tub, el qual



s'ajustava perfectament al forat, feia la funció de *blow off* deixant escapar el CO<sub>2</sub> generat durant la fermentació a l'interior d'aigua amb àcid peracètic (Figura 4).



*Figura 3. Fotografia dels mostos deixats al camp d'ordi. Font: Òscar Mogilnicki.*



*Figura 4. Fotografia dels mostos en les ampolles amb els tubs blow off.*

Els mostos es van ubicar en una sala amb una temperatura que oscil·lava entre els 18 i els 23°C. La fermentació dels mostos es va monitoritzar mitjançant mesures diàries de pH amb el pH-metre PH110 (EXTECH), mesures de densitat ocasionals amb el densímetre digital Densito 30PX (Mettler Toledo) i sembra en medis YPD (2% glucosa; 2% peptona bacteriològica; 1% extracte de llevat; 2% agar bacteriològic p/v) amb cloramfenicol (0,01% p/v) per a l'aïllament de llevats i amb natamicina (0,01% p/v) per a l'aïllament de bacteris (antibiòtic i fungicida respectivament) als 0, 9, 23 i 56 dies després de l'exposició als microorganismes del medi ambient (18 d'abril, 27 d'abril, 11 de maig i 13 de juny).

A partir de les plaques de YPD-cloramfenicol (0,01% p/v) es van repicar colònies de llevats a medi WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient: 0,5% hidrolitzat enzimàtic de caseïna; 0,4% extracte de llevat; 5% dextrosa; 0,055% fosfat de monopotassi; 0,0425% clorur de potassi; 0,0125% clorur de calci; 0,0125% sulfat de magnesi; 0,00025% clorur fèrric; 0,00025% sulfat de manganès; 0,0022% verd de bromocresol; 2% agar p/v) per estudiar la morfologia dels llevats (mostres dia 23), i a partir de les plaques de YPD-natamicina (0,01% p/v) es van repicar colònies de bacteris a MRS (Man, Rogosa and Sharpe: 1% peptona; 0,8% extracte de carn; 0,4% extracte de llevat; 2% D(+)-glucosa; 0,2% hidrogen-fosfat dipotàssic; 0,5% trihidrat d'acetat de sodi; 0,2% citrat de triammoni; 0,02% heptahidrat de sulfat de magnesi; 0,005% tetrahidrat de sulfat de manganès p/v) per aïllar bacteris làctics (mostres dies 23 i 56). Totes les plaques es van incubar 2-3 dies a 28°C fins a observar el creixement de colònies. El protocol emprat per a la preparació dels medis de cultiu es pot consultar a l'Annex I.

#### 4.2. - Identificació dels microorganismes útils per a l'elaboració de cervesa mitjançant sembra en medis selectius, tècniques bioquímiques i moleculars.

##### **Identificació llevats**

###### Sembra en medis selectius

Per tal d'identificar llevats *Saccharomyces* es van realitzar repicats de colònies de llevats per duplicat: per un costat en agar lisina (1,175% *Yeast carbon base*; 0,25% lisina.HCl; 2% agar bacteriològic p/v) i per l'altre costat en YPD-cloramfenicol (0,01% p/v). Les colònies que creixen en ambdós medis son no-*Saccharomyces* mentre que les que tan sols creixen en YPD-cloramfenicol (0,01% p/v) son llevats *Saccharomyces* (mostres dies 0, 16 i 23).

També es van realitzar repicats de colònies de llevats a YPD amb cicloheximida (0,01% p/v) per intentar aïllar *Brettanomyces* sp. (mostres dia 23). Les plaques es van incubar 2-3 dies a 28°C fins a observar el creixement de colònies. El protocol emprat per a la preparació dels medis de cultiu es pot consultar a l'**Annex I**.

## Tècniques bioquímiques

Amb l'objectiu d'identificar els llevats, es va realitzar un test de metabolisme de sucres. En concret es va estudiar la capacitat de metabolitzar galactosa, sacarosa, trehalosa i glucosa (Wickerham i Burton, 1948) (**Figura 5**) (Protocol a l'**Annex II**).



**Figura 5.** Fotografia de l'assaig del metabolisme de sucres. Els tubs grocs són positius per al consum del sucre en qüestió mentre que els tubs blaus són negatius. Glucosa (G), Galactosa (Ga), Trehalosa (T), Sacarosa (S) i Blanc (B).

## Tècniques moleculars per a la identificació de llevats

Paral·lelament a la identificació bioquímica dels llevats, es va realitzar la tècnica molecular d'amplificació i restricció del DNA ribosomal coneguda com a PCR-RFLP rDNA, la qual s'utilitza per amplificar el fragment 5,8s de RNA ribosomal i els ITS adjacents (Esteve-Zarzoso et al., 1999), amb el termociclador 2720 (Applied Biosystems) directament de colònies repicades a YPD i a YPD amb cicloheximida de les mostres del dia 23 després de l'exposició a l'aire lliure. Posteriorment es va realitzar una electroforesi del DNA amplificat en un gel d'agarosa a l'1,2% i a un voltatge de 100 V. Tenint en compte els resultats de l'electroforesi es va decidir digerir el DNA amplificat amb enzims de restricció (el *HinfI* i el *HaeIII*) per tal de discernir l'espècie en concret del llevat. El DNA digerit pels enzims es va visualitzar en un gel d'agarosa al 3% mitjançant la tècnica d'electroforesi i a un voltatge de 80 V (els protocols es mostren a l'**annex II**).

## Identificació bacteris làctics

### Tècniques moleculars per a la identificació de bacteris làctics

Per tal d'identificar els bacteris làctics es va realitzar la tècnica molecular d'amplificació del DNA ribosomal coneguda com a PCR 16S ARDRA (Rodas, Ferrer i Pardo, 2003) amb el mateix termociclador i prèvia extracció de DNA (Ruiz-Barba, Maldonado i Jiménez-Díaz, 2005) a partir de mostres del dia 56 després de l'exposició. Posteriorment es van visualitzar els amplicons en un gel d'agarosa a l'1,2% mitjançant la tècnica d'electroforesi i a 100 V (protocol a l'**annex III**).

A partir del DNA amplificat i amb l'objectiu de finalitzar la identificació s'havia de realitzar una restricció amb l'enzim *Bfal* (Rodas *et al.*, 2003). No obstant, el gel d'electroforesi no va mostrar DNA amplificat (protocol a l'**annex III**).

### 4.3. - Determinació de la utilitat comercial dels microorganismes aïllats.

Segons Steensels i Verstrepen (2014) els trets dels llevats domesticats són la tolerància a l'etanol, la producció d'*off-flavours* fenòlics, la utilització del sucre del most i la producció d'acetat d'isoamil. En aquest treball però, es va mesurar la capacitat d'atenuació de les soques aïllades, tret relacionat amb la tolerància a l'etanol i la utilització del sucre del most. L'atenuació aparent es va mesurar seguint la fórmula de White i Zainasheff (2010) (**Equació 1**).

$$[(OG - FG)/(OG - 1)] * 100$$

*Equació 1.* Fórmula per al càlcul de l'atenuació aparent. OG: densitat inicial, FG: densitat final.

Els llevats identificats com a *Saccharomyces* sp. i com a *Brettanomyces* sp. es van inocular en mostos de densitat 1043,5 g/L (aproximadament és el recomanat per White i Zainasheff (2010)) elaborats amb extracte de malta i nutrients per a llevats a una ràtio de 1,085E+07 cèl·lules/mL de most segons la fórmula de White i Zainasheff (2010) (**Equació 2**). Es van realitzar dos rèpliques per llevat i els mostos inoculats es van mantenir a una temperatura constant de 20°C en una incubadora.

$$Cèl. a inocular = 1E6 * (mL de most) * (°P del most)$$

*Equació 2.* Fórmula per al càlcul de cèl·lules a inocular segons densitat i volum del most.

## 5. – RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 5.1. - Obtenció i aïllament de microorganismes de l'entorn agrícola de Lo Vilot.

#### Seguiment de les fermentacions

Els mostos amb els diferents tractaments, un cop exposats a l'aire lliure durant unes 12 hores, es van deixar fermentar espontàniament en ampolles d'1,5 L i a una temperatura d'entre 18 i 23°C. Durant tot el procés fermentatiu es van monitoritzar el pH, la densitat i la població de llevats i bacteris.

El pH de totes les mostres va anar davallant a mesura que avançava la fermentació (**Figures 6 i 7, Taules 1 i 2 de l'Annex IV**). Les mostres amb menor davallada del pH van ser les que ja s'havien acidificat prèviament (**A**), passant com a molt d'un pH inicial de 3,1 a 2,8, en el cas d'una mostra del camp de llúpol (LA2) (pH mitjà per a LA de  $2,9 \pm 0,0$ ); i, a 2,9 en el cas de les mostres del camp d'ordi (OA1, OA2 i OA3) (pH mitjà per a OA de  $2,9 \pm 0,0$ ). Per contra, les que presentaven una major davallada varen ser els mostos sense cap tractament addicional (**B**), en el cas del camp de llúpol i partint d'un pH inicial de 5,5 es va arribar fins a un pH de 2,9 (LB2) (pH mitjà per a LB de  $3,2 \pm 0,4$ ); i, en el cas del camp d'ordi a un pH de 2,7 (OB2) (pH mitjà dels mostos OB de  $2,8 \pm 0,1$ ).

En el cas dels mostos amb llúpol afegit (**H**), la disminució del pH des de l'inici de la fermentació va ser més petita respecte als mostos sense cap tractament (**B**), passant com a molt d'un pH inicial de 5,5 a 3,6 (LH3) (pH mitjà per a LH de  $3,9 \pm 0,3$ ) en el cas del camp de llúpol; i, a un pH de 3,7 (OH2) (pH mitjà per a OH de  $3,9 \pm 0,3$ ) en el cas del camp d'ordi.

Com ja s'ha esmentat a l'apartat de mètodes, els iso- $\alpha$ -àcids inhibeixen el creixement de bacteris, entre els quals es troben els bacteris làctics que són els que major davallada del pH causen com a conseqüència de la producció d'àcid làctic (Tonsmeire, 2011). Aquesta podria ser l'explicació de la menor acidificació dels mostos amb llúpol (**N**) respecte als mostos sense cap tractament (**B**). En el cas dels mostos acidificats a pH 3,1 (**A**) la minsa baixada del pH es podria deure a l'efecte perjudicial que exerceix un medi tan àcid sobre els bacteris làctics (Kashket, 1987).

En referència a la densitat, i partint totes les mostres d'una densitat de 1039 g/L, les mostres en les quals hi va haver una davallada més forta d'aquesta variable van ser: en el camp de llúpul LA3 i LH3 (1002 g/L i 1003 g/L respectivament) i, en el camp d'ordi OB1 i OA1 (1001 g/L i 1004 g/L respectivament). En aquest cas no s'observava un efecte tan clar del tractament com amb el pH ja que, dins dels tractaments amb alguna rèplica amb una densitat final bastant baixa, també hi havia rèpliques amb una densitat final molt elevada com LA2 (1030 g/L, mitjana per a LA de  $1019 \pm 15$  g/L) o OB2 (1027 g/L, mitjana per a OB de  $1017 \pm 14$  g/L) (Figures 8 i 9, Taules 3 i 4 de l'Annex IV).

