

**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Departament de Bioquímica i Biotecnologia**

**AVALUACIÓ DELS CONDICIONANTS DEL MOST  
EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA  
FERMENTACIÓ ALCOHÒLICA A BAIXES  
TEMPERATURES**

Memòria presentada per

**JOSEP M. LLAURADÓ I REVERCHON**

per optar al grau de Doctor en Bioquímica

sota la direcció del Dr. Albert Mas i Barón i Dra. Magdalena Constantí i

Garriga

Tarragona 2002

Vull agrair a totes les persones que, d'una manera o altra, han contribuït a que aquest treball hagi estat dut a terme:

En primer lloc, al meus directors de tesi, Dra. Magdalena Constantí i Dr. Albert Mas, sense els quals no hauria estat possible la realització d'aquest treball. Als qui agraeixo la seva dedicació i suport, així com la confiança dipositada en mi per a la realització d'aquest treball.

Als cellers Miguel Torres, S.A., personificats en el Dr. Raül Bobet i la Sra. Anna Velázquez, que han permès en gran mesura el finançament d'aquest treball a través d'un projecte CDTI. També els agraeixo les seves accessibilitats.

Al Dr. Nicolas Rozès, a qui agraeixo sincerament el seu ajut i la seva disponibilitat en tot moment.

A tots els membres del Departament de Bioquímica i Biotecnologia que m'han mostrat el seu suport durant tots aquests anys. En especial al Santiago Moreno pel seu ajut en els primers moments per passar-me mostres per l'HPLC i recolzament en la realització de les pràctiques, i als Directors del Departament Dr. Albert Bordons i Dra. Cinta Bladé.

A la gent que he tingut aprop en el desenvolupament del meu treball, tant dins com fora del laboratori. Així, agraeixo per la seva amistat, a l'Andreu, i a la mítica tètrada formada a més per Guillem i Alfonso. També molt sincerament, a la Marta, la Blanca, la Judith Habitxuel, la Miriam i la Gemma. I al duet Noemí i M.J., companya de poiata i de tertúlies esportives. Al cantaire del Ramon i al walkman Josep, amb els quals haguéssim fet un triumvirat en el qual les coses haguessin funcionat d'una altra manera.

Als meus amics de tota la vida, la penya del Canta, els agraeixo els ànims que m'han donat.

A la Cristina, per estar al costat meu en tot moment i pel suport incondicional mostrat en el moment de la confecció de la memòria. Com a veterana de tesi, li he d'agrair els bons consells donats.

Als meus familiars, germans Tomàs i Gigi, la meva avia Teresa i als meus pares que m'han recolzat sempre. Un especial record als meus avis, Roger, Tomàs i Germaine, a qui dedico aquest treball.

**A mémé.**

## ABREVIATURES ENOLÒGIQUES I PRÒPIES

FAL	Fermentació alcohòlica
FAN	Nitrogen amínic lliure
FDA	Fosfat de diamoni
FDK	Fermaid K ®
FML	Fermentació malolàctica
GAP	Permeasa general d'aminoàcids
LSA	Llevats secs actius
ND	Nitrogen disponible per als llevats
ND'	Nitrogen dels aminoàcids neutres
R	Paràmetre empíric de fermentabilitat
SRS	Seqüència de Reducció del Sulfat
V	Velocitat màxima de fermentació
YPD	Medi per als llevats amb peptona i dextrosa

<b>JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS</b>	1
<b>INTRODUCCIÓ</b>	5
<b>1 Aspectes metabòlics de la fermentació</b>	7
<b>1.a Metabolisme nitrogenat</b>	9
<b>1.a.1 Components nitrogenats al most i vi: factors que els condicionen</b>	9
1.a.1.1 Aminoàcids	12
1.a.1.2 Amoni	16
1.a.1.3 Nitrat	16
1.a.1.4 Proteïnes i pèptids	17
<i>1.a.1.4.1 Proteïnes</i>	18
<i>1.a.1.4.2 Pèptids</i>	20
1.a.1.5 Nucleòtids	20
1.a.1.6 Amines	21
1.a.1.7 Vitamines	22
<b>1.a.2 Captació, metabolisme i productes</b>	23
1.a.2.1 Captació	26
1.a.2.2 Metabolisme	33
1.a.2.3 Productes	36
<i>1.a.2.3.1 Alcohols superiors</i>	37
<i>1.a.2.3. Èsters</i>	41
<i>1.a.2.3.3 Sulfur d'hidrogen</i>	43
1.a.2.3.4 Carbamat d'etil	44
<b>1.a.3 Adjuvants nitrogenats</b>	44
<b>1.b Sucres: glucosa i fructosa</b>	47
<b>1.b.1 Composició en el most i vi: factors que la condicionen</b>	47
<b>1.b.2 Captació, metabolisme i productes</b>	49
1.b.2.1 Captació	50
1.b.2.2 Glucòlisi	53
1.b.2.3 Del piruvat a l'etanol	53
1.b.2.4 Productes secundaris	55

<b>2 Llevats: ecologia de les espècies i soques enològiques</b>	58
<b>2.1 Llevats del raïm i del vi</b>	59
<b>2.2 Soques dels llevats vinificadors</b>	62
<b>2.3 Incidència qualitativa dels llevats no-<i>Saccharomyces</i></b>	65
<b>2.4 Altres microorganismes del vi: bacteris làctics i bacteris acètics</b>	65
<b>3 Fermentacions a baixes temperatures</b>	67
<b>3.1 Influència de la temperatura sobre les poblacions de llevats</b>	67
<b>3.2 Soques criotolerants de <i>Saccharomyces</i></b>	68
<b>3.3 Solucions a l'estrès tèrmic en el moment la inoculació</b>	69
<b>PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL</b>	71
<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>	75
<b>A) Caracterització de les fermentacions a baixes temperatures de varietats de mostos amb fermentabilitat compromesa</b>	77
1 Composició dels mostos	79
2 Composició nitrogenada de l'adjuvan nutritiu Fermaid K	82
3 Composició dels mostos suplementats amb adjuvants nutritius	83
4 Descripció de les cinètiques i paràmetres fermentatius	84
5 Assimilació dels components nitrogenats	89
6 Contingut d'etanol i productes secundaris en els vins	101

<b>B) Interrelació dels adjuvants nutritius, soca de llevat inoculada i llevats nadius sobre el desenvolupament de la fermentació alcohòlica a baixa temperatura</b>	107
<b>1 Estudi de l'efecte de diferents combinacions d'adjuvants nutritius en relació a la soca de llevat inoculada</b>	107
1.1 Efecte dels adjuvants nutritius sobre la cinètica fermentativa, depenent de la soca inoculada	108
1.2 Dinàmica de poblacions de llevats	111
1.3 Consum diferencial de glucosa i fructosa	114
1.4 Consum d'amoni al llarg de la fermentació alcohòlica	116
1.5 Continguts de glicerol i àcid acètic en els vins	118
<b>2 Efecte de l'addició de diferents quantitats de fosfat de diamoni sobre la cinètica fermentativa</b>	120
2.1 Comparació de paràmetres cinètics de la fermentació alcohòlica	121
<b>3 Incidència de l'espècie de llevat <i>Candida stellata</i> sobre la fermentació alcohòlica</b>	122
3.1 Efecte dels inòculs purs i mixtes sobre els paràmetres cinètics de la fermentació alcohòlica	123
<b>C) Pre-adaptació a la temperatura de fermentació alcohòlica de llevats vínics</b>	125
1 Efecte de la pre-adaptació a la temperatura de fermentació sobre els paràmetres cinètics	127
2 Dinàmica de les poblacions de llevats	130
3 Evolució del contingut d'amoni i aminoàcids al llarg de la fermentació	134
4 Contingut d'etanol i productes secundaris en els vins	136

<b>CONCLUSIONS</b>	147
<b>ANNEX I. MATERIALS I MÈTODES</b>	151
<b>1 Mostos i condicions de fermentació</b>	153
1.1 Microfermentadors	153
1.2 Mostos	153
1.3 Ompliment dels microfermentadors	153
1.4 Preparació de l'inòcul de llevat i inoculació	153
1.5 Presa de mostra	153
<b>2 Seguiment fermentació</b>	154
2.1 Seguiment de la cinètica fermentativa	154
2.2 Seguiment de poblacions de microorganismes	154
2.2.1 <i>Recompte de viables</i>	155
2.2.2 <i>Aïllament de llevats Saccharomyces i no-Saccharomyces</i>	155
2.2.3 <i>Identificació i tipificació dels llevats</i>	155
2.2.3.1 <i>Identificació a nivell d'espècie</i>	156
2.2.3.2 <i>Tipificació a nivell de soca</i>	157
<b>3 Anàlitiqes bàsiques en mostos i vins</b>	158
3.1 Grau probable	158
3.2 Acidesa total	158
3.3 pH	158
3.4 Determinació de sucres reductors	158
3.5 Determinació de glucosa i fructosa	159
3.6 Determinació de SO <sub>2</sub> total	160
3.7 Grau alcohòlic per espectrofotometria del infrarroig proper	160
3.8 Grau alcohòlic per ebullimetria	160

<b>4 Analítiques de compostos nitrogenats</b>	161
4.1 Determinació d'amoni	161
4.2 Determinació d'aminoàcids totals	162
4.3 Determinació d'aminoàcids individuals	163
4.4 Determinació de proteïna	164
4.5 Nitrogen fàcilment assimilable (nitrogen disponible) per als llevats (valoració amb formaldehid)	164
4.6 Estimació del nitrogen fàcilment assimilable (nitrogen disponible) per als llevats (ND)	165
<b>5 Analítiques de compostos secundaris</b>	166
5.1 Determinació d'alcohols superiors	166
5.2 Àcids grassos, èsters etílics d'àcids grassos i acetats d'alcohols superiors	167
5.3 Determinació de glicerol	168
5.4 Determinació d'àcid succínic	169
5.5 Acetaldehid	170
5.6 Àcid acètic	171
<b>6 Tractament de dades. Estadística</b>	172
6.2 Anàlisi de la variància (ANOVA)	172
6.3 Anàlisi d'agrupament jeràrquic ascendent ("clusters")	172
6.4 Anàlisi de factors. Anàlisi de components principals	172
 <b>ANNEX II. TAULES D'AMINOÀCIDS</b>	 173
 <b>ANNEX III. IDENTIFICACIÓ I TIPIFICACIÓ DE SOQUES DE LLEVATS COMERCIALS. IDENTIFICACIÓ DE LLEVATS NADIUS</b>	 177
 <b>BIBLIOGRAFIA</b>	 181



# JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS



## **JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS**

La fermentació alcohòlica, com a principal procés metabòlic de la vinificació, té un especial interès per a les empreses vitivinícoles. Nombrosos factors, com són ara la varietat vinífera, el conreu de la vinya, la higiene de la verema, el processat d'aquesta, l'ús d'un inòcul i d'adjuvants concrets, i la temperatura de fermentació tenen una clara incidència en el correcte desenvolupament de la fermentació alcohòlica que beneficia la qualitat final del vi.

En aquest sentit, l'empresa vitivinícola Miguel Torres, S.A. va iniciar contactes amb el grup de recerca, dirigit pel Dr. Albert Mas i Barón, del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili. Dits contactes es van traduir en el finançament del present treball a través d'un contracte d'investigació CDTI. El desenvolupament del treball es va realitzar íntegrament als laboratoris de recerca i del celler experimental de la Facultat d'Enologia de Tarragona, sota la direcció del mateix Dr. Albert Mas i Barón i de la Dra. Magdalena Constantí i Garriga. Així mateix, aquest treball va estar finançat també en part pel projecte de recerca "Caracterización de microorganismos y plantas: Aplicación de técnicas de Biología Molecular a la Viticultura y Enología (ALI96-0497)".

Durant el desenvolupament del treball va existir una comunicació i col·laboració fluïda amb l'empresa Miguel Torres, S.A., a través del seu equip d'investigació i desenvolupament (I+D) de la unitat d'enologia, encapçalat pel Dr. Raül Bobet. D'aquesta manera es discutien els resultats fruit dels experiment realitzats i se'n plantejaven de nous.

L'esmentat equip d'I+D observaren al llarg de diferents campanyes vitivinícoles que mostos de certes varietats viníferes independentment del terrer i de les pràctiques de conreu del vinyer presentaven de manera reincident problemes de fermentabilitat, ja fossin aturades o alentiments.

Els llevats, responsables de la fermentació alcohòlica del most, necessiten uns requeriments per poder desenvolupar-se i dur a terme la fermentació. Un d'aquests

requeriments, que es poden trobar en quantitats limitants són els compostos nitrogenats metabolitzables per al llevat en condicions de vinificació.

Per una altra banda, l'afany de l'empresa per oferir un producte més apreciat per al consumidor fa que s'hi introdueixin noves tècniques d'elaboració. Una d'aquestes tecnologies són les fermentacions a baixes temperatures en l'elaboració de vi blanc i rosat. Les esmentades pràctiques poden comprometre el correcte funcionament de la fermentació alcohòlica.

Una sèrie de mesures es poden contemplar per a resoldre problemes en la fermentabilitat dels mostos o millorar les fermentacions en les condicions a dalt esmentades. Així doncs, s'addicionen al most diferents mesclades de compostos existents en el mercat per compensar mancances nutritives per als llevats, amb eficàcies i preus dissemblants. Així mateix, no tots els llevats comercials tenen la mateixa eficàcia fermentativa per a unes condicions de vinificació concretes, i es suggereix que la manera de preparació dels inòculs tenen una clara incidència en desenvolupament del llevat i de la fermentació.