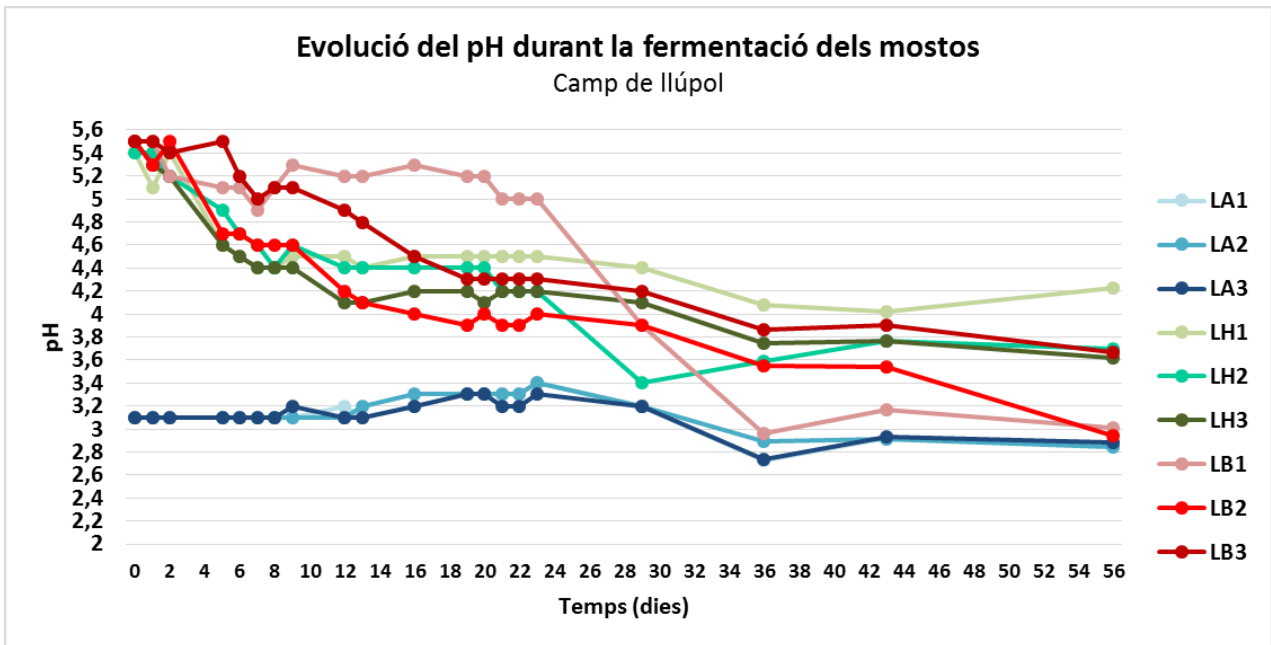


Figura 6. Gràfic amb l'evolució del pH per a les diferents mostres exposades a la microbiota del camp de llúpul.

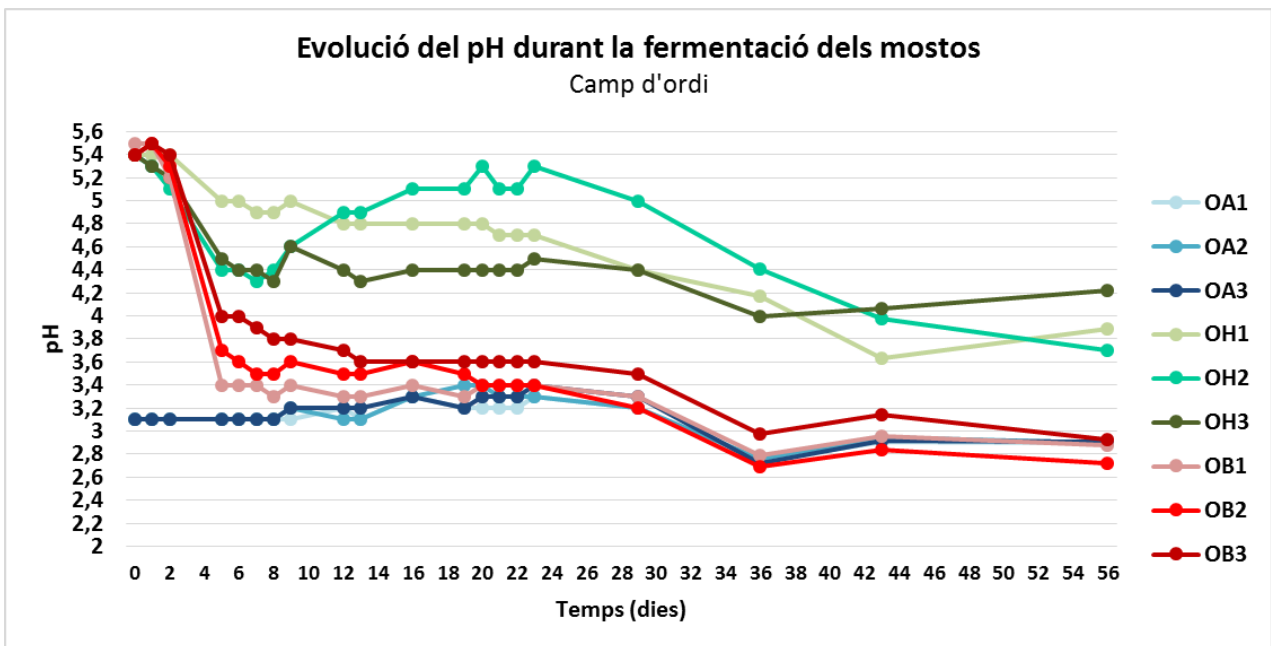


Figura 7. Gràfic amb l'evolució del pH per a les diferents mostres exposades a la microbiota del camp d'ordi.

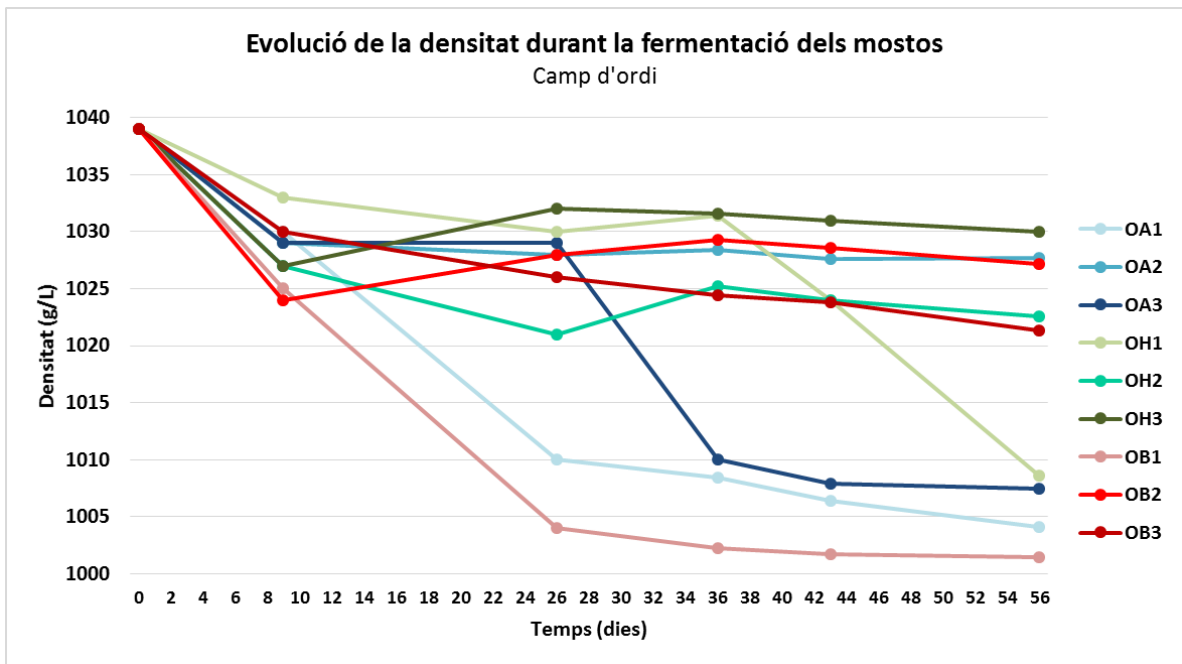


Figura 8. Gràfic amb l'evolució de la densitat per a les diferents mostres exposades a la microbiota del camp de llúpol.

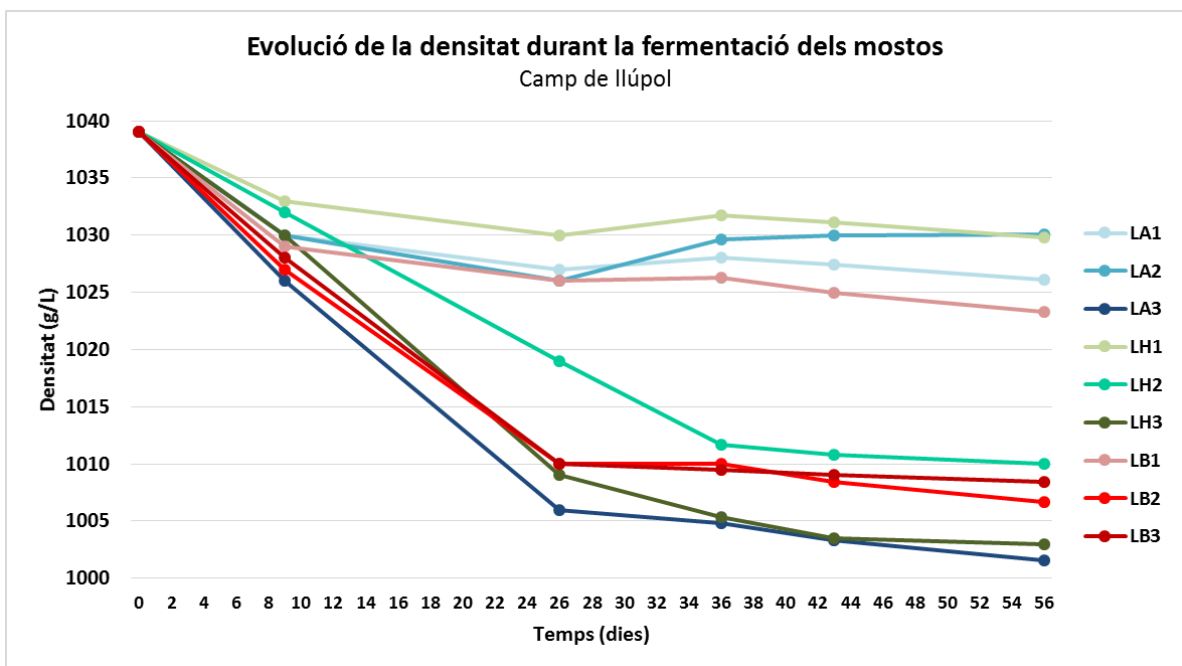


Figura 9. Gràfic amb l'evolució de la densitat per a les diferents mostres exposades a la microbiota del camp d'ordi.

## Seguiment de les poblacions de microorganismes

Es van agafar mostres provinents dels mostos en fermentació als 0, 16, 23 i 56 dies després de l'exposició i es van realitzar cultius en medis YPD + cloramfenicol (0,01% p/v) i YPD + natamicina (0,01% p/v) amb l'objectiu de determinar el nombre de microorganismes presents en els medis.

La tendència general observada en quan a nombre d'UFC, tan en les poblacions de llevats com en les poblacions de bacteris, va ser la d'un augment en el número de cèl·lules de la població fins a arribar a un màxim el dia 23 després de l'exposició dels mostos a l'aire lliure, en el cas dels llevats i els bacteris d'algunes mostres, o el dia 16 després de l'exposició en el cas dels bacteris en d'altres mostres. Posteriorment va haver-hi una davallada en el número de cèl·lules en quasi totes les mostres analitzades 56 dies després de l'exposició, exceptuant alguns mostos en els quals es va mantenir una població estable. En alguns mostos no es va poder realitzar l'última avaluació per l'aparició d'uns fongs que cobrien totes les plaques (**Taules 2, 3, 4, 5, 6 i 7 i Figures 10, 11, 12 i 13**).

### Seguiment de les poblacions de llevats

Pel que respecta a la població de llevats, els mostos amb major creixement d'aquests microorganismes van ser: en el cas del camp de llúpol, LB2 i LH2 arribant fins a  $3,00E+08$  i  $2,37E+8$  UFC/mL respectivament (mitjana per a LB en el moment de màxim creixement de  $1,74E+08 \pm 1,21E+08$  UFC/mL i mitjana per a LH de  $1,44E+08 \pm 1,26E08$  UFC/mL); i, en el cas del camp d'ordi, OH1 i OH3 ambdós amb  $3,00E+08$  UFC/ml (mitjana per a OH en el moment de màxim creixement de  $2,01E+08 \pm 1,72E+08$  UFC/mL). En l'altre extrem, les mostres amb menor creixement de llevats van ser: en el cas del camp de llúpol, tots els LA amb  $3,00E+07$  UFC/mL (mitjana per a LA en el moment de màxim creixement de  $3,00E+07 \pm 0,00E+00$  UFC/mL); i, al camp d'ordi, OA1 amb  $7,50E+06$  UFC/mL (mitjana per a OA en el moment de màxim creixement de  $2,25E+07 \pm 1,30E+07$  UFC/mL). Sembla ser que el medi acidificat redueix el creixement de llevats. En algunes plaques no hi va aparèixer cap colònia probablement per una dilució incorrecta, les mostres d'aquestes plaques s'indiquen com a ND a les taules. En d'altres plaques no es va poder avaluar el nombre de colònies a causa del creixement de fongs que ocupaven tota la placa, aquestes mostres s'indiquen com a NA. (**Taules 2 i 3 i Figures 10 i 11**).

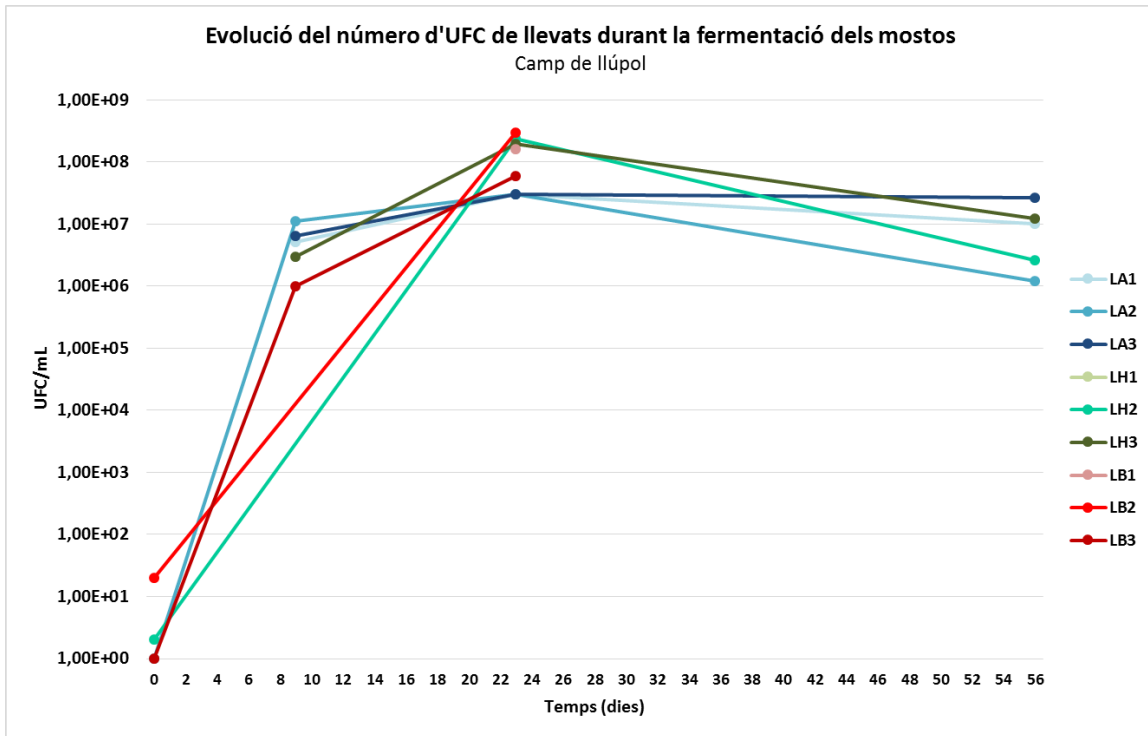


**Taula 2.** Unitats Formadores de Colònia (UFC) per mL de llevats en els diferents mostos al llarg del període estudiat i a partir de recomptes en plaques de YPD-agar amb cloramfenicol 0,01% p/v. ND (no determinat): valors iguals a 0 que potser haguessin resultat superiors en una altra dilució; NA (no avaluable): creixement en superfície de fongs.

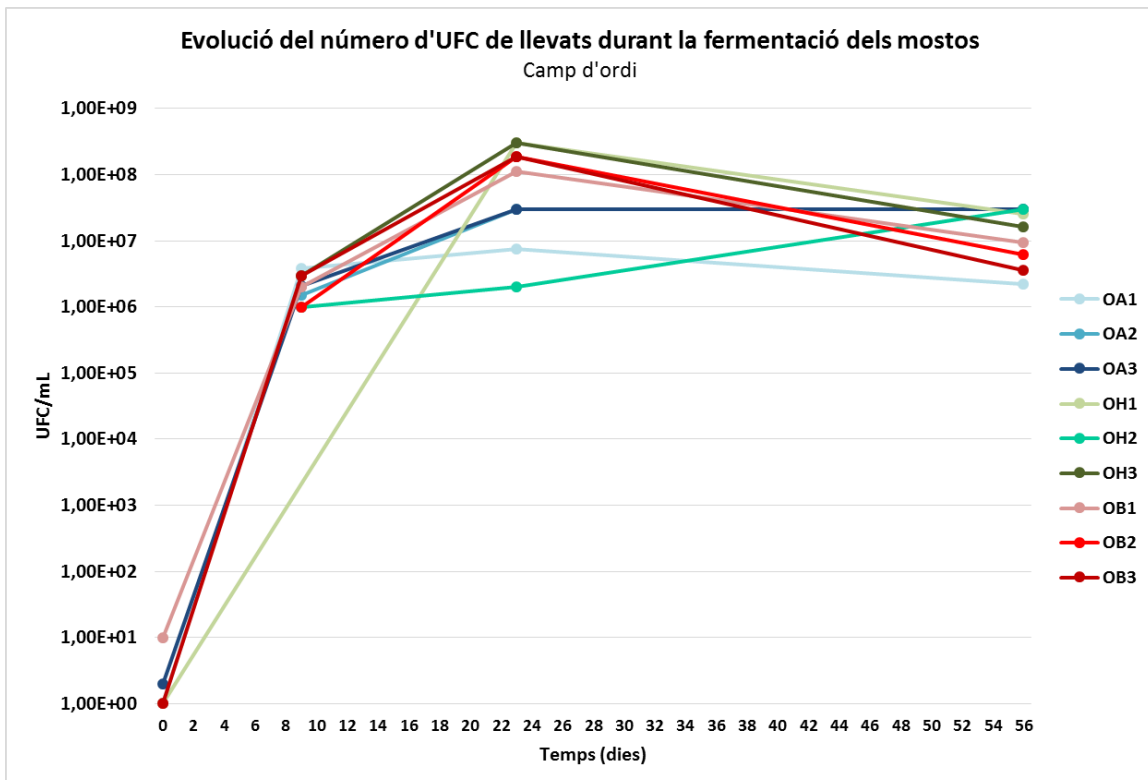
	0	9	23	56
LA1	ND	5,10E+06	3,00E+07	1,02E+07
LA2	1,00E+00	1,10E+07	3,00E+07	1,20E+06
LA3	ND	6,40E+06	3,00E+07	2,65E+07
LH1	ND	ND	ND	NA
LH2	2,00E+00	ND	2,37E+08	2,60E+06
LH3	ND	3,00E+06	1,95E+08	1,22E+07
LB1	ND	ND	1,63E+08	NA
LB2	2,00E+01	ND	3,00E+08	NA
LB3	1,00E+00	1,00E+06	5,90E+07	NA
OA1	1,00E+00	3,80E+06	7,50E+06	2,20E+06
OA2	ND	1,50E+06	3,00E+07	3,00E+07
OA3	2,00E+00	2,10E+06	3,00E+07	3,00E+07
OH1	1,00E+00	ND	3,00E+08	2,55E+07
OH2	ND	1,00E+06	2,00E+06	3,00E+07
OH3	ND	3,00E+06	3,00E+08	1,65E+07
OB1	1,00E+01	2,00E+06	1,13E+08	9,30E+06
OB2	ND	1,00E+06	1,89E+08	6,20E+06
OB3	1,00E+00	3,00E+06	1,89E+08	3,60E+06

**Taula 3.** Mitjanes i desviacions estàndard de les UFC/mL de llevats per tractament al llarg del període estudiat i a partir dels recomptes en plaques de YPD-agar amb cloramfenicol 0,01% p/v. NA (no avaluable): creixement en superfície de fongs. Valors sense desviació estàndard corresponen a tractaments on només s'ha pogut analitzar una rèplica.

	0	9	23	56
LA	1,00E+00	7,50E+06 ± 3,10E+06	3,00E+07 ± 0,00E+00	1,26E+07 ± 1,28E+07
LH	2,00E+00	3,00E+06	2,16E+08 ± 2,97E+07	7,40E+06 ± 6,79E+06
LB	1,05E+01 ± 1,34E+01	1,00E+06	1,74E+08 ± 1,21E+08	NA
OA	1,50E+00 ± 7,07E-01	2,47E+06 ± 1,19E+06	2,25E+07 ± 1,30E+07	2,07E+07 ± 1,61E+07
OH	1,00E+00	2,00E+06 ± 1,41E+06	2,01E+08 ± 1,72E+08	2,40E+07 ± 6,87E+06
OB	5,50E+00 ± 6,36E+00	2,00E+06 ± 1,00E+06	1,64E+08 ± 4,39E+07	6,37E+06 ± 2,85E+06



**Figura 10.** Evolució del número d'unitats formadores de colònies de llevat per mL en els diferents mostos exposats a la microbiota del camp de l'Úpòl durant el període d'estudi i a partir del recompte en plaques amb cloramfenicol 0,01% p/v.



**Figura 11.** Evolució del número d'unitats formadores de colònies de llevat per mL en els diferents mostos exposats a la microbiota del camp d'ordi durant el període d'estudi i a partir del recompte en plaques amb cloramfenicol 0,01% p/v.

### Creixement en plaques WLN

Per distingir entre diferents espècies de llevats també es va sembrar en medi diferencial WLN. Malauradament no es van observar diferències en la morfologia de les colònies sembrades en aquest medi.

### Seguiment de les poblacions de bacteris

Es van agafar mostres provinents dels mostos en fermentació als 0, 16, 23 i 56 dies després de l'exposició al medi ambient i es van realitzar cultius en plaques amb l'objectiu de determinar el número de microorganismes presents en els medis.