Per a l'estudi de tots aquests aspectes de la fermentació alcohòlica amb implicacions importants en el sector industrial de vinificació es fixaren els següents objectius:

1<sup>er</sup>) Caracterització de les fermentacions a baixes temperatures de varietats de mostos amb fermentabilitat compromesa.

2<sup>on</sup>) Interrelació dels adjuvants nutritius i llevats en el desenvolupament de la fermentació alcohòlica a baixa temperatura.

3<sup>er</sup>) Pre-adaptació a la temperatura de fermentació alcohòlica dels llevats vínics.

# INTRODUCCIÓ



# INTRODUCCIÓ

## 1 Aspectes metabòlics de la fermentació

L'elaboració del vi comporta la transformació del most o suc de raïm per l'activitat metabòlica dels llevats (*Saccharomyces cerevisiae*) que s'hi desenvolupen. El principal procés metabòlic desenvolupat és la fermentació alcohòlica (FAL), la qual cosa implica la transformació de les hexoses del most en etanol ( $C_2H_5OH$ ) i diòxid de carboni ( $CO_2$ ) que dona caràcter vinós (alcohol i color) a aquesta beguda mil·lenària.

Al raïm que arriba al celler se li poden donar dues destinacions, segons la tècnica de vinificació: vinificació en negre o vinificació en blanc o en verge. En el primer cas, s'obté una pasta de la verema derrapada o no. Aquesta pasta fermenta en tines i es produeix una extracció de substàncies colorades i astringents de les parts sòlides (brisa) a la part líquida, afavorida per l'augment d'alcohol. Una vegada que es considera que la part líquida és prou colorada i el contingut de sucres prou baix, es separa de la part sòlida, que forma un barret per damunt, i mares al fons, i s'obté el "vi de sangrat". La part sòlida, brisa xopa de most fermentat, es premsa i s'obté el "vi de premsa". Segons el temps que es deixa en contacte la brisa amb el líquid (maceració) es produeixen clarets, rosats i negres, de menys a més temps, respectivament.

En canvi, a la vinificació en blanc, es separa en un primer moment la part líquida de la part sòlida, per premsada de la verema derrapada i posterior desfangament, sedimentació de partícules sòlides de la premsada. El most net resultant es traspasa a una tina per a que fermenti. Al final de la fermentació, es separa el vi de les mares del fons de la tina.

La FAL és una ruta catabòlica alternativa a la fermentació homolàctica, via que duen a terme molts bacteris i cèl·lules de gran part dels animals superiors i vegetals; d'obtenció d'energia i producció d'etanol i  $CO_2$ , característics de molts llevats. La ruta segueix la via d'Embden-Meyerhof, i el piruvat resultant es descarboxila a acetaldèhid i  $CO_2$  mitjançant l'enzim piruvat-descarboxilasa i el cofactor pirofosfat de tiamina. Finalment, l'acetaldèhid és reduït a etanol per l'enzim alcohol-deshidrogenasa i l'aportació de potencial de reducció de  $NADH + H^+$ . D'aquesta manera es recupera

potencial d'oxidació consumit en etapes anteriors. L'equació global de la ruta es pot descriure de la següent manera:



Una via alternativa per reoxidar el NADH, i per tant per mantindre el balanç redox, és la formació de glicerol, a partir d'un intermediari de la glucolisi, fosfat de dihidroxiacetona. El glicerol és un dels productes més importants en termes quantitius de la fermentació alcohòlica després del etanol i diòxid de carboni.

La cinètica fermentativa (consum de sucre/temps) segueix una cinètica paral·lela a la corba de creixement dels llevats, de forma sigmoidea, amb una fase de latència, exponencial i estacionària (Giovanelli i col., 1995).

L'eficiència del procés en situacions industrials, amb l'objectiu de produir alcohol amb substrats no ideals (subproductes d'altres indústries) es situa a un 90 % del rendiment teòric GL (de Gay Lussac). A la Taula 1, es descriu en les concentracions de producte per 100 g de glucosa fermentada en un procés de producció d'etanol que utilitza llevats (Bu'lock i Kristiansen, 1991)

**Taula 1.** Rendiment de la fermentació alcohòlica (Bu'lock i Kristiansen, 1991).

<b>Producte</b>	<b>Variació de la concentració (g per 100 g de glucosa fermentada)</b>
Etanol	45-49
Anhídrid carbònic	43-47
Glicerol	2-5
Succinat	0,5-1,5
Alcohol superiors	0,2-0,6
Acetat	0-1,4
Butilenglicol	0,2-0,6
Material cel·lular	0,7-1,7

La fermentació alcohòlica com a ruta catabòlica d'obtenció d'energia és menys eficient que la respiració, car no es completa l'oxidació del substrat . Per compensar la manca d'eficiència de la fermentació, les cèl·lules responen augmentant el flux glucolític. Encara així, els llevats que són microorganismes anaeròbics facultatius, fermenten el most en les condicions inicials, en les quals la tensió d'oxigen és prou elevada per respirar les hexoses. L'elevada quantitat de sucres dels mostos fa que els



llevats (*S. cerevisiae*) fermentin i no respirin, malgrat la presència d'oxigen (efecte Crabtree). Iniciada la fermentació, la tensió de CO<sub>2</sub> és prou elevada per a que la vinificació transcorri en condicions anaeròbiques (Walker, 1998).

A la Taula 2, es representen els constituents tant del most com del vi. En el cas del most, els constituents provenen principalment de la polpa, la qual representa entre un 83 i un 91 % del conjunt de la baia de raïm, segons la varietat vinífera (Cabanis i col., 1998). A partir del most, la fermentació alcohòlica que condueix al vi modificant la composició inicial per la desaparició dels sucres, glucosa i fructosa, i formació d'alcohols juntament de productes secundaris com polialcohols, especialment el glicerol, diferents àcids orgànics i gran varietat de components volàtils constituents de l'aroma. La composició del vi en definitiva resultar ser més complexa que la del most, i el nombre de components s'eleva a varis centenars, dels quals molts es troben en quantitats ínfimes.

**Taula 2.** Composició del most i del vi (g/L) (Cabanis i col. 1998).

	<b>Most</b>	<b>Vi</b>
Aigua	700-850	750-900
Sucres	140-250	0,1-2
Polisacàrids	3-5	2-4
Alcohols	-	69-121
Polialcohols	-	5-20
Àcids orgànics	9-27	3-20
Polifenols	0,5	2-6
Compostos nitrogenats	4-7	3-6
Minerals	0,8-2,8	0,6-2,5
Vitamines	0,25-0,8	0,2-0,7

## **1.a Metabolisme nitrogenat**

### **1.a.1 Components nitrogenats al most i vi: factors que els condicionen**

El desenvolupament de la FAL ve determinada en gran mesura per les característiques de la matèria primera, el most. Deixant de banda les aportacions aromàtiques dites varietals que caracteritzen un tipus de vi, la varietat vinífera d'on prové el most té una gran incidència sobre la seva fermentabilitat, entenent com a fermentabilitat, la facilitat de consum dels sucres del most per part dels llevats

mitjançant un procés fermentatiu. Dubois i col., (1996), senyalen que les cinètiques de fermentació (corbes de progressió de la FAL al llarg del temps) varien de forma important entre les varietats de raïm. Així mateix detecten que la campanya, any productiu caracteritzat per condicions meteorològiques concretes i diferents a un altre any, té una incidència en la velocitat màxima fermentativa, i que el grau de maduració del raïm fa canviar dràsticament les cinètiques en els finals de fermentació.

Problemes fermentatius, ja siguin aturades o endarreriments en el procés van associades a algunes varietats en particular, que s'expliquen en part pel baix contingut en nitrogen dels mostos produïts (Monk i col., 1987). Aquestes diferències varietals afecten per tant al creixement dels llevats i la velocitat de fermentació. La Taula 3 ens mostra aquesta dependència de la varietat i el contingut de nitrogen assimilable pels llevats, es dir nitrogen que el llevat pot incorporar a les seves rutes metabòliques, i així com certes varietats tenen continguts mitjos per sota del valor de 140 mg/l, considerat com la mínima concentració de nitrogen necessària per a portar a terme la FAL. Per una altra banda, els mostos de Riesling i Chardonnay, dels quals es té una àmplia mostra, a part de tenir una mitjana propera del mínim necessari de nitrogen, presenten una gran variabilitat, indicant que molts mostos d'aquestes varietats estarien per sota del mínim. Són coneguts els problemes de fermentabilitat d'aquestes varietats (Ingledeew i Kunkee 1985, Allen Auld 1988). Els atacs de podridures al raïm, com la de *Botrytis cinerea* fan minvar encara més els continguts de nutrients, així mateix que processos pre-fermentatius com el desfangament (Sponholz, 1991).

Els mostos de varietats negres també tenen un baix contingut en nitrogen assimilable encara que menys variable que els mostos de Riesling. Endarreriments i aturades de fermentacions no són habituals en mostos provinents d'aquestes varietats. El procediment de la vinificació en negre implica més contacte amb l'aire i més presència de sòlids, factors que augmentarien el creixement i supervivència dels llevats (Lafon-Lafourcade i col., 1979). L'aire aportaria oxigen necessari per a la síntesi d'esterols i àcids grassos insaturats, components necessaris de les membranes dels llevats. Els sòlids en suspensió, per la seva banda, aportarien nutrients pels llevats, i actuarien com nuclis de formació de les bombolles de CO<sub>2</sub>, les quals escaparien a l'atmosfera quan arriben a una grandària determinada, disminuint l'efecte inhibitori d'aquest producte metabòlic en el creixement dels llevats (Thomas i col., 1994).

**Taula 3.** Contingut en nitrogen (mg N/l) de mostos.

Varietat	nº de mostres	Mitjana	Desviació estàndard
Riesling <sup>(1)</sup>	48	146	149
Cabernet sauvignon <sup>(1)</sup>	9	159	50
Shirah <sup>(1)</sup>	21	179	63
Pinot Noir <sup>(1)</sup>	36	182	81
Chardonnay <sup>(1)</sup>	66	222	100
Traminer <sup>(1)</sup>	15	279	137
Sauvignon Blanc <sup>(1)</sup>	8	339	168
Garnatxa negra <sup>(2)</sup>	2	98,5	3,5
Cinsault <sup>(2)</sup>	1	189	-
Aramon <sup>(2)</sup>	1	119	-
Chasselas <sup>(2)</sup>	1	138	-
Bourboulenc <sup>(2)</sup>	1	84	-
Terret Bourret <sup>(2)</sup>	1	123	-
Merlot <sup>(2)</sup>	1	160	-
Aurore <sup>(3)</sup>	1	660	-
Catawba <sup>(3)</sup>	1	380	-
Concord <sup>(3)</sup>	1	330	-
Niagara <sup>(3)</sup>	1	220	-
Elvira <sup>(3)</sup>	1	230	-
Ravat <sup>(3)</sup>	1	550	-
Seyval <sup>(3)</sup>	1	300	-
Vidal <sup>(3)</sup>	1	320	-
Baco Noir <sup>(3)</sup>	1	410	-
Chancellor <sup>(3)</sup>	1	440	-
Mostos blancs <sup>(4)</sup>	50	365	128
<b>Mostos negres<sup>(4)</sup></b>	<b>43</b>	<b>418</b>	<b>126</b>

(1) Jiranek i col (1993); (2) J.M. Sablayrolles i col. (1996); (3) Sponholz (1991); (4) Cáceres i col. (1987).

La planta absorbeix el nitrogen en forma de nitrats i sals amoniacals a nivell de les arrels. Els nitrats són reduïts per via enzimàtica per donar cations amoni, els quals són el punt de partida de la biosíntesi dels aminoàcids que són forma no tòxica de vehicle del nitrogen als òrgans aeris de la planta. (Wermelinger, 1991; Sponholz, 1991).

Si bé la concentració de nitrogen total de la polpa del raïm augmenta a llarg de la maduració, ja sigui per doblar o triplicar el contingut inicial, el contingut de nitrogen amoniacal i en general el del nitrogen assimilable pels llevats es manté constant o disminueix degut a la síntesi proteica iniciada al verolament (Feuillat i col., 1998). Els

anys secs i càlids donen, en general en zones vitícoles meridionals, mostos mancats en nitrogen assimilable (Sponholz, 1991).

Els principals components nitrogenats (Taula 4) que trobem als mostos provinents bàsicament de la polpa del raïm són els següents: amoni ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrats, aminoàcids, proteïna, polipèptids, nucleòtids, amines biògenes i vitamines. Només els aminoàcids i l'amoni es poden considerar com quantitativament importants en l'aportació de nitrogen per la síntesi de proteïnes estructurals i funcionals, que fan augmentar la biomassa dels llevats (creixement) i la producció d'enzims i transportadors de metabòlits que intervenen en els canvis bioquímics al llarg de la fermentació alcohòlica. Les vitamines per la seva banda estimularien el creixement i la fermentació per altres mecanismes.

**Taula 4.** Components nitrogenats del most (Aerny, 1996; Feuillat, 1998).

	<b>Massa molecular</b>	<b>Valors bibliografia</b>
<b>Nitrogen total</b>	14	0,2 a 1,7 g/l
<b>Nitrogen mineral</b>		
Amoni $\text{NH}_4^+$	18	3 a 10 %
Nitrat $\text{NO}_3^-$	62	< 0,3 %
<b>Nitrogen orgànic</b>		
Proteïnes	> 10.000	2 a 5 % del nitrogen total
Polipèptids	< 10.000	10 a 30 % del nitrogen total
Aminoàcids	100-200	60 a 80 % del nitrogen total
Amines biògenes	30-200	< 25 %
Nucleòtids		< 13 %
Vitamines		
<b>Nitrogen assimilable</b> (aminoàcids+amoni)		60 a 70% del nitrogen total

### 1.a.1.1 Aminoàcids

El contingut d'aminoàcids als mostos representa entre 60 % i 80 % del nitrogen total (Aerny, 1998).

Els primers estudis ja revelaven que els mostos contenien la vintena d'aminoàcids del regne vegetal (Luthi i Vetsch, 1952, Carles i col., 1958; Lafon-Lafourcade i Peynaud, 1959; Jaulmes i col., 1963; Flanzy i col., 1964; Terceelj, 1965; Kliewer, 1968), els quals arriben a totalitzar una concentració entre 700 mg/l i 8.000

mg/l (Ough i Amerine, 1988; Bisson, 1991; Huang i. Ough, 1991; Dizy i Polo, 1996; Spayd i Bagge, 1996; Hernández, 1998; Canabis i col., 1998; Guitart i col, 1999). Els dos aminoàcids més abundants són la prolina i l'arginina independentment de la varietat i l'origen geogràfic. Aquest dos aminoàcids tenen com a precursor comú l'àcid glutàmic que juntament amb l' $\alpha$ -alanina són els seguidament més abundants (Ough i Amerine, 1988; Canabis i col.,1998; Feuillat i col., 1998). El contingut de prolina augmenta a mesura que va madurant el raïm ( Ough, 1968; Kliewer, 1970). En canvi, l'augment o la disminució en contingut d'arginina és independent al grau de maduració, i és determinat per la varietat vinífera (Kliewer, 1970). Els anys càlids donen lloc normalment a continguts de prolina als mostos més elevats que els anys més freds. (Winkler, 1987).

Huang i Ough, 1991, estudien mostos de dues àrees de Califòrnia (Napa Valley i Carneros) arribant a la conclusió que els perfils d'aminoàcids varien molt entre varietats, especialment, els majoritaris, i es conserven els patrons d'aminoàcids per una varietat i terrer determinats en diferents campanyes. Suggereixen la possible relació entre varietat i quocient entre prolina i arginina, reflectint diferències genètiques entre varietats. Sauvage i col., 1993 confirmen aquestes conclusions amb 21 varietats plantades en una mateixa parcel·la, al sud de França. A més, associen nivells d'activitats enzimàtiques, (MDH, malat deshidrogenasa; GOT, glutamat oxaloacetat transaminasa; GPT, glutamat piruvat trasaminasa; EM, enzim màlic; ADH, alcohol deshidrogenasa), algunes implicades en la síntesi d'aminoàcids, a certes varietats. Per una altra banda, Spayd i Adersen-Bagge, 1996, fent el mateix tipus d'estudi a l'estat de Washington per a les mateixes campanyes troben que per les varietats comuns estudiades, només el quocient prolina:arginina de la varietat Cabernet Sauvignon de Washington és similar al quocient prolina:arginina de la mateixa a Califòrnia. La gran variació entre campanyes del contingut d'arginina impossibilita l'agrupació de les varietats segons el quocient prolina:arginina per la zona de Washington. Diferències en el conreu de la vinya, sobretot en l'aportació de fertilitzant nitrogenat, d'aquestes dues zones vitivinícoles podrien explicar aquesta disparitat.

Un aminoàcid bastant específic del raïm és l'àcid  $\gamma$ -aminobutíric, identificat per varis autors (Feuillat, 1974; Cáceres i col., 1987; Monteiro i Bisson, 1991a; Dizy i Polo, 1996; Hernández Orte i col, 1997; Guitart, 1999). La seva concentració augmenta, sobretot, com a conseqüència del metabolisme anaeròbic de la baia, provocat per

l'estrès tèrmic en el període estival (Feuillat, 1998), i per tant associat a la inducció de certes activitats enzimàtiques (Sauvage i col. 1991). La síntesi d'aquest aminoàcid es podria estendre fins i tot després de la verema (Bisson, 1991).

**Taula 5.** Comparació quantitativa d'aminoàcids majoritaris de mostos de varietats viníferes, espècies i híbrids.

<b>Varietat</b>	<b>Arg</b>	<b>Pro</b>	<b>Ala</b>	<b>Gaba</b>	<b>OH-Pro</b>
Chardonnay(2,3)	↓	↑	↑	↑	
Sauvignon(2,3)	↑	↓		↑	
Muscat de Hambourg(2)			↑		
Merlot(2,3)	↓	↑			
Cabernet Sauvignon(2,4)	↓↓	↑↑			
Pinot Noir(2)	↑	↓			
Syrah(3)		↑	↑		
<i>Vitis vinifera</i> (1)			↓		
<i>Vitis lambrusca</i> (1)			↑↑		
Híbrid( <i>V. Lambrusca</i> X <i>Vinifera</i> )(1)					↑

(1) Kluba i col., 1978; (2) Huang i Ough, 1991; (3) Sauvage i col., 1993; (4) Spayd i Andersen-Bagge, 1996. ↓↓ Molt baix contingut. ↓ Baix contingut. ↑↑ Molt alt contingut. ↑ Alt contingut.

La Taula 5, resumeix comparacions de continguts d'aminoàcids d'espècies i varietats viníferes, fetes per diferents autors. Ens mostra la rellevància que té la varietat sobre la composició qualitativa i quantitativa d'aminoàcids. S'ha aprofitat els espectres d'aminoàcids lliures, tractats amb mètodes estadístics, per a diferenciar espècies i varietats (Ough, 1968; Feuillat, 1974; Kluba i col., 1978; Cantagrel i col., 1982; Millery i col., 1986; Huang i Ough, 1991; Sauvage i col., 1993; Spayd i Andersen-Bagge, 1996), així com per a determinar l'origen de vins: negres (Ooghe i col., 1981; Symonds i Cantagrel, 1982; Etievant i col., 1988); vins a base de Chardonnay de diferents regions de producció (Carnevillier i col., 1999); vins monovarietals blancs de Macabeu, Xarel.lo i Parellada (Presa-Owens i col., 1995); vins de criança biològica (Fino) i vins de criança fisicoquímica (Oloroso) (Botella i col., 1990).

El contingut d'aminoàcids al most depèn de la varietat, es a dir de les potencialitats genètiques de cada varietat. Però, l'espectre d'aminoàcids es veu influenciat també per l'origen geogràfic (Ooghe i col., 1981; Spayd i Andesen-Bagge, 1996). A més, l'anyada, les condicions climàtiques (Flanzy i Poux, 1965; Feuillat, 1974; Millery i col., 1986; Huang i Ough, 1991), el grau de maduració (Kliewer, 1970; Millery i col., 1986) i els tractaments pre-fermentatius, en concret els temps de maceració (Usseglio-Tomaset i Bosia, 1990; Guitart i col. 1997; Hernández Orte i col., 1998) i el desfagament (Ancin i col., 1996) tenen un efecte sobre la composició d'aminoàcids del most.

Els treballs pioners de Schultz i Pomper (1948) mostraven que l'alanina, arginina, asparagina, àcid aspàrtic, àcid glutàmic, leucina i valina promouen un bon creixement dels llevats utilitzats com única font de nitrogen. Isoleucina, metionina, fenilalanina, serina i triptòfan donen lloc a un creixement entre bo i moderat mentre que cisteïna, glicina, histidina, lisina, prolina i treonina són fonts pobres de nitrogen.

Cal indicar que la lisina com a única font de nitrogen té un efecte inhibitori sobre el creixement de *S. cerevisiae*. Aquesta inhibició s'anul·la en el moment que s'afegeixen altres fonts nitrogenades (Ingledew, 1993). En canvi, molts altres llevats poden utilitzar la lisina com a única font de nitrogen (Large, 1986). Aquest fet, té un valor com a tret taxonòmic (Bossinger i col., 1974; Brandriss i Magasanik, 1980; Anderson i Dagley, 1981) i també com a test de contaminació de llevats nadius a cerveseres i cellers (Bourgeois i Thouvenot, 1970; Brandriss i Magasanik, 1979; Anderson i Dagley, 1981; Angelo i Siebert, 1987; Constantí i col., 1998). Així mateix la glicina, la qual el llevat el capta ràpidament, és inhibidora pel creixement del llevat i el desenvolupament de la FAL (Thomas i Ingledew, 1992).

Per una altra banda, estudis de FAL realitzats amb medis definits mostren que la prolina i la glicina protegeixen al llevat de l'estrès osmòtic que provoquen melasses i mostos d'alta concentració de sucres. Similar funció de la prolina s'ha descrit en plantes i alguns bacteris. (Thomas i col., 1994; Ingledew, 1997).

### 1.a.1.2 Amoni

L'amoni trobat tant al most com al vi en forma de catió ( $\text{NH}_4^+$ ), representa en valors de nitrogen (nitrogen amoniacal) entre 3 a 10 % del nitrogen total que es troba al most madur, és a dir entre unes poques desenes de mg/l de catió a uns pocs centenars mg/l (Feuillat, 1974; Vos i Gray, 1979; Bisson, 1991; Huang i Ough, 1991; Ingledew, 1997; Aerny, 1996; Larchevêque i col., 1999).

Al igual que el contingut d'aminoàcids a la baia, el contingut d'amoni és més elevat quan més baix és el grau de maduració. Així mateix, els anys càlids i secs es troben continguts més baixos d'amoni al most (Feuillat i col., 1998). Per les mateixes raons, l'alçada del vinyer condiona el contingut d'amoni al most, en el sentit de a més cota més contingut d'amoni (Sponholz, 1991).

Hi ha grans desigualtats en el contingut d'amoni entre mostos com a resultat de les diferències varietals i les pràctiques de conreu (Ough i Kriel, 1985; Spayd i Andersen-Bagge, 1996).

L'amoni és una font de nitrogen preferent pels llevats, i s'esgota als primers dies de la FAL, per la qual cosa es troba a menys de 10 mg/l als vins secs, i fins a 50 mg/l en vins endolcits amb most (Ough, 1988).

### 1.a.1.3 Nitrat

Els nitrats ( $\text{NO}_3^-$ ) i els nitrits ( $\text{NO}_2^-$ ) només representen com a màxim 5 % del nitrogen total del most (Ough i Amerine, 1988). No són directament assimilables pels llevats que duen a terme la FAL, *Saccharomyces cerevisiae* (Aerny, 1996).

La relació entre nitrats i cendres s'utilitza per a esbrinar si un vi ha estat realitzat amb most aigualit. Els valors d'aquesta relació han d'estar per sota de 7 a 8 per vins no aigualits. (Ough i Amerine, 1988).



#### 1.a.1.4 Proteïnes i pèptids

Les proteïnes i polipèptids no són fonts preferents de nitrogen dels llevats durant la FAL, i només poden contribuir en l'aportació d'aquest element en situacions en que s'han esgotat fonts fàcilment assimilables (amoni i aminoàcids). En aquesta situació, els llevats activen el seu sistema enzimàtic en la mesura de poder degradar pèptids i proteïnes del most, a fi de reduir-los en forma d'aminoàcids assimilables (Trioli i Paronetto, 1992). Aquest sistema no s'ha descrit per *S. cerevisiae*.

L'interès pel coneixement de les proteïnes i polipèptids del most i vi, llavors, es centren en altres aspectes no directament relacionats amb la contribució de nutrients pels llevats que desenvolupen la FAL. Així, són causes de diferents problemes tecnològics en la elaboració dels vins. Degut a la seva natura coloidal, dificulten operacions bàsiques com és la filtració, per a la qual cosa es realitzen diferents tractaments (aplicació d'argiles carregades electronegativament, com bentonites) eliminen part d'aquestes molècules per minimitzar els seus efectes. Així mateix, són responsables de l'aparició de terbolesa a l'ampolla, defecte anomenat trenca proteica. També, es relaciona amb l'endarreriment de la precipitació del tartarat de potasi en el procés d'estabilització en fred del vi (Cáceres i col., 1987; Canals, 1997 ; Feuillat i col., 1998). Finalment, com a efectes problemàtics sobre la tecnologia de l'elaboració del vi, s'ha d'indicar que diferents treballs senyalen que les proteïnes tenen capacitats fixadores importants de compostos aromàtics (Kinsella, 1990; Lubbers i col., 1996).

Per una altra banda, les proteïnes són agents escumants, fet que és un inconvenient durant la FAL, ja que pot provocar desbordament de les tines de fermentació. La utilització de tensioactius (mono- i diglicèrids de l'àcid oleic) han solucionat el problema de manera satisfactòria (Ribéreau-Gayon i col., 1998). En canvi la presència de proteïnes en els vins efervescents permet l'estabilització de les bombolles i formació del cordó i corona d'escuma.

Feuillat i col. (1977), indiquen que els pèptids i concretament la fracció que inclou els oligopèptids de massa molecular inferior a 1000 Da són font nitrogenades dels bacteris làctics que desenvolupen la fermentació malolàctica (FML).

#### **1.a.1.4.1 Proteïna**

Les proteïnes aïllades en els mostos i vins tenen unes masses moleculars que van entre 10 kDa i els 90 kDa, i punts isoelèctrics de 3,6 a 11. Hi ha proteïnes que poden representar fins el 60 % de les proteïnes totals, com és el cas de una proteïna de 28 kDa (Feuillat i col., 1998). Gran part d'aquestes proteïnes tenen residus glicosilats, amb un origen principalment vegetal (Yokotsuka i col., 1994; Moine-Ledoux, 1996) i en menys mesura amb origen parietal dels llevats (manoproteïnes) que duen a terme la FAL (Llauberes i col., 1987; Waters i col., 1994). La concentració i distribució de proteïnes es veu afectada per gran nombre de factors des de la brostació del cep fins el consum final del vi.