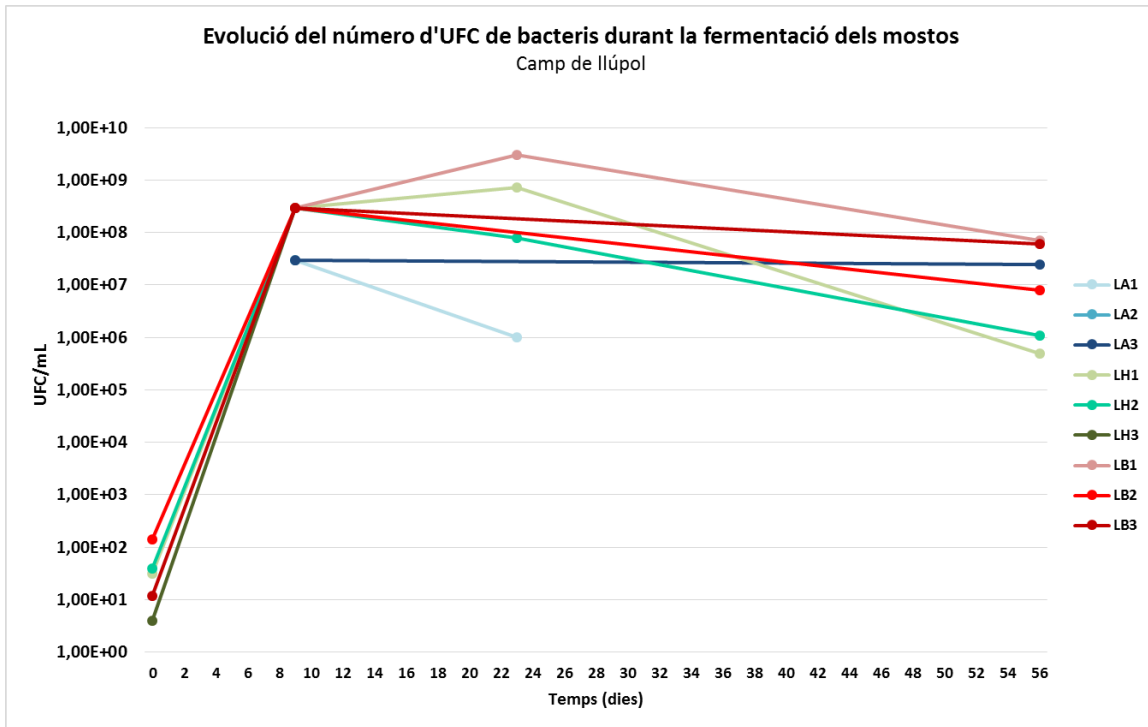
Les sèmres en plaques amb natamicina van revelar que, els mostos amb major creixement de bacteris havien estat: en el cas del camp de llúpol, LB1 amb  $3,00E+09$  UFC/mL (mitjana per a LB en el moment de màxim creixement d' $1,00E+09 \pm 1,73E+09$  UFC/mL); i, en el cas del camp d'ordi OH2 amb  $2,84E+09$  UFC/mL (mitjana per a OH en el moment de màxim creixement de  $1,83E+09 \pm 1,43E+09$  UFC/mL). Per altra banda, els mostos amb menor creixement de bacteris van ser: en el cas del camp de llúpol, tots els LA amb  $3,00E+07$  UFC/mL (mitjana en el moment de màxim creixement per a LA de  $3,00E+07 \pm 0,00$  UFC/mL); i, en el cas del camp d'ordi, tots els OA amb  $3,00E+07$  UFC/mL (mitjana per a OA en el moment de màxim creixement  $3,00E+07 \pm 0$  UFC/mL). En algunes plaques no hi va aparèixer cap colònia probablement per una dilució incorrecta, les mostres d'aquestes plaques s'indiquen com a ND a les taules. Sembla ser que hi ha una correlació entre el tractament i la població de bacteris, com a mínim pel que respecta a l'efecte inhibitori de l'àcid làctic sobre les poblacions de bacteris (Kashket, 1987) (**Taules 4 i 5 i Figures 12 i 13**).

**Taula 4.** Unitats Formadores de Colònia per mL de bacteris en els diferents mostos al llarg del període estudiat i a partir de recomptes en plaques de YPD-agar amb natamicina 0,01% p/v. ND (no determinat): valors iguals a 0 que potser haguessin resultat superiors en una altra dilució.

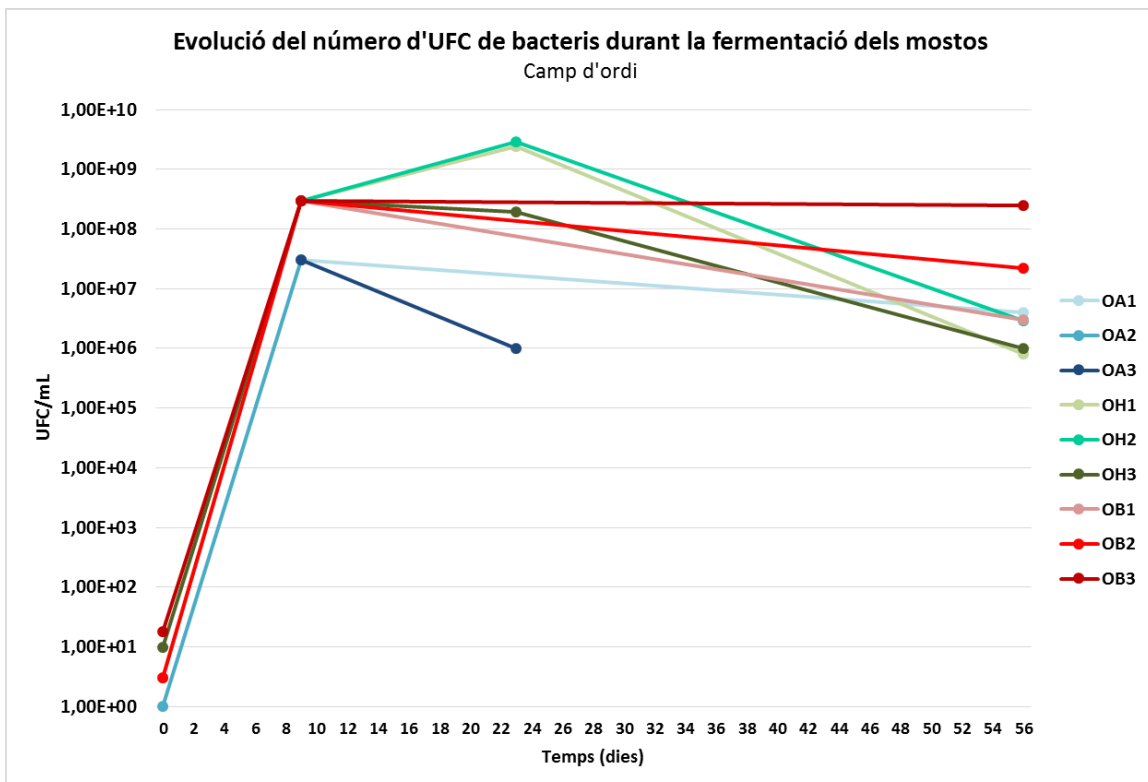
	0	9	23	56
<b>LA1</b>	ND	3,00E+07	1,00E+06	ND
<b>LA2</b>	ND	3,00E+07	ND	ND
<b>LA3</b>	ND	3,00E+07	ND	2,50E+07
<b>LH1</b>	3,20E+01	3,00E+08	7,30E+08	5,00E+05
<b>LH2</b>	4,00E+01	3,00E+08	8,00E+07	1,10E+06
<b>LH3</b>	4,00E+00	3,00E+08	ND	ND
<b>LB1</b>	ND	3,00E+08	3,00E+09	7,10E+07
<b>LB2</b>	1,40E+02	3,00E+08	ND	8,00E+06
<b>LB3</b>	1,20E+01	3,00E+08	ND	6,10E+07
<b>OA1</b>	ND	3,00E+07	ND	4,00E+06
<b>OA2</b>	1,00E+00	3,00E+07	ND	ND
<b>OA3</b>	ND	3,00E+07	1,00E+06	ND
<b>OH1</b>	3,00E+00	3,00E+08	2,46E+09	8,00E+05
<b>OH2</b>	ND	3,00E+08	2,84E+09	2,90E+06
<b>OH3</b>	1,00E+01	3,00E+08	1,90E+08	1,00E+06
<b>OB1</b>	ND	3,00E+08	ND	3,00E+06
<b>OB2</b>	3,00E+00	3,00E+08	ND	2,20E+07
<b>OB3</b>	1,80E+01	3,00E+08	ND	2,44E+08

**Taula 5.** Mitjanes i desviacions estàndard de les UFC/mL de bacteris per tractament al llarg del període estudiat i a partir dels recomptes en plaques de YPD-agar amb natamicina 0,01% p/v. Valors sense desviació estàndard corresponen a tractaments on només s'ha pogut analitzar una rèplica. ND (no determinat): valors iguals a 0 que potser haguessin resultat superiors en una altra dilució.

	0	9	23	56
<b>LA</b>	ND	3,00E+07 ± 0,00E+00	1,00E+06	2,50E+07
<b>LH</b>	2,53E+01 ± 1,89E+01	3,00E+08 ± 0,00E+00	4,05E+08 ± 4,60E+08	8,00E+05 ± 4,24E+05
<b>LB</b>	7,60E+01 ± 9,05E+01	3,00E+08 ± 0,00E+00	3,00E+09	4,67E+07 ± 3,39E+07
<b>OA</b>	1,00E+00	3,00E+07 ± 0,00E+00	1,00E+06	4,00E+06
<b>OH</b>	6,50E+00 ± 4,95E+00	3,00E+08 ± 0,00E+00	1,83E+09 ± 1,43E+09	1,57E+06 ± 1,16E+06
<b>OB</b>	1,05E+01 ± 1,06E+01	3,00E+08 ± 0,00E+00	ND	8,97E+07 ± 1,34E+08



**Figura 12.** Evolució del número d'unitats formadores de colònies de bacteris per mL en els diferents mostos exposats a la microbiota del camp de l'úpol durant el període d'estudi i a partir del recompte en plaques amb natamicina 0,01% p/v.



**Figura 13.** Evolució del número d'unitats formadores de colònies de bacteris per mL en els diferents mostos exposats a la microbiota del camp d'ordi durant el període d'estudi i a partir del recompte en plaques amb natamicina 0,01% p/v.

No s'observa una relació clara, exceptuant alguns casos, entre la població de llevats i la baixada en densitat (**Figures 8, 9, 10 i 11**). Ni entre la població de bacteris i la baixada de pH (**Figures 6, 7, 12 i 13**).

#### Creixement en plaques MRS

El seguiment dels bacteris làctics també es va fer utilitzant el medi específic MRS. Les plaques amb major creixement de bacteris làctics van ser les procedents dels mostos LB1 amb 2,89E+09 UFC/mL en el cas del camp de llúpol i, OH2 amb 3,00E+09 UFC/mL en el cas del camp d'ordi. Aquests mostos amb major creixement de bacteris làctics coincideixen amb els mostos amb major creixement de bacteris en general (**Taules 4 i 6**)

*Taula 6. Unitats Formadores de Colònia per mL de bacteris làctics sembrats en un medi MRS a partir de mostres del dia 11 de maig.*

Mostra	UFC/mL
LA1	2,67E+07
LA2	3,00E+07
LA3	1,92E+07
LH1	1,42E+08
LH2	2,16E+08
LH3	1,50E+07
LB1	2,89E+09
LB2	1,03E+08
LB3	1,40E+07
OA1	1,21E+07
OA2	3,00E+07
OA3	3,00E+07
OH1	2,46E+09
OH2	3,00E+09
OH3	3,00E+08
OB1	5,40E+07
OB2	3,00E+08
OB3	3,00E+08

5.2.- Identificació dels microorganismes útils per a l'elaboració de cervesa mitjançant, sembra en medis selectius, tècniques bioquímiques i moleculars.

### Identificació llevats

#### Sembra en medis selectius

De les plaques amb cloramfenicol (0,01% p/v) es van repicar colònies a YPD amb lisina i a YPD amb cloramfenicol (0,01% p/v) per comprovar si creixien en les dues, i per tant es tractava d'un llevat no-*Saccharomyces* sp. o, si pel contrari només creixien en YPD i per tant s'havia trobat un llevat *Saccharomyces* sp. També es van repicar colònies a YPD amb cicloheximida (0,01% p/v) per tal d'aïllar llevats *Brettanomyces* sp. Es van repicar més colònies procedents de mostos amb una major davallada de densitat i pH i amb més bona olor i menys procedents de mostos amb menor davallada de densitat i pH i pitjor olor.

De les 92 colònies que es van repicar, només 6 no van créixer en agar lisina (de les quals 4 eren procedents d'un mateix most, LH2), indicant curiosament que la majoria de colònies aïllades pertanyen a espècies no-*Saccharomyces* (més del 90%) i només 2 van créixer en cicloheximida indicant possibles llevats del gènere *Brettanomyces* (Taula 7, Figura 14). Posteriorment algunes d'aquestes colònies es van analitzar mitjançant la tècnica de PCR.

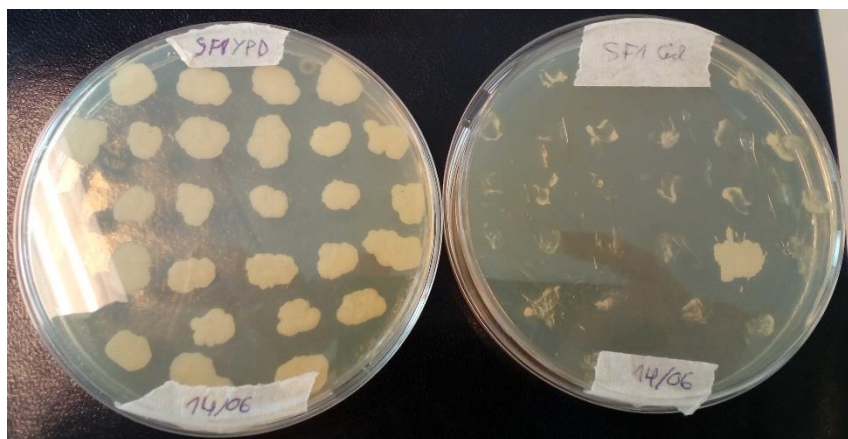


Figura 14. Creixement en cicloheximida. Només s'observa un positiu.

## Tècniques bioquímiques

Es va estudiar la capacitat de metabolitzar galactosa, sacarosa, trehalosa i glucosa d'unes quantes colònies determinades amb l'objectiu d'identificar les espècies de llevats per taxonomia clàssica (Wickerham i Burton, 1948).

D'aquestes colònies repicades en tubs amb els diferents sucres per estudiar-ne el metabolisme, es va observar que la majoria metabolitzaven glucosa, sacarosa i galactosa i que per tant, es podria tractar de *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbruekii*... També hi havia una colònia que metabolitzava tots els sucres i que per tant podria ser un *Brettanomyces bruxellensis* i uns pocs que només metabolitzen glucosa i sacarosa i que per tant podrien ser *Saccharomyces cerevisiae*, *Starmerella bacillaris*, *Torulaspota delbruekii*... (Kurtzman, Fell i Boekhout 2011)  
**(Taula 7)**



**Taula 7a.** Creixement en lisina, en cicloheximida (0,01% p/v) i metabolisme de sucres de colònies repicades a partir de les mostres del dia 23 de fermentació.

Colònia	Placa	Most procedència	Creix. Lisina	Creix. Cicloheximida	Sacarosa	Trehalosa	Glucosa	Galactosa
1	SF1	OH1	Sí	No				
2	SF1	OH1	Sí	No				
3	SF1	OH1	Sí	No				
4	SF1	OH1	Sí	No				
5	SF1	OH1	Sí	No				
6	SF1	OH1	Sí	No				
7	SF1	OH1	Sí	No				
8	SF1	OH1	Sí	No				
9	SF1	OH1	Sí	No				
10	SF1	OH1	Sí	No				
11	SF1	LH2	Sí	No				
12	SF1	LH2	Sí	No				
13	SF1	LH2	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí
14	SF1	LH2	No	No	Sí	No	Sí	Sí
15	SF1	LH2	No	No				
16	SF1	LH2	Sí	No				
17	SF1	LH2	Sí	No				
18	SF1	LH2	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí
19	SF1	LH2	No	No	Sí	No	Sí	Sí
20	SF1	LH2	No	No	Sí	No	Sí	Sí
21	SF1	LH3	Sí	No				
22	SF1	LH3	Sí	No				
23	SF1	LH3	Sí	Sí				
24	SF1	LH3	Sí	No				
25	SF1	LH3	Sí	No				
1	SF2	LB2	Sí	No	Sí	No	Sí	mig mig
2	SF2	LB2	Sí	No	Sí	mig mig	Sí	Sí
3	SF2	LB2	No	No	Sí	No	Sí	mig mig
4	SF2	LB2	No	No	Sí	No	Sí	No
5	SF2	LB2	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí
6	SF2	OB1	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí
7	SF2	OB1	Sí	No	Sí	No	Sí	No
8	SF2	OB1	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí
9	SF2	OB1	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí
10	SF2	OB1	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí
11	SF2	OH3	Sí	No				
12	SF2	OH3	Sí	No				
13	SF2	OH3	Sí	No				
14	SF2	OH3	Sí	No				
15	SF2	OH3	Sí	No				
16	SF2	OH2	Sí	No				
17	SF2	OH2	Sí	No				
18	SF2	LB3	Sí	No	Sí	No	Sí	No
19	SF2	LB3	Sí	No	Mig mig	No	Sí	No
20	SF2	LB3	Sí	No				
21	SF2	LB3	Sí	No				
22	SF2	LB3	Sí	No				
23	SF2	OB3	Sí	No				
24	SF2	OB3	Sí	No				
25	SF2	OB3	Sí	No				
1	SF3	OB3	Sí	No				
2	SF3	OB3	Sí	No				
3	SF3	LB1	Sí	No				
4	SF3	LB1	Sí	No				
5	SF3	LB1	Sí	No				
6	SF3	LB1	Sí	No				
7	SF3	LB1	Sí	No				
8	SF3	OA1	Sí	No				
9	SF3	OA1	Sí	No				
10	SF3	OA1	Sí	No				
11	SF3	OA1	Sí	No				
12	SF3	OA1	Sí	No				
13	SF3	OB2	Sí	No				
14	SF3	OB2	Sí	No				
15	SF3	OB2	Sí	No				

**Taula 7b.** Continuació de l'anterior taula.

Colònia	Placa	Most procedència	Creix. Lisina	Creix. Cicloheximida	Sacarosa	Trehalosa	Glucosa	Galactosa
16	SF3	OB2	Sí	No				
17	SF3	OB2	Sí	No				
18	SF3	OA3	Sí	No				
19	SF3	OA3	Sí	No				
20	SF3	OA3	Sí	No				
21	SF3	OA3	Sí	No				
22	SF3	OA3	Sí	No				
23	SF3	OA2	Sí	No				
24	SF3	OA2	Sí	Sí				
25	SF3	OA2	Sí	No				
1	SF4	OA2	Sí	No				
2	SF4	OA2	Sí	No				
3	SF4	LA2	Sí	No				
4	SF4	LA2	Sí	No				
5	SF4	LA2	Sí	No				
6	SF4	LA2	Sí	No				
7	SF4	LA2	Sí	No				
8	SF4	LA3	Sí	No				
9	SF4	LA3	Sí	No				
10	SF4	LA3	Sí	No				
11	SF4	LA3	Sí	No				
12	SF4	LA3	Sí	No				
13	SF4	LA1	Sí	No				
14	SF4	LA1	Sí	No				
15	SF4	LA1	Sí	No				
16	SF4	LA1	Sí	No				
17	SF4	LA1	Sí	No				

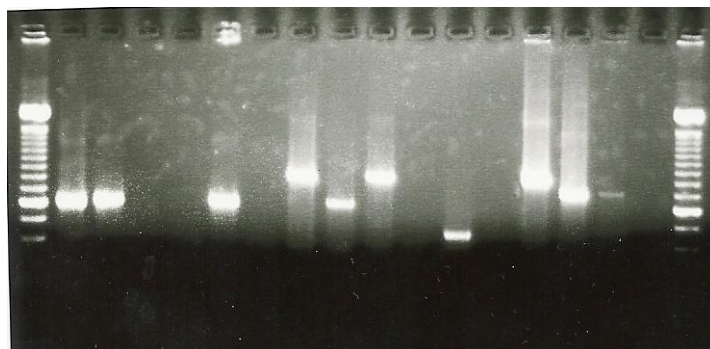
### Tècniques moleculars per a la identificació de llevats

Paral·lelament a la identificació bioquímica dels llevats, es va realitzar la tècnica molecular d'amplificació i restricció del DNA ribosomal coneguda com a PCR-RFLP rDNA 5.8s-ITS (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999), directament de colònies repicades a YPD i a YPD amb cicloheximida (0,01% p/v) de les mostres del dia 23 després de l'exposició. Les mostres de DNA amplificades en la primera PCR provenien de les colònies indicades a la **Taula 8**.

**Taula 8.** Colònies analitzades en la primera PCR, mida de les bandes aparegudes al gel d'agarosa després de l'amplificació i de la restricció amb *HinfI* i *HaeIII* i possible espècie de llevat.

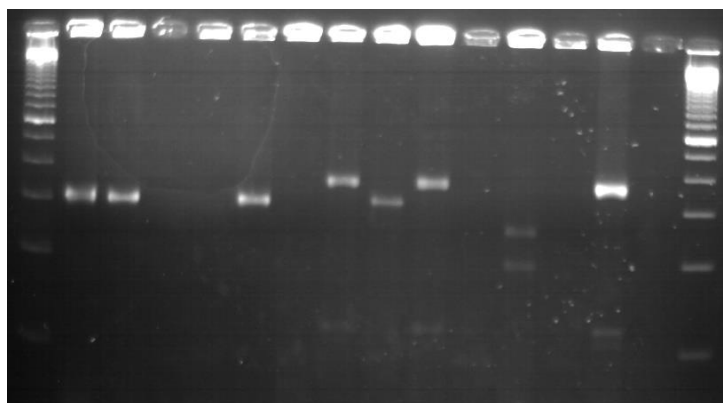
Colònia	Placa procedència	Pouet al gel d'electroforesi	Bandes resultants (pb)	Bandes resultants digestió amb <i>HinfI</i> (pb)	Bandes resultants digestió amb <i>HaeIII</i> (pb)	Possible espècie de llevat
6	SF2	1	600			<i>Candida</i> sp., <i>Kluyveromyces</i> sp., <i>Lodderomyces elongisporus</i> , <i>Pichia</i> sp., <i>Zygosaccharomyces</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Sporidiobolus</i> sp. o <i>Sporobolomyces roseus</i>
7	SF2	2	600			<i>Candida</i> sp., <i>Kluyveromyces</i> sp., <i>Lodderomyces elongisporus</i> , <i>Pichia</i> sp., <i>Zygosaccharomyces</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Sporidiobolus</i> sp. o <i>Sporobolomyces roseus</i>
8	SF2	3	no amplificat			
9	SF2	4	no amplificat			
10	SF2	5	580			<i>Candida</i> sp., <i>Kluyveromyces</i> sp., <i>Lodderomyces elongisporus</i> , <i>Pichia</i> sp., <i>Zygosaccharomyces</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Sporidiobolus</i> sp. o <i>Sporobolomyces roseus</i>
13	SF1	6	no amplificat			
14	SF1	7	850	120 i 350	150, 180, 230 i 320	<i>S.cerevisiae</i>
18	SF1	8	570			<i>Candida</i> sp., <i>Kluyveromyces</i> sp., <i>Lodderomyces elongisporus</i> , <i>Pichia</i> sp., <i>Zygosaccharomyces</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Sporidiobolus</i> sp. o <i>Sporobolomyces roseus</i>
19	SF1	9	850	120 i 350	150, 180, 230 i 320	<i>S.cerevisiae</i>
20	SF1	10	no amplificat			
18	SF2	11	500	190 i 280		<i>Kluyveromyces blattae</i> , <i>Pichia delftensis</i> , <i>Pichia membranaefaciens</i> o <i>Cryptococcus dimennae</i>
19	SF2	12	no amplificat			

Les bandes dels amplificats revelades al gel d'agarosa (**Figura 15**) mostraven dos possibles candidats a *Saccharomyces* sp. (pouet 7 i 9 des de l'esquerra i comptant a partir del marcador de 100 pb) al tenir una banda pròxima a 880 pb. Les mostres dels pouets 1, 2, 5 i 8 pròximes a 600 pb podrien ser *Candida* sp., *Kluyveromyces* sp., *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia* sp., *Zygosaccharomyces* sp., *Cryptococcus* sp., *Sporidiobolus* sp. o *Sporobolomyces roseus*. Finalment, la mostra del pouet 11, pròxima a 500 pb, podria ser *Candida* sp., *Dekkera bruxellensis*, *Kluyveromyces* sp., *Pichia* sp. o *Cryptococcus* sp. (Esteve-Zaroso et al., 1999).