Així, la varietat vinífera marca significativament la concentració de proteïnes al most i al vi elaborat (Lamikanra i Inyang, 1988; González-Lara i col., 1989; Feuillat i col., 1995). Per una altra banda, s'ha intentat obtenir perfils proteics (isoenzims) mitjançant tècniques electroforètiques amb la intenció de diferenciar varietats (Bachmann, 1994; Liu i Walker, 1995). Altres autors emprant diferents tècniques electroforètiques, en extractes totals, no observen diferències dels patrons entre varietats, només en les intensitats de les bandes (Moio i Addeo, 1989; Pueyo i col., 1993; Dorrestein i col., 1995).

La climatologia, així com la natura del sòl poden influir en la concentració de proteïnes de mostos i vins, variant la seva concentració i distribució un any per altre (Paetzold i col., 1990). Una producció abundant del cep fa minvar les concentracions de proteïna en el most, en relació a un cep menys productiu (Feuillat i col., 1995). Es coneix que la concentració de proteïna augmenta a llarg de la maduració (Kock i Sajak, 1959; Murphey i col., 1989b; Paetzold i col., 1990), de manera que els vins elaborats a partir de mostos madurs contenen més proteïnes i es detecten proteïnes que no apareixen en vins de raïm més verd (Murphey i col., 1989b).

El tipus de verema també pot condicionar la concentració de proteïnes al most, en el sentit que la verema mecànica fa augmentar la concentració de proteïna degut a una menor integritat del gra de raïm en comparació a la verema tradicional a mà. (Paetzold i col., 1990).

L'obtenció de most en la elaboració de vi blanc, que vingui antecedida per una maceració pel·licular (contacte suc de raïm i pells) veurà incrementat la concentració de proteïna (Paetzold i col., 1990). Aquest mateixos autors observen que hi ha un efecte d'extracció de proteïnes al sulfitar la pasta de verema, i una menor quantitat de proteïna en mostos obtinguts de verema sencera (raïm i rapa) comparada amb verema derrapada.

L'augment de la pressió de premsat també fa incrementar la concentració de proteïnes en el most obtingut, pel fet que a la pell és on es troba més quantitat de proteïna (Feuillat i col., 1995). Una vegada obtingut el most, durant el desfangament s'observa activitat proteolítica (proteases del raïm) que degrada parcialment les proteïnes del most. Les proteases del raïm es troben en les parts sòlides i en la polpa, i per tant la decantació fa que disminueixi l'activitat proteolítica. L'augment d'alcohol tindria el mateix efecte (Fleet, 1994).

Sembla ser que la FAL implica una davallada de la concentració de nitrogen proteic (Hsu i Heatherbell, 1987; Ayestaran i col., 1995, Canals, 1997), i per una altra banda, Feuillat i col., 1998, indiquen que en general hi ha més nombre de proteïnes diferents en els vins que en els mostos d'on provenen, degut a canvis que es manifesten a llarg de la FAL i FML. Dins d'aquests canvis hi és el pH que influeix també a la disminució de la quantitat de proteïna. (Murphey i col., 1989b). S'ha suggerit, que les proteïnes poden afavorir la FAL, degut a la capacitat general de les macromolècules d'absorbir inhibidors de la fermentació (Ollivier i col., 1987), com ara els àcids decanòic i octanòic i llurs corresponents èsters etílics (Lafond-Lafourcade i col., 1984).

Els tractaments postfermentatius com són ara, la clarificació amb proteïnes d'origen animal i bentonita, i tractament criogènic amb l'objectiu d'eliminar sòlids en suspensió i en dissolució, i l'excés de tartrat de potassi i de calci, respectivament, fan precipitar les proteïnes inestables, i per tant fan disminuir la quantitat de proteïna al vi. (Canals, 1997).

#### **1.a.1.4.2 Pèptids**

A diferència de les proteïnes, hi ha molts menys estudis fets sobre els pèptids del most i del vi. Per convenció, s'agrupa sota terme de pèptid els polímers d'aminoàcids que no superin de massa molecular 10 kDa.

Yokotsuka i col, 1975 troben entre 130 i 325 mg/l de pèptids en vins japonesos. Els pèptids del most de la varietat japonesa Koshu està constituït bàsicament per àcid aspàrtic i glutàmic, els quals representen el 60 % del total dels aminoàcids. Aquest autors han observat que a llarg de la FAL els pèptids canvien la composició d'aminoàcids, i al vi es troben de fet constituïts per àcid aspàrtic, àcid glutàmic, glicina i prolina.

Estudis semblant fets en el Cava (Moreno-Arribas i col., 1996) observen que tots els caves tenen uns perfils peptídics semblants, encara que són produïts per varietats diferents (Macabeu, Xarel·lo, Parellada i Chardonnay). De qualsevol manera, detecten que als vins base es troben més pèptids que als mostos d'on provenen. Després de la segona fermentació, realitzada a l'ampolla, (prise de mousse) i la conservació del vi sobre els llevats durant 9 mesos, la quantitat de pèptids és inferior a la del vi base. Una prolongació del temps de conservació sobre els llevats representa un enriquiment en pèptids, que és màxim després de 12 a 15 mesos, moment en que comença a davallar les quantitats de pèptid. L'enriquiment en pèptids és motivat per l'alliberació i degradació simultània de components dels llevats per l'acció dels seus propis enzims (Charpentier, 1998).

#### **1.a.1.5 Nucleòtids**

Pocs estudis s'han realitzat sobre els continguts de nucleòtids en els mostos. Monteiro i Bisson, 1991a, mitjançant bioassaig, troben quantitats de 4 a 15 mg/l per l'adenina i de 4 a 8 mg/l per l'uracil.

Els nucleòtids poden servir com úniques fonts de nitrogen (Large, 1986), però les quantitats petites trobades al most, fan pensar que són assimilades per suplir les necessitats biosintètiques de nucleòtids dels llevats (Monteiro i Bisson, 1992).

Els nucleòtids reforcen les aromes al vi i formen aroma als vins escumosos (Ough i Amerine, 1988).

#### 1.a.1.6 Amines

Dins d'aquesta família de compostos podem incloure l'amoni tractat a l'apartat 1.a.1.2. Les amines que es troben en més quantitat al most són, la putrescina, espermina i espermidina, en concentracions per sota de 0,1 mg/l a 2,2 mg/l. El contingut d'amines al most pot tenir incidència en la producció d'urea per part dels llevats, ja que són intermediaris del metabolisme de l'arginina, precursor de la urea (Tabor i col., 1983). *S. cerevisiae* pot utilitzar les amines presents al most directament com a amines cel·lulars o degradar-les via àcid  $\alpha$ -aminobutíric i  $\beta$ -alanina a glutamat, utilitzat com font de nitrogen (Large, 1986).

Més varietat d'amines es troben al vins, algunes de les quals són biològicament actives. Cal afegir a les anomenades per al most, la cadaverina, etilamina, histamina isoamilamina, isopropilamina, metilamina, feniletilamina i tiramina (Cabanis i col, 1998), amb concentracions per sota de 0,1 mg/l a poques desenes. D'aquestes les fisiològicament importants són histamina, tiramina, feniletilamina, cadaverina, putrescina i isoamilamina, i és la putrescina la més abundant als vins. Així, es troben més en vins negres que en blancs, a excepció de la feniletilamina que es troba en més quantitat en vins blancs (Lehtonen, 1996).

Els efectes fisiològics sobre l'home són de certa rellevància en presència d'alcohol i acetaldehid. Els símptomes d'intoxicació típics són mals de cap, vòmits i diarrees (Lehtonen, 1996). Si bé l'histamina és la fisiològicament més activa, la seva concentració estaria correlacionada positivament amb les altres amines indesitjables (Bauza i col., 1995). La toxicitat de l'histamina es manifesta per via intravenosa a dosis febles (inferiors a 1 mg) en canvi per via oral dosis importants (50 mg i més) poden ser tolerades, degut a que el tub digestiu impedeix el pas cap el medi intern (Ingargiola, 1992). Aquest efecte barrera resultaria disminuït al vi per la presència d'alcohol, que afavoriria la difusió de l'histamina (Schopfer, 1984). Pocs estudis s'han realitzat per a corroborar aquest argument, o per combatir-ho. Sembla ser que els vins produïts en condicions d'higiene òptimes no contenen gairebé amines (Cerruti i Remondi, 1972), i

que l'interès de la valoració de l'histamina seria ser un indicador de les condicions higièniques de la vinificació (Battaglia i Frolich, 1978). Diferents països han posat un límit superior recomanable de quantitat d'histamina present al vi. Així, Suïssa 10 mg/l, França 8 mg/l, Bèlgica, entre 5 i 6 mg/l, i Alemanya 2 mg/l (Lehtonen, 1996).

### 1.a.1.7 Vitamines

Cal indicar que el terme vitamina seria més apropiat emprar-ho quan es parla d'organismes superiors, i a nivell microbiològic es parlar de factors de creixement, si bé les molècules coincideixen.

A la taula 6, es donen els valors extrems de concentració de vitamines nitrogenades en most, i vins, analitzats mitjançant tècnica microbiològica. En most i vi, també s'ha detectat, mesoinositol, amb concentracions per most i vins blancs de 380 a 170, i de 280 a 330 µg/l pels vins negres. Per l'àcid ascòrbic s'han detectat concentracions de 30-50 mg/l pels mostos i de 1 a 5 mg/l pels vins.

**Taula 6.** Vitamines en most i vi (µg/l). (Cabani i col., 1998).

<b>Vitamina</b>	<b>Most</b>	<b>Vins blancs</b>	<b>Vins negres</b>
Tiamina (B <sub>1</sub> )	160-450	2-58	103-245
Riboflavina (B <sub>2</sub> )	3-60	8-133	0,47-1,90
Pirodoxina (B <sub>6</sub> )	0,16-0,50	0,12-0,67	0,13-0,68
Cobalamina (B <sub>12</sub> )	0-0,20	0-0,16	0,04-0,10
Àcid pantotènic	0,5-1,4	0,55-1,20	0,13-0,69
Nicotinamida	0,68-2,6	0,44-1,33	0,79-1,70
Biotina	1,50-4,2	1,10-3,60	0,60-4,60
Àcid <i>p</i> -aminobenzoic	15-92	15-133	15-133
Colina	19-45	19-27	20-43
Àcid fòlic	0-1,80	0,40-4,50	0,40-4,50

Les vitamines es sintetitzen de manera important i s'acumulen a la baia els darrers dies de la fase de maduració del cicle vegetatiu de la vinya.

La FAL altera el contingut vitamínic del most. Els llevats (*S. cerevisiae*) poden sintetitzar les vitamines que manquin al medi, però a una velocitat molt lenta que provoca FALs endarrerides (Sablayrolles i col., 1996). La tiamina, que actua sobre el ritme de la fermentació, implicada en les reaccions de decarboxilació en la seva forma de pirofosfat, desapareix quasi al complet. El llevat pot consumir entre 600 a 800 µg/l, valors superiors als nivells trobats als mostos (Ribéreau-Gayon i col., 1998). En canvi, la riboflavina, constituent els coenzims de flavina (flavin mononucleòtid, FMN, i flavin adenina dinucleòtid, FAD), és produïda pels llevats, i és indispensable pel bacteris làctics. La nicotinamida, implicada en les reaccions redox formant part del coenzims (nicotinamida adenin dinucleòtid, NAD<sup>+</sup>, i nicotinamida adenin dinucleòtid fosfat, NADP<sup>+</sup>) es troba als vins negres en les mateixes quantitats que al most, en canvi als vins blancs representa el 60 % del contingut inicial. L'àcid pantotènic (la forma funcional del qual, coenzim A, intervé en les reaccions d'acetilació, estimula el creixement), la piridoxina (estimulant del creixement; la forma en fosfat de piridoxal actua com a cofactor de les reaccions de desaminació) i la biotina (cofactor de les reaccions catalitzades per carboxilases i intervé en la síntesi de la matèria nitrogenada a partir de l'amoni) són utilitzades pels llevats i retornades al medi, per tant els continguts als mostos i vins són gairebé idèntics. El mesoinositol passa gairebé desapercebut pels llevats. Àcid *p*-aminobenzoic, és indispensable pels llevats, però essencial juntament amb l'àcid fòlic (intervé en la síntesi de la pirimidina, purina i àcids nucleics) pels bacteris làctics ( Mareca, 1983; Ribéreau-Gayon, 1998; Walker, 1998; De Leenheer i col., 2000 ). S'ha comprovat que mancances d'àcid pantotènic comporten una acumulació d'àcid acètic per part del llevat (Ribéreau-Gayon, 1998).