**Figura 15.** Revelat de la primera PCR del dia 18/06/18. Les mostres d'aquest treball són les ubicades del pouet 1 al 12 (d'esquerra a dreta i sense comptar el marcador molecular).

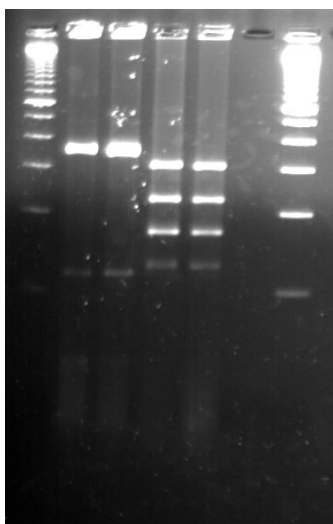
El revelat al gel d'agarosa de la digestió del DNA amb *HinfI* de les mostres de la primera PCR-RLFP es mostra a la Figura 16. En les mostres dels pouets 1, 2, 5 i 8 no hi va haver restricció del DNA. Les mostres dels pouets 7 i 9 presentaven unes bandes aproximades de 350 pb i 120 pb i, per tant, es podria tractar de *Saccharomyces bayanus*, *S. cerevisiae* o *S. pastorianus*. La mostra del pouet 11 presentava unes bandes aproximades de 280 i 190 i, per tant, es podria tractar de *Kluyveromyces blattae*, *Pichia delftensis*, *Pichia membranaefaciens* o *Cryptococcus dimennae* (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).



**Figura 16.** Revelat de la digestió amb *HinfI* de les mostres de la primera PCR-RLFP. Les mostres d'aquest treball són les ubicades del pouet 1 al 12 (d'esquerra a dreta i sense comptar el marcador molecular).

Posteriorment es van digerir amb l'enzim de restricció *HaeIII* les mostres que havien resultat ser del gènere *Saccharomyces* sp. (pouet 7 i 9 de la **Figura 16**) per tal de discernir-ne l'espècie. El revelat del DNA després de la digestió es mostra a la **Figura 17**.

Els resultats observats al revelat mostren bandes aproximades de 320, 230, 180 i 150 pb fet que suposaria que l'espècie en concret dels dos pouets és *Saccharomyces cerevisiae*, juntament amb una primera banda sense digerir de 880 pb i amb les bandes de 350 i 120 pb de la digestió amb *HinfI* (**Figures 15, 16 i 17**).



**Figura 17.** Revelat de la digestió amb *HaellI* de les mostres de la primera PCR-RLFP identificades com a pertanyents al gènere *Saccharomyces* sp. (pouets 3 i 4) i revelat de la digestió amb *HinfI* de les mostres sospitoses de ser *Dekkera anomala* de la segona PCR-RLFP.

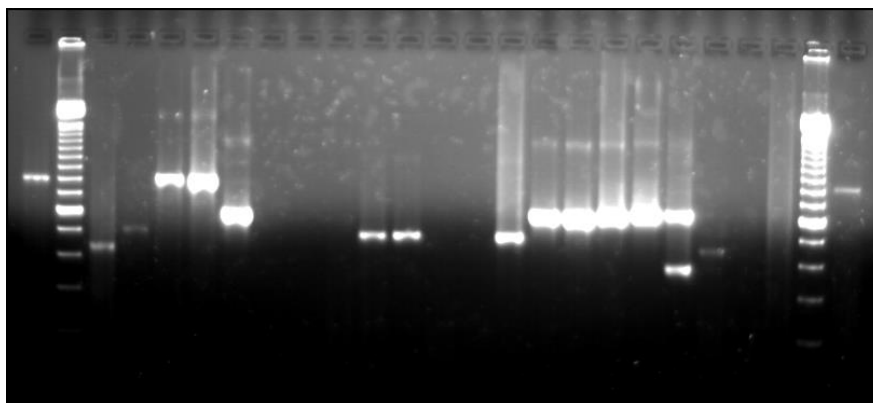
Les mostres de DNA amplificades en la segona PCR provenien de les colònies indicades a la **Taula 9**.

Les bandes revelades al gel d'agarosa (**Figura 18**) mostraven dos possibles candidats a *Dekkera anomala* (pouets 3 i 4) amb una banda de 800 pb, tot i que també es podia tractar de *Kluyveranomyces* sp., *Torulaspora* sp. o *Zygosaccharomyces* sp. La mostra del pouet 1, a 400 i escaig pb podria ser *Candida* sp., *Pichia* sp. o *Kluyveranomyces* sp. Les mostres dels pouets 2, 9, 10 i 13, amb una mida de 500 pb, podrien ser *Candida* sp. o *Pichia* sp. Les mostres dels pouets 5, 14, 15, 16 i 17, amb una mida de 600 pb, podrien ser *Pichia* sp., *Cryptococcus* sp., *Sporidiobolus* sp., *Sporobolomyces roseus*, *Hansenula mraki* o *Lodderomyces elongisporus*. La mostra del pouet 19, amb una banda de 450 pb, podria ser *Candida* sp., *Issatchenkia terricola* o *Pichia* sp. (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999)

Posteriorment es va realitzar una digestió amb l'enzim de restricció *HinfI* de les mostres sospitoses de ser *Dekkera anomala* i es van observar al revelat dues bandes de 360 i 120. Per la qual cosa es va descartar que fos l'espècie esmentada (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

**Taula 9.** Colònies analitzades en la segona PCR, mida de les bandes aparegudes al gel d'agarosa després de l'amplificació i de la restricció amb *HinfI* i possible espècie de llevat.

Colònia	Placa procedència	Pouet al gel d'electroforesi	Bandes resultants (pb)	Bandes resultants digestió amb <i>HinfI</i> (pb)	Possible espècie de llevat
1	LB2	1	430		<i>Candida</i> sp., <i>Pichia</i> sp. o <i>Kluyveranomyces</i> sp.
2	LB2	2	500		<i>Candida</i> sp. o <i>Pichia</i> sp.
3	LB2	3	800	120 i 360	No és <i>Dekkera anomala</i>
4	LB2	4	800	120 i 360	No és <i>Dekkera anomala</i>
5	LB2	5	600		<i>Pichia</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Sporidiobolus</i> sp., <i>Sporobolomyces roseus</i> , <i>Hansenula mraki</i> o <i>Lodderomyces elongisporus</i>
8	OA1	6	no amplificat		
9	OA1	7	no amplificat		
10	OA1	8	no amplificat		
11	OA1	9	500		<i>Candida</i> sp. o <i>Pichia</i> sp.
12	OA1	10	500		<i>Candida</i> sp. o <i>Pichia</i> sp.
20	LB3	11	no amplificat		
21	LB3	12	no amplificat		
22	LB3	13	500		<i>Candida</i> sp. o <i>Pichia</i> sp.
18	OA3	14	600		<i>Pichia</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Sporidiobolus</i> sp., <i>Sporobolomyces roseus</i> , <i>Hansenula mraki</i> o <i>Lodderomyces elongisporus</i>
19	OA3	15	600		<i>Pichia</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Sporidiobolus</i> sp., <i>Sporobolomyces roseus</i> , <i>Hansenula mraki</i> o <i>Lodderomyces elongisporus</i>
20	OA3	16	600		<i>Pichia</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Sporidiobolus</i> sp., <i>Sporobolomyces roseus</i> , <i>Hansenula mraki</i> o <i>Lodderomyces elongisporus</i>
21	OA3	17	600		<i>Pichia</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Sporidiobolus</i> sp., <i>Sporobolomyces roseus</i> , <i>Hansenula mraki</i> o <i>Lodderomyces elongisporus</i>
22	OA3	18	600 + 380		
3	OH1	19	450		<i>Candida</i> sp., <i>Issatchenkia terricola</i> o <i>Pichia</i> sp.
4	OH1	20	no amplificat		



**Figura 18.** Revelat de la segona PCR del dia 02/07/18. Les mostres d'aquest treball són les ubicades del pouet 1 al 20 (d'esquerra a dreta i sense comptar el marcador molecular).

## Identificació bacteris làctics

### Tècniques moleculars per a la identificació de bacteris làctics

Les mostres de DNA amplificades en la PCR 16S ARDRA amb l'objectiu d'identificar espècies de bacteris làctics (Rodas *et al.*, 2003) provenien de colònies repicades a MRS des de medis YPD + natamicina (0,01% p/v) del dia 56 de fermentació. Aquestes colònies s'indiquen a la **Taula 9**.

Malauradament no hi va haver amplificat i en conseqüència no es van poder identificar les espècies de bacteris làctics que havien crescut en MRS.

*Taula 9. Colònies analitzades en la PCR 16S ARDRA i la mida de les bandes aparegudes al gel d'agarosa.*

Colònia	Placa procedència	Pouet al gel d'electroforesi	Bandes resultants (pb)
5	LB1	1	no amplificat
6	LB1	2	no amplificat
7	LB1	3	no amplificat
8	LB1	4	no amplificat
9	LB1	5	no amplificat
10	LB1	6	no amplificat
11	LB3	7	no amplificat
12	LB3	8	no amplificat
13	LB3	9	no amplificat
14	LB3	10	no amplificat
15	LB3	11	no amplificat
16	LB3	12	no amplificat
21	OB2	13	no amplificat
22	OB2	14	no amplificat
23	OB2	15	no amplificat
28	OB3	16	no amplificat
29	OB3	17	no amplificat
30	OB3	18	no amplificat
31	OB3	19	no amplificat
32	OB3	20	no amplificat

### 5.3.- Determinació de la utilitat comercial dels microorganismes aïllats.

Els llevats identificats com a *Saccharomyces* sp. i com a *Brettanomyces* sp. es van inocular en mostos de densitat 1043,5 g/L elaborats amb extracte de malta i nutrients per a llevats a una ràtio de  $1,085E+07$  cèl·lules/mL de most.

La **Taula 10** mostra els valors mitjans de densitat i pH, inicials i finals, i l'atenuació aparent per als dos llevats aïllats i identificats com a *Saccharomyces cerevisiae* (càlculs a partir de dues rèpliques per llevat). Les fermentacions es van considerar acabades 9 dies després de l'inici de fermentació quan ja feia 3 dies que les densitats romanien estables. No es va poder aïllar cap *Brettanomyces*.

Els resultats mostren com l'atenuació és quasi 10 cops superior en una soca que en l'altra (de  $6,97 \pm 0,87\%$  del llevat A, fins a  $60,67 \pm 0,18\%$  del llevat B). Aquesta diferència en l'atenuació podria significar una errònia identificació de l'espècie de llevat. En referència al pH hi ha hagut una major davallada en la mostra del llevat amb més atenuació, la B (pH final de  $4,46 \pm 0,01$  en la mostra del llevat A i de  $3,87 \pm 0,09$  en la mostra del llevat B) (**Taula 10**).