### 1.a.2 Captació, metabolisme i productes

Descrita la fracció nitrogenada dels mostos, les cèl·lules dels llevats fermentatius han d'incorporar aquestes molècules a la maquinària metabòlica a fi de poder mantenir les funcions bàsiques cel·lulars, créixer i desenvolupar la FAL. Es poden distingir dues classes de compostos nitrogenats transportats dins del llevat. Un grup serveixen com a font de nitrogen, i els compostos que formen part són catabolitzats al entrar a la cèl·lula. Els sistemes de transport d'aquest compostos mantenen característiques i patrons de control comuns als enzims de degradació. L'altre grup, estaria format per compostos que són precursors i intermediaris biosintètics, i s'incorporen més o menys directament

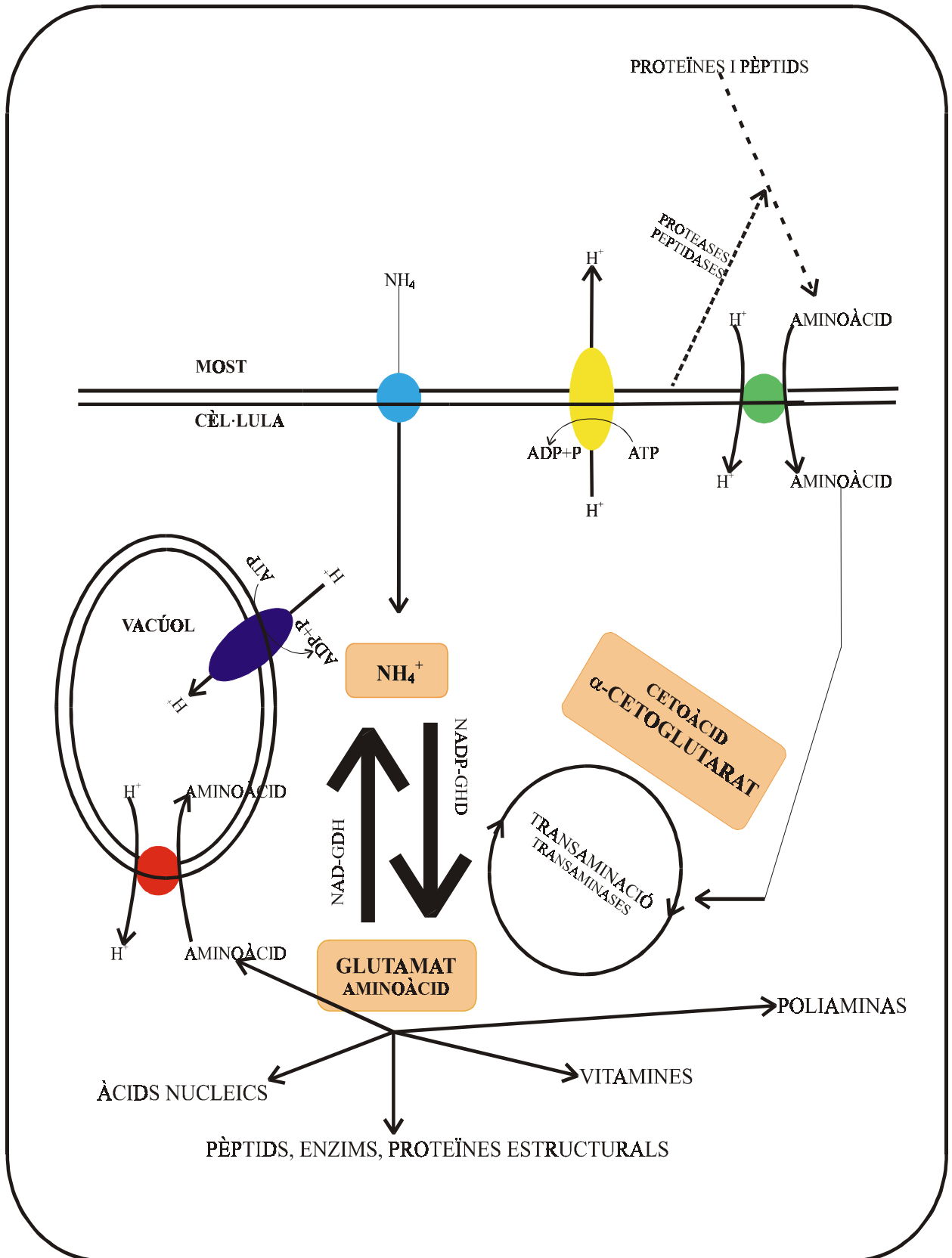
a macromolècules sense ser catabolitzat prèviament. En aquest cas els sistemes de transport tenen patrons de regulació similars als sistemes enzimàtics biosintètics.

En cas que un determinat compost es trobi en excés, el llevat el degradarà per a convertir-lo en un compost relacionat o obtenir nitrogen disponible per a la síntesi d'altres compostos nitrogenats. Hi han compostos nitrogenats que es consideren millors fonts nitrogenades que altres, i per tant seran assimilades primer. En termes metabòlics pel llevat, es considera una bona font nitrogenada aquella que sigui fàcilment convertible en una forma nitrogenada utilitzada biosintèticament, com podia ser l'amoni o glutamat, o poc costosa en termes energètics o de cofactors necessaris per a la mobilització del nitrogen (Bisson, 1991). L'ordre d'utilització dels components nitrogenats no és absolut, i varia en funció de les condicions de creixement, font nitrogenada i sòcia del llevat (Cooper, 1982). Existeixen uns mecanismes de regulació del metabolisme nitrogenat complexos que permeten al llevat adaptar-se a les condicions canviants del medi. (Cooper, 1982; Large, 1986).

La Figura 1, resumeix la captació i utilització dels components nitrogenats per part del llevat, en situació de disponibilitat d'aquests compostos al most. La càpsula, paret cel·lular i periplasma del llevat no representen cap barrera pel nitrogen assimilable (nitrogen amoniacal i nitrogen aminoacídic). En canvi, la membrana plasmàtica actua com a barrera selectiva (Walker, 1998). Aquestes molècules han de travessar-la mitjançant transportadors, proteïnes de membrana (permeases), que requereixen un potencial electroquímic creat per una ATPasa amb despesa d'ATP, el qual prové principalment dels sucres fermentats. El nitrogen amoniacal s'incorpora ràpidament a les rutes anabòliques mitjançant l'activitat de l'enzim glutamat deshidrogenasa NADP<sup>+</sup>-dependent. El sentit contrari de la reacció, catalitzada per l'activitat glutamat dehidrogenasa NAD-dependent, representa el punt final de les rutes catabòliques dels compostos nitrogenats. El sistema de transaminases permet la interconversió dels aminoàcids entrants a la cèl·lula en aminoàcids nous que serviran per la formació d'enzims cel·lulars, proteïnes estructurals, àcids nucleics, vitamines, formes de reserva i altres compostos nitrogenats, necessaris pel creixement del llevat. En medis pobres en fonts nitrogenades fàcilment assimilables, el llevat pot activar la seva maquinària enzimàtica extracel·lular per obtenir aminoàcids a partir de la degradació de proteïnes i



pèptids grans (Trioli i Paronetto, 1992). Aquestes activitats no han estat descrites per *S. cerevisiae* (Lagace i Bisson, 1990; Walker, 1998) .



**Figura 1.** Esquema general del metabolisme nitrogenat a *Saccharomyces cerevisiae* (situació de disponibilitat nitrogenada al medi).

### 1.a.2.1 Captació

Com ja s'ha indicat existeix un patró de consum per part del llevat dels diferents compostos nitrogenats que es troben al medi. Val la pena comparar els patrons de consum d'amoni i aminoàcids a la FAL amb dos substrats, most de cervesa i suc de raïm (most) (Taula 7).

**Taula 7.** Patrons de consum d'amoni i aminoàcids (Bisson, 1991).

<b>Classificació dels aminoàcids i amoni segons temps de consum al most de cervesa.</b>			
<b>Classe A</b>	<b>Classe B</b>	<b>Classe C</b>	<b>Classe D</b>
Aspartat	Histidina	Alanina	Prolina
Asparagina	Isoleucina	Amoni	
Arginina	Leucina	Glicina	
Glutamat	Metionina	Fenilalanina	
Glutamina	Valina	Triptofan	
Lisina	Tirosina		
Serina			
Treonina			
<b>Patró de consum d'aminoàcids i amoni al suc de raïm.</b>			
<b>Fase 1</b>	<b>Fase 2</b>	<b>Fase 3</b>	
Alanina	Amoni	Prolina	
Amoni	Alanina		
Arginina	Arginina		
Asparagina	Àcid $\gamma$ -aminobutíric		
Aspartat			
Cisteïna			
Glutamat			
Glutamina			
Glicina			
Histidina			
Isoleucina			
Leucina			
Lisina			
Metionina			
Fenilalanina			
Serina			
Treonina			
Triptofan			
Tirosina			
Valina			

En el primer cas, arran dels treballs de Jones i Pierce, 1964, els aminoàcids s'agrupen en quatre classes segons el temps en què desapareixen del medi. Classe A, correspon als aminoàcids consumits primerament. Classe B, es començarien a consumir

abans que s'esgotessin els de classe A. Classe C, no entrarien a la cèl·lula fins que no s'esgotin els de la classe A. Classe D, aminoàcids no consumits en les condicions de la FAL. En relació al patró de consum d'aminoàcids a la fermentació del suc de raïm, sembla que ja a les primeres hores, abans del començament de la fase exponencial, quasi bé tots els aminoàcids són transportables. Els aminoàcids minoritaris desapareixen en aquesta fase. Els majoritaris s'acaben de consumir a la fase 2. La prolina no és captada de manera significativa sota les condicions anaeròbiques de la FAL (Bisson, 1991).

L'ordre de consum d'aminoàcids s'explica per la implicació de permeases d'aminoàcids concrets. Hi hauria una permeasa pels aminoàcids de la classe A i B, de manera que els de la classe A competirien pel transport dels de la classe B, i una altra pels de la classe C (Walker, 1998). A més, en el transport dels aminoàcids s'ha descrit un fenomen anomenat transinhibició que consisteix en la competició de transport d'aminoàcids que no comparteixen la mateixa permeasa. Els sistemes de transport d'aquests aminoàcids estructural i metabòlicament no relacionats, tindrien un component comú com pot ser l'ATPasa de membrana que regula el flux de protons de la cèl·lula i amb una capacitat finita. Seria una inhibició a llarg termini (Cooper, 1982).

La diferència més important en el transport d'aminoàcids i amoni entre la fermentació de most de cervesa i suc de raïm, és el transport tardà de l'amoni de la primera. El transport d'amoni, al igual que el transport dels aminoàcids, es realitza per un simport amb un protó, la qual cosa requereix de l'extrussió d'aquest per l'ATPasa per mantenir el potencial de la membrana plasmàtica (Figura 1). En aquest cas, la cèl·lula obté un nitrogen per protó. El sucre fermentable al most de cervesa, és la maltosa, disacàrid que requereix igualment un transport actiu per simport amb un protó. Per tant, el transport d'aminoàcids i amoni competeix amb el transport de la maltosa (transinhibició), i el llevat prioritza el transport d'aminoàcids com l'arginina, que contenen quatre àtoms de nitrogen per protó cotransportat. En canvi, la glucosa i fructosa, els sucres majoritaris al suc de raïm, es transporten per difusió facilitada, sense implicació de cap moviment d'ions, i conseqüentment no hi ha interferència entre el sistema de transport de nitrogen amb el de carboni degut a les limitacions d'extrussió de protons per l'ATPasa. L'amoni és ràpidament utilitzat com a font de nitrogen preferent en la FAL de suc de raïm (Bisson, 1991; Walker, 1998).

Es pot considerar que el transport de compostos nitrogenats és el primer pas de les vies catabòliques o anabòliques. Encara més, Cooper, 1982, distingeix els sistemes de transports dels compostos nitrogenats en catabòlics i anabòlics (Taula 8). S'ha descrit i caracteritzat més d'una vintena de permeases implicades en la captació dels compostos nitrogenats per part del llevat (Taula 8).

**Taula 8.** Sistemes de transport de diferents compostos nitrogenats (Cooper, 1982; Cartwright i col., 1989; Henschke i Jiranek, 1993; Walker, 1998).

Compost	Sistema de Transport	Sensibilitat al amoni	$K_m(\mu\text{M})$	$V_{\max}$	C/A
Amoni	Permeasa de l'amoni ↑		200	50 <sup>a</sup>	C
	Permeasa de l'amoni ↓		2000	20 <sup>a</sup>	C
Urea	Actiu	Si	14		C
	Bidireccional/difusió facilitada		500		C
L-Alanina	GAP	Si	Elevada afinitat		C
Àcid $\gamma$ -aminobutíric	Permeasa de la prolina	Si	12		C
	Permeasa de la GABA	Si	100		
	GAP	Si			C
L-Arginina	Permeasa de l'arginina ↑ (Permeasa dels aminoàcids bàsics)	No	10	12	A
	Permeasa de l'arginina ↓	No	1000		
	GAP	Si	7,6	23	C
L-Asparagina	Permeasa de la glutamina	No	350	33 <sup>b</sup>	
	GAP	Si			C
L-Citrulina	GAP	Si	80		
Àcid L-Glutàmic	Permeasa d'aminoàcids dicarboxílics 1	No	20		A
	Permeasa d'aminoàcids dicarboxílics 2	Si	3300		A
	GAP	Si	1000	20 <sup>b</sup>	C
L-Glutamina	Permeasa de la glutamina 1	No			
	Permeasa de la glutamina 2	No			
	GAP	Si	40		C
L-Glicina	Permeasa de la glicina	No	400	2	
	GAP	Si	14000	2	C
L-Histidina	Permeasa de l'histidina 1	No	17	11	A
	Permeasa de l'histidina 2	No	4000	28	A
	GAP	Si	25	16	C
L-Leucina	Permeasa de la leucina ↑	No	30		A
	Permeasa de la leucina ↓		1000		A
	GAP	Si			C

<sup>a</sup>nmol/ mg proteïna·min; <sup>b</sup>nmol/g pes sec·min; <sup>c</sup>nmol/g pes sec·s. GAP: General amino acid permease. ↑ alta afinitat. ↓ baixa afinitat. C: Sistema de transport catabòlic. A: Sistema de transport anabòlic.

**Taula 8 (cont.).** Sistemes de transport de diferents compostos nitrogenats (Cooper,1982; Cartwright i col., 1989; Henschke i Jiranek, 1993; Walker, 1998).

Compost	Sistema de Transport	Sensibilitat al amoni	K <sub>m</sub> ( $\mu$ M)	V <sub>max</sub>	C/A
L-Lisina	Permeasa de la lisina	No	25	8,1	A
	Permeasa de l'arginina $\uparrow$ (Permeasa dels aminoàcids bàsics)	No	200	17	A
	GAP	Si	3,1		C
L-Metionina	Permeasa de la metionina $\uparrow$	No	12	13	A
	2 X Permeases de metionina $\downarrow$	No	600-800	13	A
	GAP	Si			C
Cisteïna	Permeasa específica				
S-adenosil-L-metionina	Permeasa de la S-adenosil-L-metionina		1,6-3,3		A
L-Prolina	Permeasa de prolina-iminoàcid	Si	31	40 <sup>c</sup>	C
	GAP	Si	>2500	160 <sup>c</sup>	C
L-Serina	Permeasa específica	Parcial	250		
	GAP	Si	500		C
L-Treonina	Permeasa específica	No			
	GAP	Si	210		C
L-Triptofan	Permeasa d'aromàtics	No	410	1,2 <sup>b</sup>	
	GAP	Si	10		C
L-Valina	Permeasa de la leucina $\uparrow\downarrow$	No			A
	GAP	Si			C
L-Isoleucina	Permeasa de la leucina $\uparrow\downarrow$	No			A
	GAP	Si			C
Dipèptids i tripèptids	Sistema general de transport de pèptid				
Adenina	Sistema de transport de l'adenina		0,12		
Citosina	Sistema de transport de l'adenina		0,12		
Guanina	Sistema de transport de la guanina		0,12		
Hipoxantina	Sistema de transport de l'adenina		0,12		
	Sistema de transport de la guanina		0,12		
Uracil	Sistema de transport de l'uracil $\uparrow$		12		
	Sistema de transport de l'uracil $\downarrow$		156		

<sup>a</sup>nmol/ mg proteïna·min; <sup>b</sup>nmol/g pes sec·min; <sup>c</sup>nmol/g pes sec·s. GAP: General amino acid permease.  $\uparrow$  alta afinitat.  $\downarrow$  baixa afinitat. C: Sistema de transport catabòlic. A: Sistema de transport anabòlic.

**Taula 8 (cont.).** Sistemes de transport de diferents compostos nitrogenats (Cooper,1982; Cartwright i col., 1989; Henschke i Jiranek, 1993; Walker, 1998).

Compost	Sistema de Transport	Sensibilitat al amoni	$K_m(\mu M)$	$V_{max}$	C/A
Biotina	Sistema de transport de la biotina		0,38		
Tiamina	Sistema de transport de la tiamina		0,18		
Riboflavina	Sistema de transport de la riboflavina		15		
Colina	Sistema de transport de la colina		560		

<sup>a</sup>nmol/ mg proteïna·min; <sup>b</sup>nmol/g pes sec·min; <sup>c</sup>nmol/g pes sec·s. GAP: General amino acid permease. ↑ alta afinitat. ↓ baixa afinitat. C: Sistema de transport catabòlic. A: Sistema de transport anabòlic.

L'amoni s'acumula gràcies a dos transportadors que requereixen energia i són inhibits de manera no-competitiva per diferents aminoàcids (Roon i col., 1975; Dubois i Grenson, 1979). El sistema de transport actiu de la urea és sensible a la repressió per nitrogen i dependent de l'exposició d'àcid oxalúric, inductor dels enzims de degradació de l'al·lantoïna.

Es poden distingir dues categories de transportadors d'aminoàcids (Taula 8). Una primera, inclou aquelles permeases específiques per un o pocs aminoàcids (cas de la permeasa de l'arginina que incorpora tots els aminoàcids bàsics), l'activitat de les quals no està pas limitada per la presència d'amoni. Aquestes permeases asseguren la ràpida captació dels aminoàcids en els primers estadis de la FAL, l'inici de la fase de creixement dels llevats. L'altra, consisteix en una permeasa general dels aminoàcids (GAP), la qual captaria el conjunt d'aminoàcids. La GAP està inhibida i reprimida per l'amoni, i per tant només és activa quan el most ja no conté amoni, es a dir ja avançada la fermentació. Sembla ser que la GAP funcionaria com un recuperador de nitrogen, quan les fonts fàcilment assimilables s'han esgotat (Woodward i Cirillo, 1977). Cal indicar que la GAP seria la principal ruta d'entrada per a un seguit d'aminoàcids: glicina, alanina, fenilalanina, triptofan i tirosina (Greasham i Moat, 1973; Cooper, 1982).

Dues reserves d'aminoàcids es localitzen a la cèl·lula de llevat, una al citoplasma, format pels aminoàcids àcids, i una altra al vacúol on es troben aminoàcids neutres i bàsics, sobretot en forma d'arginina. Això implica l'existència de sistemes de transport al tonoplast que permetin el trànsit d'aminoàcids del citosol al vacúol i a

l'inrevés. S'ha descrit un sistema de transport per a l'arginina i aminoàcids bàsics que consisteix en un antiport amb  $H^+$  (Cooper, 1982).

Hi ha pocs estudis sobre l'entrada de pèptids a la cèl·lula motivat per la escassetat de pèptids comercials marcats radioactivament. Està descrit un sistema de transport per *S. cerevisiae*, sistema general de transport de pèptids, el qual transportaria di- i tripèptids però no pèptids més grans (Marder i col., 1977; Moneton i col., 1986), encara que aquesta limitació seria dependent de soca, ja que Naider i col., 1974, demostren la viabilitat de soques auxotrofes per la metionina al suplementar al medi (met)<sub>5</sub>. Els aminoàcids no competeixen per aquest sistema (Becker i Naider, 1977). La velocitat d'incorporació d'un pèptid és dependent de la composició d'aminoàcids i la seqüència del pèptid en qüestió (Becker i Naider, 1980).

Per a les vitamines no nitrogenades s'ha ressenyat l'existència d'un sistema de transport actiu per a l'inositol amb una  $K_m$  de 0,1 mM (Nikawa i col., 1982).

L'activitat dels sistemes de transports estan regulats per diferents mecanismes els quals varien en la seva especificitat, temps de resposta i nivell d'influència, ja sigui a nivell de transcripció, traducció, d'un precursor o proteïna activa

Es pot considerar una bona estratègia metabòlica, el simport amb protó dels compostos nitrogenats, si es pensa que almenys la diferència de pH entre el most i el citoplasma del llevat és de tres unitats. Es a dir, l'entrada del protó molt afavorida pel gradient estaria associada energèticament amb la captació del component nitrogenat en contra del seu gradient (Bisson, 1991). Per una altra banda, diferents autors indiquen que els pHs òptims d'activitat de les permeases estan per sobre dels pHs dels mostos (Dubois i Genson, 1979; Gregory i col., 1982; Ballarin-Denti i col., 1984; Kotyk i Dvoráková, 1990; McKelvey i col., 1990). Monteiro i Bisson, 1991b, troben una reducció del 50 % de la biomassa a pH 3,25 quan es compara amb el creixement obtingut a pH 4, en medis amb amoni com única font de nitrogen. No observen aquesta reducció amb altres fonts nitrogenades.

A mesura que progressa la FAL augmenta el contingut d'etanol al medi, producte clarament negatiu per a la captació. L'etanol canvia les propietats de la

membrana plasmàtica dels llevats, incrementant la permeabilitat pels protons, i per tant es dissipa la força motriu de protons a través de la membrana, necessària per a la captació dels compostos nitrogenats (Bisson, 1991; Henschke i Jiranek, 1993). L'increment de la permeabilitat de la membrana afavoriria la fuga dels compostos nitrogenats ja acumulats dins de la cèl·lula (Henschke i Jiranek, 1993). Així mateix, l'etanol té un efecte inhibitori sobre l'ATPasa extrusionadora de protons de la membrana (van Uden, 1989; Fuguet, 2000), sobre l'implantació dels transportadors a la membrana (Ferrerias i col., 1989), i sobre l'activitat de la GAP (Iglesias i col., 1990). Podriem considerar que el llevat segueix una estratègia que li permet evadir els efectes negatius de l'etanol sobre la captació dels compostos nitrogenats. La captació es fa en les primeres fases de la FAL, moment en que existeix una bona disponibilitat energètica i un baix contingut d'etanol en el medi. Els compostos nitrogenats s'emmagatzemen al vacúol, i per tant es mantenen baixos la reserva d'aquests compostos al citoplasma, afavorint la captació al no actuar els mecanismes regulatoris. Avançada la FAL, les necessitats en nitrogen les supliria la reserva del vacúol, quan la captació ja no és viable degut als nivells d'etanol del medi (Bisson, 1991).

La temperatura de desenvolupament de la FAL afecta a la velocitat de captació, en el sentit de disminució a més baixes temperatures. Sembla que no tots els transportadors es veurien influenciats per la temperatura. Així, l'acumulació d'amoni seria bastant independent de la temperatura (Henschke i Jiranek, 1993).

La pressió de CO<sub>2</sub> redueix la velocitat i prolonga la captació d'aminoàcids com indiquen els treballs amb most de cervesa (Kumada i col., 1975) i amb most de raïm (Pekur i col., 1981).

La utilització de la prolina per part del llevat és dependent del grau d'aireació del medi (Pekur i col., 1981; Ingledew i col., 1987). Durant la FAL, en el procés de vinificació, es tendeix a minimitzar l'aireació, i per tant la captació de prolina es gairebé nul·la. En aquestes condicions anaeròbiques s'observa, a més, un alliberament de prolina i en ocasions d'urea al medi (Ough i col., 1991), originats segurament pel catabolisme de l'arginina (Brandriss i Magasanik, 1980; Monteiro i Bisson, 1991a).



Els sistemes de transport es veuen afectats per la fluïdesa de la membrana plasmàtica, la qual és dependent principalment de la composició dels lípids estructurals, com són l'esterol i els àcids grassos insaturats (Henschke i Jiranel, 1993). El llevat requereix O<sub>2</sub> per sintetitzar aquests lípids, per tant el grau d'aïració afectaria també a la captació en aquest altre sentit.

Els treballs de Jiranek i col. (1991, 1995) i Ough i col. (1991) indiquen que l'assimilació dels components nitrogenats del medi és dependent de la soca de llevat. No aprecien diferències importants de velocitat de fermentació entre les soques en medis amb nitrogen assimilables adequats, però sí quan el nitrogen és limitat. Capacitats dissemblants de les soques en la eficiència d'assimilació i aprofitament dels recursos nitrogenats explicarien això.

Per una altra banda, el paper dels llevats nadius sobre l'assimilació dels compostos nitrogenats per part de la soca de *S. cerevisiae* inoculada és controvertida. En un principi, els primers poden competir amb la soca inoculada pels recursos nitrogenats, i per tant limita el creixement de la soca inoculada. En un sentit positiu, alguns llevats nadius no-*Saccharomyces*, com ja s'ha comentat, tenen capacitats proteolítiques que rendeixen formes nitrogenades assimilables per la soca inoculada (Lagace i Bisson, 1990). La mort de les poblacions de llevats nadius i l'autolisi en les fases inicials de fermentacions on la soca inoculada s'imposa perfectament poden contribuir a aportacions d'aminoàcids i altres compostos nitrogenats al medi (Fleet, 1990; Stuckey i col., 1991).

### 1.a.2.2 Metabolisme

L'amoni i l'àcid L-glutamat són els compostos centrals de tot el metabolisme nitrogenat dels llevats. Un compost nitrogenat es pot utilitzar com a única font nitrogenada per mantenir el creixement del llevat si permet la formació d'amoni i  $\alpha$ -cetoglutarat (Large, 1986).