*Taula 10. Mitjanes de densitat, atenuació i pH resultants de les proves de fermentació dels dos llevats aïllats.*

Llevat	Densitat inicial (g/L)	pH inicial	Densitat final (g/L)	pH final	Atenuació aparent (%)
A	$1043,5 \pm 0,00$	$4,54 \pm 0,00$	$1040,65 \pm 0,35$	$4,46 \pm 0,01$	$6,97 \pm 0,87$
B	$1043,5 \pm 0,00$	$4,54 \pm 0,00$	$1019,15 \pm 0,07$	$3,87 \pm 0,09$	$60,67 \pm 0,18$



## 6. – CONCLUSIONS

Es van poder obtenir microorganismes procedents del camp de llúpol i del camp d'ordi mitjançant mostos amb diferents tractaments (acidificació **A**, llupulització **H** i sense modificar **B**).

Els diferents mostos van respondre diferent a la inoculació espontània de microorganismes tal i com mostren els valors de pH i de densitat mesurats durant la fermentació. Es va observar un menor creixement en els mostos prèviament acidificats (**A**) així com una menor reducció del pH probablement per l'efecte perjudicial d'un medi àcid sobre el creixement dels bacteris làctics (Kashket, 1987) i sobre el creixement de llevats (Narendranath, 2001). També es va observar una correlació positiva entre el creixement de bacteris làctics en medis MRS i el creixement de bacteris en general al medi YPD + natamicina (0,01% p/v).

Respecte al creixement de llevats, no es va observar cap correlació entre tipus de medi i creixement poblacional ni entre tipus de medi i disminució en densitat i pH observant-se així, repeticions dins del mateix tractament amb valors dispars de densitat, pH i creixement poblacional. Malauradament no es va observar cap morfologia diferencial en les plaques de medi WLN que permetés identificar espècies ni tampoc es va arribar a cap identificació final amb el test de metabolisme de sucres.

El creixement poblacional en aquest estudi ha estat alt comparat amb d'altres estudis. Spitaels et. al (2014) assolien un creixement màxim de bacteris de  $2,57E+08$  UFC/mL i un creixement màxim de llevats de  $2,95E+06$  UFC/mL en el seu anàlisi de la diversitat microbiana de la tradicional cervesa làmbica fermentada espontàniament. Mentre que en aquest estudi s'ha arribat a un màxim de  $3,00E+09$  UFC/mL de bacteris i  $3,00E+08$  UFC/mL de llevats. Aquest fet podria ser degut a unes temperatures ambientals massa elevades en el moment de l'exposició dels mostos als microorganismes de l'ambient que podrien haver disparat la població de microorganismes. L'aïllament es va fer dins del període en el qual, per les temperatures, s'acostumen a elaborar les cerveses làmbiques a Bèlgica (Sparrow, 2005). No obstant les temperatures a l'interior de Lleida podien haver estat ja massa elevades el 17 d'abril. De fet, l'escalfament global està escurçant el període d'elaboració d'aquest estil (Climate change blamed for putting Belgian beer at risk, 2015).

Gràcies a l'amplificació mitjançant PCR-RLFP i la posterior restricció dels amplicons amb els enzims *Hinfl* i *HaeIII* es van poder identificar dos colònies de llevats com a *Saccharomyces cerevisiae*. D'aquestes dues colònies, anomenades A i B, es va testar la capacitat d'atenuació donant com a resultat un  $6,97 \pm 0,87\%$  del llevat A, i de  $60,67 \pm 0,18\%$  en el llevat B.

En el cas del llevat A l'atenuació és massa baixa però, en el cas del llevat B, aquest es podria utilitzar per a fermentar mostos que deixin bastants sucres residuals per alimentar altres microorganismes presents en les barriques destinades a elaborar cerveses tipus *sour*, sense necessitat de realitzar el característic *turbid mash* de les cerveses làmbiques (Tonsmeire, 2014; Sparrow, 2005).

No es va poder identificar cap espècie de *Brettanomyces* amb l'amplificació mitjançant PCR-RLFP ni cap espècie de *Lactobacillus* mitjançant l'ampliació i restricció de la regió 16S del DNA ribosomal.

Per poder aïllar llevats de forma més eficient potser es podria deixar a l'aire lliure medis més selectius que un most cerveser, a més de realitzar aquestes "captures" amb temperatures inferiors. També es podria mirar d'aïllar llevats a partir de mostres de fruita ja que els llevats del gènere *Saccharomyces* hi són comuns (Vadkertiová et al., 2012).

## 7.- BIBLIOGRAFIA

BJCP (2015). *Beer Judgement Certificate Program. 2015 Style Guidelines*. Recuperat de: [https://www.bjcp.org/docs/2015\\_Guidelines\\_Beer.pdf](https://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf)

Climate change blamed for putting Belgian beer at risk (4 de novembre de 2015). *The Guardian*. Recuperat de <https://www.theguardian.com/world/2015/nov/04/climate-change-blamed-for-putting-belgium-beer-business-at-risk>

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. i 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, pp. 329-337. <https://dx.doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>

Heit, B. [Sui Generis Brewing]. (5 de desembre de 2014). Capturing Wild Yeast Part I – Capturing the Yeast [Arxiu de video]. Recuperat de: <https://www.youtube.com/watch?v=vqcc9ZeLBXM>

Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmatic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews*, 3, pp. 233-234. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02463.x>

Kurtzam, C., Fell, J. W. i Boekhout, T (Eds.). (2011). *The yeasts. A taxonomic study (cinquena edició)*. Amsterdam, Països Baixos: Elsevier Science.

Martens, H., Dawoud, F. i Verachtert, H. (1991). Wort enterobacteria and other microbial populations involved during the 1st month of lambic fermentation. *Journal of The Institute of Brewing*, 97, pp. 435-439. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1991.tb01082.x>

Mello, J., Mello, E., Brannon, I. i Wineka, S. (2013). DIYeast: Capturing Yeast. Recuperat de <http://www.bootlegbiology.com/diy/capturing-yeast/>

- Narendranath, N.V., Thomas, K.C. i Ingledew, W.M. (2001). Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26, pp. 171-177. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000090>
- Rodas, A. M., Ferrer, S. i Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, pp. 412-422. <https://doi.org/10.1078/072320203322497446>
- Ruiz-Barba, J. L., Maldonado, A. i Jiménez-Díaz, R. (2005). Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*, 347, pp. 333-335. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.09.028>
- Sparrow, J. (2005). *Wild Brews: Beer Beyond the Influence of Brewer's Yeast*. Boulder, Estats Units d'Amèrica: Brewers Publications.
- Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H-M., Van Landschoot, A., De Vuyst i L., Vandamme, P. (2014). The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer. *Plos One*, 9 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095384>
- Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L. i Vandamme, P. (2015). The microbial diversity of an industrially produced lambic beers shares membres of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation. *Food Microbiology*, 49, pp. 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.008>
- Steensels, J. i Verstrepen, K. J. (2014). Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68, pp. 61-80. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>
- Tonsmeire, M. (2014). *American Sour Beers. Innovative Techniques for Mixed Fermentations*. Boulder, Estats Units d'Amèrica: Brewers Publications.

Tonsmeire, M. (25 d'abril de 2011). *Ambient-Spontaneous Yeast Starters* [Post d'un blog]. The mad fermentationist. Recuperat de: <https://www.themadfermentationist.com/2011/04/ambient-spontaneous-yeast-starters.html>

Vadkertiová, R., Molnárová, J., Vránová, D., Sláviková, E. (2012). Yeasts and Yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of diferent fruit trees. *Canadian Journal of Microbiology*, 58, pp. 1344-1352. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0468>

Van Oevelen, D., Spaepen, M., Timmermans, P. i Verachtert, H. (1977). Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. *Journal of The Institute of Brewing*, 83, pp. 356-360. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1977.tb03825.x>

Verachtert, H. i Iserentant, D. (1995). Properties of Belgian acid beers and their microflora. Part I. The Production of gueuze and related refreshing acid beers. *Cerevisia, Belgian Journal of Brewing and Biotechnology*, 20, pp. 37-41.

Wickerham, L. J., Burton, K. A. (1948). Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *Journal of Bacteriology*, 56, pp. 363-371.

White, C. i Zainasheff, J. (2010). *Yeast: The practical guide to beer fermentation*. Boulder: Estats Units d'Amèrica. Brewers Publications.

## ANNEX I.- PROTOCOLS PER A L'ELABORACIÓ DE MEDIS DE CULTIU

Medis de cultiu per a llevats.

### **Medi YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose)**

- Glucosa 20 g
- Peptona 20 g
- Extracte de llevat 10 g
- Agar bacteriològic 20 g
- Aigua destil·lada 1 L

### **Medi de cicloheximida / cloramfenicol / natamicina**

Idèntica composició que YEPD amb l'afegit de l'antibiòtic a una concentració de 0,01% (100 mg/L), després d'autoclavar.

### **Medi agar lisina**

- *Yeast carbon base* 11,75 g
- Lisina.HCl 2,5 g
- Agar bacteriològic 20 g
- Aigua destil·lada 1 L

### **Medi WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient)**

- Medi WLN 80 g
- Aigua destil·lada 1 L
- Cloramfenicol 100 mg/L (després d'autoclavar).

Medis de cultiu per a bacteris làctics.

**Medi MRS**

- Medi MRS                    70 g
- Aigua destil·lada        1 L
- Natamicina                100 mg/L (després d'autoclavar)

## ANNEX II.- PROTOCOLS PER A LA IDENTIFICACIÓ DE LLEVATS

PCR-RFLP per al fragment 5.8S del RNA ribosomal més ITS adjacents (Esteve-Zarzoso et al, 1999).

### Per a la PCR ITS:

Volum final 50 µL:

-	Tampó 10x	5 µL
-	MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,5 µL
-	dNTPs 10 mM	1 µL
-	Primer F 10 µM	2,5 µL
-	Primer R 10 µM	2,5 µL
-	Taq Polimerasa 5 Uds/ µL	1 µL
-	DNA	1 µL
-	H <sub>2</sub> O Milli-Q	35,5 µL

Primers utilitzats:

ITS4            TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS1            TCCTCCGCTTATTGATATGC

### Programa amplificació:

- 2 min 94°C
- 40 cicles
  - o 30 seg 95°C
  - o 1 min 53°C
  - o 1 min 72°C
- 10 min 72°C

**Electroforesis:** banda ITS

Agarosa 1,2%, TBE 1x fresc, 100 w, 1h a 2h. Marcador molecular de 100 pb.

Tinció posterior amb Bromur d'etidi.

### Restricció de productes de PCR ITS

En tubs d'1,5 mL, volum final 20 µL

-	Enzim CfoI/HaeIII/Hinfi	0,1 µL
-	Tampó de restricció 10x	2 µL



- Producte PCR 10 µL
- Aigua Milli-Q estèril 7 µL

Incubar *overnight* a 37°C. Al moment de recollir, centrifugar (un pols).

Carregar els 20 µL en un gel d'agarosa al 3%. Marcador 100 pb.

Els productes de restricció juntament amb el producte de PCR es compararan amb els obtinguts de cultius tipus dipositats a la base de dades [www.yeast-id.com](http://www.yeast-id.com) (CSIC).

## Identificació bioquímica mitjançant l'estudi de les característiques fisiològiques dels llevats.

### Fermentació de sucres

Medi basal:

- Extracte de llevat 2,5 g
- Peptona 7,5 g
- Blau de bromotimol 0,1 g
- Aigua destil·lada 1 L

Repartir en tubs 15x150 mm, amb campana Durham, quantitats de 4 mL i esterilitzar a l'autoclau a 120°C, 20 min.