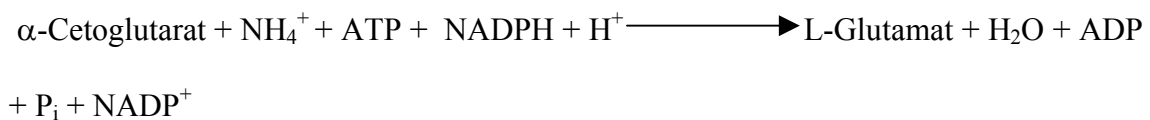
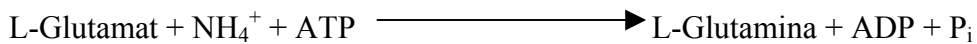
Dues reaccions enzimàtiques permeten la interconversió d'aquest compostos:

#### **NAD-Dependent Glutamat- Dehidrogenasa (NAD-GDH)**

Reacció 1: L-Glutamat + NAD  $\longrightarrow$   $\alpha$ -Cetoglutarat + NADH + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

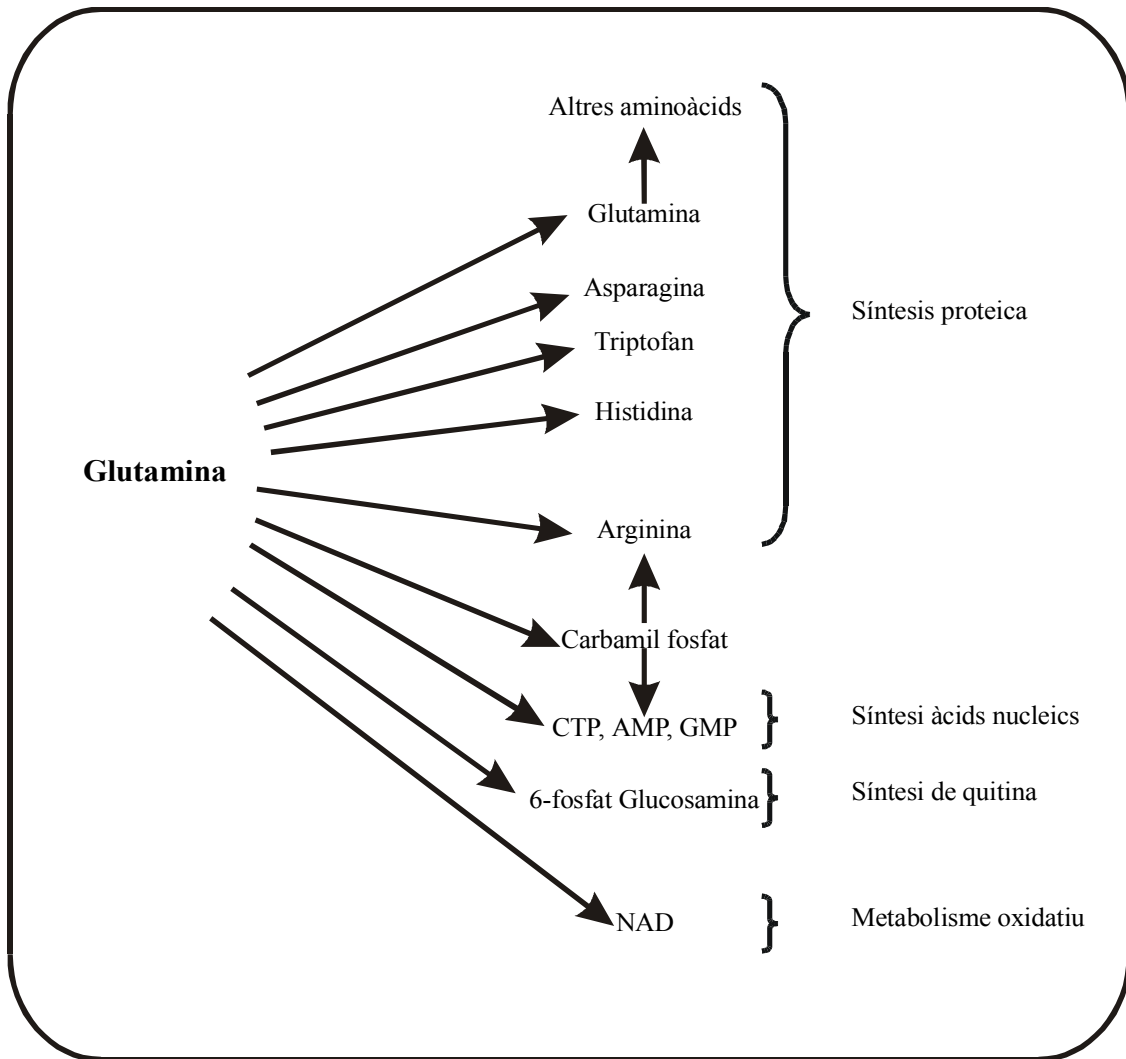
**NADP-Dependent Glutamat Dehidrogenasa (NADP-GDH)**

La reacció 1 representa el punt final de la degradació dels compostos nitrogenats, i la reacció 2, l'inici de les vies anabòliques, com ja s'ha comentat prèviament. Així i tot, si la disponibilitat d'amoni és reduïda, per sota de 0,02 mg/l, llavors altres enzims intervenen de manera més significativa. Aquest són **Glutamina Sintetasa** i **Glutamat Sintasa (Glutamina Amida: 2-Oxoglutarat Aminotransferasa o GOGAT)**, les reaccions dels quals són respectivament les següents:



La glutamina sintetasa té una rellevància en el sentit que catalitza el primer pas de les vies encarregades de la síntesi de moltes macromolècules de vital importància per a la cèl·lula (Figura 2).

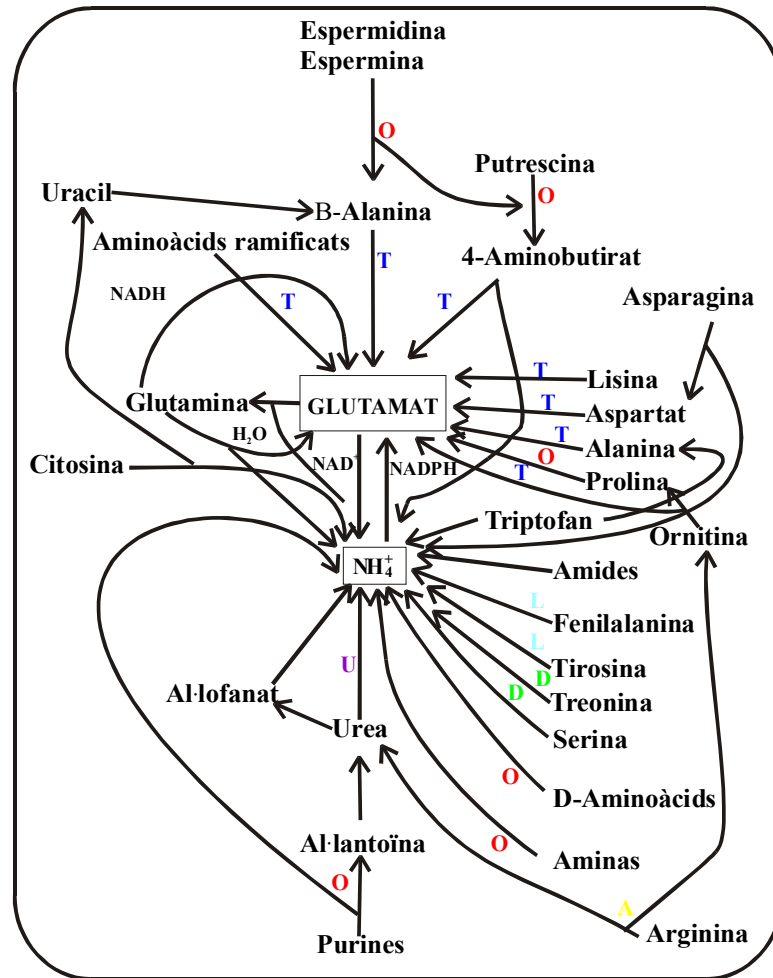
No es té una idea clara de la funció de l'enzim GOGAT, si pensem que la reacció que catalitza és menys favorable energèticament per a l'assimilació d'amoni si la comparem amb la reacció portada per GDH, degut a la despesa d'ATP del primer procés. Per una altra banda, quan la glutamina sintetasa s'acobla amb la GOGAT, aquesta via de la glutamina, no només representa una via alternativa a la reacció de l'enzim GDH, el qual té una  $K_m$  major per l'amoni que els primers, però també una manera eficient d'assimilació d'amoni en aminoàcids. A banda de la funció de recuperador de nitrogen que s'associa a la via de la glutamina, sembla que intervindria en importants fenòmens fisiològics de la cèl·lula de llevat (Figura 2) com el manteniment dels intermediaris del cicle de l'àcid cítric, creixement i morfologia (Lacerda i col., 1990).



**Figura 2.** Funció central de la glutamina en el metabolisme nitrogenat i carbonat (modificat Walker, 1998).

El glutamat serveix mitjançant reaccions de transaminació de donador de grups aminats per a la biosíntesi d'aminoàcids. L'esquelet carbonat dels aminoàcids prové d'intermediaris de la glicolisi (piruvat, 3-fosfoglicerat, fosfoenolpiruvat), del cicle de l'àcid cítric ( $\alpha$ -cetoglutarat, oxalacetat) o de la via de les pentoses fosfat (5-fosfat ribosa, 4-fosfat-eritrosa).

La figura 3 resumeix les vies catabòliques i les interrelacions entre productes de les diferents fonts nitrogenades dels llevats en general.

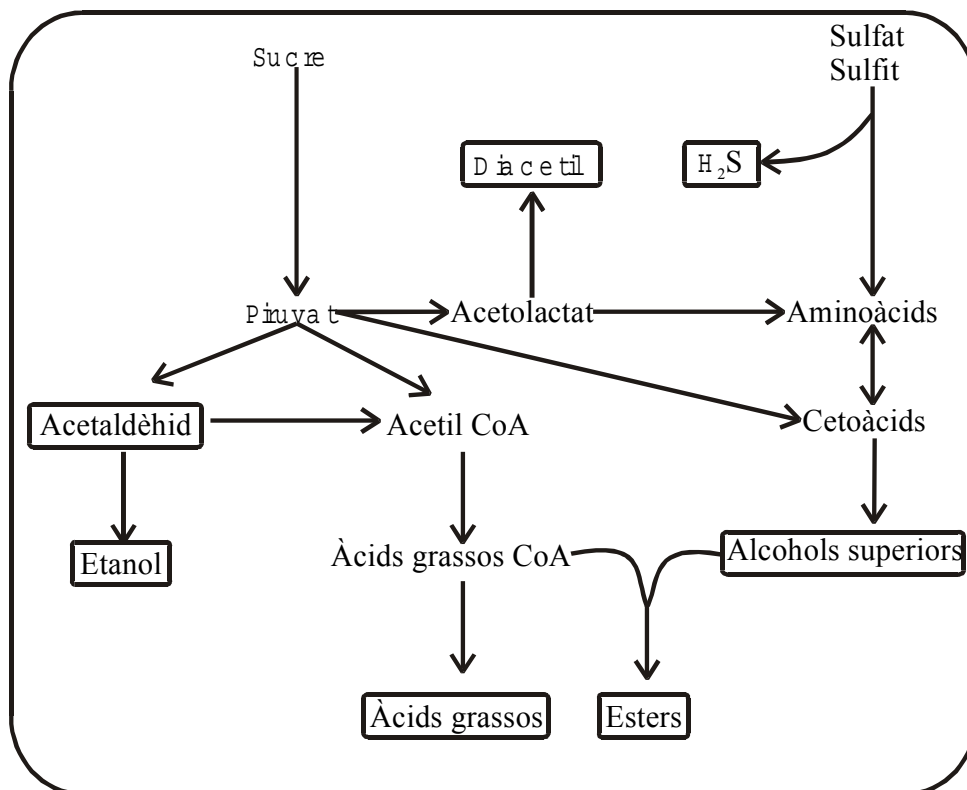


**Figura 3.** Productes catabòlics dels components nitrogenats i les seves interrelacions (modificat, Large, 1986). **A** indica arginasa, **D** deshidratasa, **L** amoni-liasa, **O** oxidasa, **T** aminotransferasa i **U** ureasa.

### 1.a.2.3 Productes

El contingut en compostos nitrogenats del most i la metabolització per part del llevat influeixen i contribueixen a la formació de productes amb una rellevància cabdal a la qualitat final del vi, tant des del punt de vista aromàtic com sanitari. Així doncs, els compostos nitrogenats afecten a les propietats sensorials del vi a l'estimular el creixement dels llevats i l'activitat de la FAL, i per tant, augmentant la formació de metabòlits, i més directament en la provisió de precursors metabòlics o regulant la formació d'aquests. En relació a aquest darrer sentit, intervenen en la formació d'alcohols superiors i èsters (Figura 4), que juntament amb els àcids orgànics i, en menys mesura, els aldèhids, formen el "bouquet de fermentació" (Rapp i Versini, 1991). Per una altra banda, la formació de sulfur d'hidrogen també estaria regulada per la disponibilitat de nitrogen (Henschke i Jiranek, 1991). El sulfur d'hidrogen i altres compostos de sofre reduïts, com ara els sulfurs orgànics i els tiols (mecaptà) intervenen de manera negativa en l'aroma.

Respecte a l'aspecte sanitari, s'ha d'indicar que el contingut en nitrogen influeix també en la formació de carbamat d'etil (uretà), possible cancerigen humà (Ough, 1976).

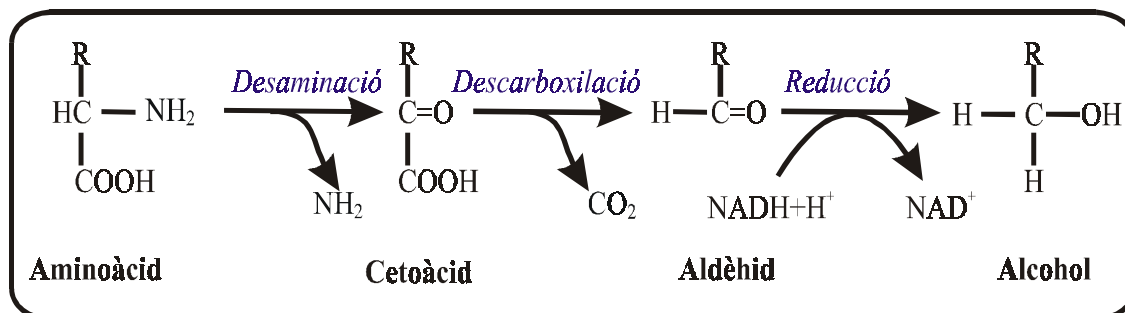


**Figura 4.** Origen dels compostos que formen part de l'aroma del vi a partir del metabolisme del sucre, aminoàcids i sofre per part dels llevats (modificat, Henschke i Jiranek, 1993). □ Compostos que contribueixen en l'aroma del vi.