Afegir a cada tub en condicions estèrils 2 mL del sucre que es vulgui provar esterilitzat per filtració (a excepció dels monosacàrids que es poden esterilitzar per calor) i a les següents concentracions:

- Glucosa 6%
- Sacarosa 6%
- Trehalosa 10%
- Galactosa 6%

Preparació de l'inòcul: inocular cada tub amb 50 µL de cultiu jove de llevats d'aproximadament 10E+07 cel/mL. És molt important netejar les cèl·lules prèviament per centrifugació per a eliminar el medi de cultiu en el qual han crescut.

### Altres proves complementàries

- Creixement en cicloheximida.
- Creixement en lisina com a única font de Nitrogen.
- Creixement en WLN: observar morfologia de la colònia.

### Resultats proves bioquímiques

Espècies de llevats	Fermentació				Creixement	
	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Trehalosa	Cicloheximida 0,01%	Lisina
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	v	+	v	-	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	+	-	v	v	-	+
<i>Starmerella bacillaris</i>	+	-	+	-	-	+
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	+	v	+	+	+	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	-	-	-	+	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	+	v	-	-	-	+
<i>Torulaspota delbruekii</i>	+	v	v	v	-	+

+: test positiu

-: test negatiu

v: resultat variable (depenent de la soca)

## ANNEX III.- PROTOCOLS PER A LA IDENTIFICACIÓ DE BACTERIS LÀCTICS

Anàlisi del gen ribosomal 16s: ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) (Rodas et al, 2003).

### Microextracció de DNA

- Aspirar una a dos colònies des de la placa o agafar 200 µL de cultiu líquid.
- Dissoldre en 100 µL d'aigua destil·lada estèril.
- Afegir 100 µL de cloroform – alcohol isoamílic (24:1).
- Agitar a màxima velocitat en un vòrtex.
- Deixar reposar durant 24 h a temperatura ambient.
- Centrifugar a 13000g durant 5 minuts
- La mescla se separa en dues fases i una interfase, en el sobrenedant, que és la fase aquosa, hi ha dissolt el DNA extret.
- Agafar 1-2 µL i afegir-los directament a la mescla de PCR.

### PCR 16s (volum final 50 µL)

- |                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| - Tampó 10x                        | 5 µL   |
| - MgCl <sub>2</sub> 50 mM          | 2 µL   |
| - dNTPs 10 mM                      | 1 µL   |
| - Primer F µM                      | 5 µL   |
| - Primer R µM                      | 5 µL   |
| - Taq polimerasa 5 Uds/ µL         | 0,5 µL |
| - DNA                              | 5 µL   |
| - H <sub>2</sub> O Milli-Q estèril | 26 µL  |
| - Formamida                        | 0,5 µL |

Primer F (labA): (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

Primer R (labB): (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')

### Electroforesi: banda de 16s

Gel d'agarosa a 1,2%, TBE 1x fresc, 100 w d'1 a 2 h. Marcador de pes molecular 100 bp.

Tinció posterior amb bromur d'etidi (0,5 µg/mL).

### Restricció de productes de la PCR 16s

- Enzim Bfal	1 µL
- Tampó de restricció 10x	2 µL
- Producte PCR	10 µL
- Aigua Milli-Q estèril	7 µL
- Enzim Msel	0,5 µL
- Tampó de restricció 10x	2 µL
- Producte PCR	10 µL
- BSA	0,2 µL
- Aigua Milli-Q estèril	7,3 µL

Incubar *overnight* a 37°C. Al moment de recollir, centrifugar (un pols).

Carregar els 20 µL en un gel d'agarosa a l'1,5%. Marcador 100 bp.

## ANNEX IV.- TAULES

*Taula 1. Mesures de pH durant el període d'estudi en els diferents mostos inoculats espontàniament.*

	0	1	2	5	6	7	8	9	12	13	16	19	20	21	22	23	29	36	43	56
LA1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,2	3,1	3,2	3,3	3,3	3,3	3,3	3,4	3,2	2,7	2,9	2,9
LA2	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,2	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,4	3,2	2,9	2,9	2,8
LA3	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,2	3,1	3,1	3,2	3,3	3,3	3,2	3,2	3,3	3,2	2,7	2,9	2,9
LH1	5,4	5,1	5,4	4,6	4,5	4,4	4,4	4,5	4,5	4,4	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,4	4,1	4,0	4,2
LH2	5,4	5,4	5,2	4,9	4,7	4,6	4,4	4,6	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,2	4,2	4,2	3,4	3,6	3,8	3,7
LH3	5,5	5,3	5,2	4,6	4,5	4,4	4,4	4,4	4,1	4,1	4,2	4,2	4,1	4,2	4,2	4,2	4,1	3,8	3,8	3,6
LB1	5,5	5,5	5,2	5,1	5,1	4,9	5,1	5,3	5,2	5,2	5,3	5,2	5,2	5,0	5,0	5,0	3,9	3,0	3,2	3,0
LB2	5,5	5,3	5,5	4,7	4,7	4,6	4,6	4,6	4,2	4,1	4,0	3,9	4,0	3,9	3,9	4,0	3,9	3,6	3,5	2,9
LB3	5,5	5,5	5,4	5,5	5,2	5,0	5,1	5,1	4,9	4,8	4,5	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,2	3,9	3,9	3,7
OA1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,2	3,1	3,3	3,2	3,2	3,2	3,2	3,3	3,2	2,7	2,9	2,9
OA2	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,2	3,1	3,1	3,3	3,4	3,4	3,3	3,3	3,3	3,2	2,8	3,0	2,9
OA3	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,2	3,2	3,2	3,3	3,2	3,3	3,3	3,3	3,4	3,3	2,7	2,9	2,9
OH1	5,4	5,4	5,4	5,0	5,0	4,9	4,9	5,0	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,7	4,7	4,7	4,4	4,2	3,6	3,9
OH2	5,4	5,3	5,1	4,4	4,4	4,3	4,4	4,6	4,9	4,9	5,1	5,1	5,3	5,1	5,1	5,3	5,0	4,4	4,0	3,7
OH3	5,4	5,3	5,2	4,5	4,4	4,4	4,3	4,6	4,4	4,3	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,5	4,4	4,0	4,1	4,2
OB1	5,5	5,5	5,2	3,4	3,4	3,4	3,3	3,4	3,3	3,3	3,4	3,3	3,4	3,4	3,4	3,4	3,3	2,8	3,0	2,9
OB2	5,4	5,5	5,3	3,7	3,6	3,5	3,5	3,6	3,5	3,5	3,6	3,5	3,4	3,4	3,4	3,4	3,2	2,7	2,8	2,7
OB3	5,4	5,5	5,4	4,0	4,0	3,9	3,8	3,8	3,7	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,5	3,0	3,1	2,9

*Taula 2. Mitjanes de les mesures de pH durant el període estudiat en els diferents mostos agrupats per tractament dins de cada ubicació.*

	0	1	2	5	6	7	8	9	12	13	16	19	20	21	22	23	29	36	43	56
LA	3,1±0,0	3,1±0,0	3,1±0,0	3,1±0,0	3,1±0,0	3,1±0,0	3,1±0,0	3,1±0,1	3,1±0,1	3,1±0,1	3,2±0,1	3,3±0,0	3,3±0,0	3,3±0,1	3,3±0,1	3,4±0,1	3,2±0,0	2,8±0,1	2,9±0,0	2,9±0,0
LH	5,4±0,1	5,3±0,2	5,3±0,1	4,7±0,2	4,6±0,1	4,5±0,1	4,4±0,0	4,5±0,1	4,3±0,2	4,3±0,2	4,4±0,2	4,4±0,2	4,3±0,2	4,3±0,2	4,3±0,2	4,3±0,2	3,4±0,5	3,8±0,2	3,9±0,1	3,9±0,3
LB	5,5±0,0	5,4±0,1	5,4±0,2	5,1±0,4	5,0±0,3	4,8±0,2	4,9±0,3	5±0,4	4,8±0,5	4,7±0,6	4,6±0,7	4,5±0,7	4,5±0,6	4,4±0,6	4,4±0,6	4,4±0,5	4,0±0,2	3,5±0,5	3,5±0,4	3,2±0,4
OA	3,1±0,0	3,1±0,0	3,1±0,0	3,1±0,0	3,1±0,0	3,1±0,0	3,1±0,0	3,2±0,1	3,2±0,1	3,1±0,1	3,3±0,0	3,3±0,1	3,3±0,1	3,3±0,1	3,3±0,1	3,3±0,1	3,2±0,1	2,7±0,0	2,9±0,0	2,9±0,0
OH	5,4±0,0	5,3±0,1	5,2±0,2	4,6±0,3	4,6±0,3	4,5±0,3	4,5±0,3	4,7±0,2	4,7±0,3	4,7±0,3	4,8±0,4	4,8±0,4	4,8±0,5	4,7±0,4	4,7±0,4	4,8±0,4	4,6±0,3	4,2±0,2	3,9±0,2	3,9±0,3
OB	5,4±0,1	5,5±0,0	5,3±0,1	3,7±0,3	3,7±0,3	3,6±0,3	3,5±0,3	3,6±0,2	3,5±0,2	3,5±0,2	3,5±0,1	3,5±0,2	3,5±0,1	3,5±0,1	3,5±0,1	3,5±0,1	3,3±0,2	2,8±0,1	3,0±0,2	2,8±0,1

*Taula 3. Mesures de densitat durant el període d'estudi en els diferents mostos inoculats espontàniament.*

	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>26</b>	<b>36</b>	<b>43</b>	<b>56</b>
<b>LA1</b>	1039	1030	1027	1028	1027	1026
<b>LA2</b>	1039	1030	1026	1030	1030	1030
<b>LA3</b>	1039	1026	1006	1005	1003	1002
<b>LH1</b>	1039	1033	1030	1032	1031	1030
<b>LH2</b>	1039	1032	1019	1012	1011	1010
<b>LH3</b>	1039	1030	1009	1005	1004	1003
<b>LB1</b>	1039	1029	1026	1026	1025	1023
<b>LB2</b>	1039	1027	1010	1010	1008	1007
<b>LB3</b>	1039	1028	1010	1010	1009	1008
<b>OA1</b>	1039	1030	1010	1008	1006	1004
<b>OA2</b>	1039	1029	1028	1028	1028	1028
<b>OA3</b>	1039	1029	1029	1010	1008	1007
<b>OH1</b>	1039	1033	1030	1031	1024	1009
<b>OH2</b>	1039	1027	1021	1025	1024	1023
<b>OH3</b>	1039	1027	1032	1032	1031	1030
<b>OB1</b>	1039	1025	1004	1002	1002	1001
<b>OB2</b>	1039	1024	1028	1029	1029	1027
<b>OB3</b>	1039	1030	1026	1024	1024	1021

*Taula 4. Mitjanes de les mesures de densitat per als diferents tractaments durant el període d'estudi en els diferents mostos inoculats espontàniament*

	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>26</b>	<b>36</b>	<b>43</b>	<b>56</b>
<b>LA</b>	1039 ± 0	1029 ± 2	1020 ± 12	1021 ± 14	1020 ± 15	1019 ± 15
<b>LH</b>	1039 ± 0	1032 ± 2	1019 ± 11	1016 ± 14	1015 ± 14	1014 ± 14
<b>LB</b>	1039 ± 0	1028 ± 1	1015 ± 9	1015 ± 10	1014 ± 9	1013 ± 9
<b>OA</b>	1039 ± 0	1029 ± 1	1022 ± 11	1016 ± 11	1014 ± 12	1013 ± 13
<b>OH</b>	1039 ± 0	1029 ± 3	1028 ± 6	1029 ± 4	1026 ± 4	1020 ± 11
<b>OB</b>	1039 ± 0	1026 ± 3	1019 ± 13	1019 ± 14	1018 ± 14	1017 ± 14