#### 1.a.2.3.1 Alcohols superiors

Els alcohols que es produeixen a la FAL amb un nombre major d'àtoms de carboni que l'etanol, es denominen alcohols superiors. Els alcohols superiors que són produïts en més quantitat a llarg de la FAL pels llevats són els alcohols alifàtics n-propanol, 2-metil-1-propanol (isobutanol), 2-metil-1-butanol (alcohol amílic actiu), 3-metil-1-butanol (alcohol isoamílic), i els alcohols aromàtics hexanol i 2-feniletanol (Henschke i Jiranek, 1993). La formació transcorre paral·lelament a la formació de l'etanol, a excepció del 1-propanol, el qual augmenta sobre mitja fermentació (Bell i col, 1979). L'origen d'aquests compostos volàtils és tant de la metabolització del sucres com dels aminoàcids, sobretot dels aminoàcids ramificats, leucina, isoleucina i valina. La contribució d'aquest segon mecanisme de formació d'alcohol superior sobre total és menor al de la degradació de sucres (Rapp i Versini, 1997).

Els cetoàcids formats a partir de la desaminació (o transaminació) dels aminoàcids poden ser excretats directament o excretats després de la descarboxilació en aldèhid i reducció en alcohol. Aquest mecanisme rep el nom de reaccions d'Ehrlich (Figura 5).



**Figura 5.** Reaccions d'Ehrlich, que dona alcohols superiors a partir d'aminoàcids.

La darrera reacció tindria un paper important en el metabolisme de la FAL, ja que actuaria com a sincronitzador fi de la reoxidació de NADH (van Dijken i Scheffers, 1986; Quain, 1988).

Es pot assignar un possible precursor aminoacídic a molts alcohols superiors (Taula 9), però altres, com el 1-butanol, no tenen precursor possible en forma d'aminoàcid, i forçosament provenen dels sucres. Altres alcohols, encara tenint un possible precursor aminoacídic, provenen majoritàriament del sucres. Seria el cas del 3-metil-1-butanol (alcohol isoamílic) i 1-propanol (Ribéreau-Gayon i col., 1998).

Pel que s'ha comentat anteriorment i estudis metabòlics amb precursors aminoacídics marcats radioactivament (Chen, 1978) no es demostra una relació directa entre el possible precursor i l'alcohol superior corresponent.

A excepció del feniletanol, l'olor del qual recorda a la rosa, els altres alcohols superiors del vi solen ser més aviat desagradables al nas. Donen olors a dissolvents (alcohol isoamílic) o col cuita (metionol). Les quantitats trobades als vins estan per sota dels llindars de percepció (300 mg/l), i intervenen per tant en la intensitat i complexitat aromàtica global del vi (Ribéreau-Gayon, 1998). Així doncs, la pràctica enològica ha d'estar encaminada a limitar la seva formació.

**Taula 9.** Principals alcohols superiors que es troben al vi, i els possibles precursors (aminoàcids) i intermediaris (Henschke i Jiranek, 1993; Cabanis i col. 1998; Ribéreau-Gayon, 1998).

<b>Aminoàcid</b>	<b>Cetoàcid</b>	<b>Aldèhid</b>	<b>Alcohol</b>	<b>Contingut en vi (mg/l)</b>
Àcid 2-amino- butíric	Àcid cetobutíric	Propionaldèhid	1-Propanol	10-50
-	-	-	1-Butanol	1-10
<b>Valina</b>	Àcid 2-cetoisovalèric	Isobutialdèhid	2-metil-1-propanol	50-150
<b>Isoleucina</b>	Àcid 2-ceto-3-metil- valèric	2-metilbutir- aldèhid	2-metil-1-butanol	30-100
<b>Leucina</b>	Àcid 2-cetoisocaproic	Isovaleraldèhid	3-metil-1-butanol	80-300
-	-	Hexanal	1-Hexanol	0,3-12
<b>Fenilalanina</b>	Àcid 3-fenil-2-ceto- propioníc	-	Feniletanol	10-100
<b>Tirosina</b>	Àcid 3-(4-hidroxyfenil)-2- cetopropioníc	-	Tirosol	20-50
<b>Metionina</b>	-	-	Metionol	0-5
<b>Triptofan</b>	-	-	Triptofol	0-1
<b>Àcid glutàmic</b>	-	-	$\gamma$ -butirolactona	0-5

Les elevades temperatures de fermentació (du Plessis, 1983; Castellari i col., 1995), pH elevat i oxigenació (Ribéreau-Gayon i col., 1998) són condicions que fan augmentar les quantitats d'alcohols superiors, no evitables en vinificació en negre, però controlables en vinificació en blanc. La clarificació dels mostos per desfangament dels mostos dona vins amb menor quantitat en alcohols superiors (du Plessis, 1983), i si aquesta es realitza per filtració, la producció d'alcohols superiors és independent a la temperatura de fermentació (Houtman i du Plessis, 1981).

Molts treballs indiquen la influència de la composició en compostos nitrogenats del most sobre els nivells d'alcohols superiors en el vi (Rapp i Versini, 1997). En general les mancances del most en nitrogen assimilable, porten a una formació incrementada en alcohols superiors total. Sembla ser, que sota aquestes condicions, el

llevat al mobilitzar el nitrogen disponible per transaminació, excretaria en forma d'alcohol superior l'esquelet carbonat inutilitzat (Ribéreau-Gayon i col., 1998).

Per una altra banda, les quantitats de 1-propanol tenen una correlació lineal positiva amb la quantitat total de FAN, com demostra Seeber i col, 1991, a l'estudiar la fermentació de mostos de Chardonnay en varies anyades consecutives. La influència dels compostos nitrogenats en l'augment de 1-propanol en els vins queda corroborada per les addicions de fosfat de diamoni en el most a fermentar (Äyräpää, 1971; Margheri i col, 1986); per la fertilització nitrogenada dels vinyers (Ough i Bell, 1980; Webster i col., 1993); per la menor quantitat d'aquest alcohol trobat en vins de varietats anomenades mediterrànies (Garnatxa, Cinsault, i Carinyena) comparades amb varietats a major contingut d'aminoàcids com són les varietats Gamay i Pinot Noir (Bidan, 1975); per la verema mecànica que fa augmentar el contingut d'aminoàcids comparant amb la verema manual (Cantagrel, i col. 1982). Cal recordar, que l'origen del 1-propanol no és per mecanisme Ehrlich, sinó que prové del metabolisme de sucres, per condensació del piruvat i acetil CoA, i per tant aquesta correlació s'explicaria per efectes indirectes, com l'estimulació del creixement i del metabolisme dels llevats.

Per contra, les quantitats de 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol i 2-feniletanol al vi es correlacionen de manera negativa amb les quantitats de FAN i els corresponents precursors aminoacídics (Ough i Bell, 1980; Cantagrel i col., 1982; Margheri i col, 1986; Seeber i col., 1991).

El contingut en 2-metil-1-propanol del vi no està correlacionat ni amb les quantitats en most del seu precursor aminoacídics (valina) ni amb el contingut total d'aminoàcids (Ough i Bell, 1980; Cantagrel i col., 1982; Seeber i col., 1991).

Varis estudis indiquen que tant l'espècie com la soca tenen important implicació en la producció d'alcohols superiors, i la producció limitada (a excepció del feniletanol) és un criteri de selecció. D'aquesta manera, Guymon i col., 1961 descriuen a l'espècie de llevat *Hansenula anomala* com una productora de gran quantitat d'alcohols superiors, però té limitat el seu creixement en condicions de la FAL. Masneuf i col. (1996) demostren que les soques de *Saccharomyces bayanus* produeixen més quantitats



de feniletanol que les soques de *S. cerevisiae*. A més, entre les soques de *S. cerevisiae* existeixen diferències en la producció.

#### 1.a.2.3.2 Èsters

Els llevats al llarg de la FAL produeixen, gràcies a les activitats esterases, varis mg/l d'èsters, dels quals els més importants es poden agrupar segons el seu origen, en acetats d'alcohols superiors i èsters d'àcids grassos de cadena mitjana. Així mateix, recentment s'han identificat al vi, èsters etílics d'aminoàcids, la implicació dels quals en l'aroma està encara en estudi (Herraiz i Ough, 1993). Els èsters d'alcohol superior amb més rellevància al vi són l'acetat d'isoamil, amb olor de banana, i l'acetat de feniletil, amb olor a rosa (Ribéreau-Gayon i col., 1998).

Per la seva banda, els èsters d'àcids grassos de cadena mitjana no tenen lligams amb el metabolisme nitrogenat. Els llevats sintetitzen els acetats de la mateixa manera que sintetitzen els àcids grassos; l'hidròlisi amb aigua dels derivats acetylCoA dona els àcids grassos, i de la mateixa manera, l'hidròlisi amb etanol dona els acetats (Rapp i Versini, 1997). D'aquesta manera, la formació d'aquests èsters està relacionada amb la disponibilitat d'alcohol i la demanda d'acetyl-CoA del llevat per a la síntesi d'àcids grassos (Nordström, 1964; Nykänen, 1986). Aquests èsters són més interessants que els anteriors en el pla aromàtic. Així, l'hexanoat d'etil denota olors florals i fruitades que evoquen a la poma verda; el decanoat d'etil té una olor més sabonosa.

La Taula 10 mostra una relació d'èsters volàtils que es poden trobar en vins negres i blancs. La volatilitat d'aquests depèn de la grandària molecular, per la qual cosa segons la temperatura de la FAL predominaran més uns que altres. Així, les baixes temperatures de la FAL (10 °C) produeixen i retenen els èsters que aporten notes fruitades (acetat d'isoamil, acetat d'isobutil, butirat d'etil, acetat d'hexil). A més temperatura, de 15 a 20 °C, es produeixen i retenen els èsters molt olorosos, octanoat d'etil i acetat 2-feniletil (Killian i Ough, 1979). Per tant, els vins produïts a baixes temperatures es caracteritzen per les notes fruitades i sabonoses associades a alguns èsters (Rapp i Versini, 1997).

Quan millor és el desfangament en el procés de vinificació en blanc, més quantitats d'èsters es troben en el vi (Ribéreau-Gayon i col. 1998).

**Taula 10.** Continguts de èsters volàtils en vins negres i blancs (Cabanis i col., 1998).

Èster	Vins Negres		Vins Blancs	
	Mínim	Màxim	Mínim	Màxim
Formiat d'etil	0,2	2,8	0,01	2,2
Acetat de metil	0,05	0,13	ND	0,1
Acetat d'etil	41	180	26	160
Lactat d'etil	10	25	3	15
Propionat d'etil	0,05	0,25	ND	4
Metil –2-propionat d'etil	0,03	1	0,02	0,8
Acetat de metil- 2- propil	0,01	0,9	0,01	0,8
Acetat d'isoamil	0,2	1	1,1	6
Butirat d'etil	0,01	3	0,02	3
Metil –2-butirat d'etil	ND	0,9	ND	0,32
Acetat de fenil-2-etil	0,01	2,1	0,1	4,5
Metil-3-butirat d'etil	ND	0,7	ND	0,7
Acetat de metil- 3- butil	0,03	8	0,03	8
Hexanoat d'etil	0,07	1,1	0,09	1,5
Octonat d'etil	0,5	3,4	0,6	4
Decanoat d'etil	0,3	1,8	0,36	2,5
Dodecanoat d'etil	0,1	5	0,05	0,7
Acetat d'hexil	0,1	0,6	0,07	0,5
Acetat de fenil-2-etil	0,01	2,1	0,1	4,5

ND: No detectat.

La incidència del contingut nitrogenat del most sobre els nivells d'èsters és diferent segons l'èster en qüestió, com passava amb els alcohols superiors. Els dos acetats d'alcohols superiors, acetat d'isoamil i acetat d'hexil, es correlacionen positivament mentres que l'acetat feniletíl es correlaciona negativament amb el contingut de nitrogen en el most (Ough i Lee, 1981, Webster i col, 1993; Guitart i col., 1999). Per la seva banda, els èsters d'àcids grassos es correlacionen positivament amb el

contingut de nitrogen del most , i en concret l'hexanoat d'etil, octanoat d'etil i decanoat d'etil (Bell i col., 1979; Ough i El, 1981, Webster i col, 1993; Guitart i col., 1999). Així doncs, els mostos rics en nitrogen assimilable donen vins amb més aromes fruitades.

S'aprecien diferències de producció d'èsters en funció de les espècies i soques de llevats (Soles i col, 1982; Ribéreau-Gayon, 1998; Lema i García, 2000).

#### **1.a.2.3.3 Sulfur d'hidrogen**

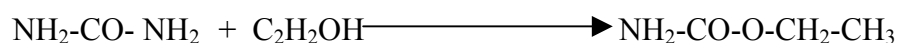
El sulfur d'hidrogen ( $H_2S$ ) i, en general, els compostos sulfurats derivats, poden contribuir de manera significativa a l'aroma del vi, degut a les seves reactivitats i als llindars baixos de percepció (Schutte, 1975; Peppard, 1988). El  $H_2S$  té una aroma desagradable que recorda a ous podrits, quan les quantitats al vi superen el llindar de percepció, que és de 10 a 100  $\mu g/l$  (Lambrechts i Pretorius, 2000). En vins joves, la producció de 20 a 30  $\mu g/l$  de  $H_2S$  pot contribuir de manera favorable a l'aroma de llevat (Dittrich i Sataudenmayer, 1970). Estudis recents indiquen que grans quantitats de  $H_2S$  poden ser la causa de la producció d'altres compostos sulfurats volàtils no desitjats (Rauhut i Kürbel, 1994 a,b). Unes de les possibles fonts de  $H_2S$  és la reducció del sofre elemental per part dels llevats, residu de les aplicacions fitosanitàries dels vinyers (Schütz i Kunkee, 1977).

El llevat pot formar  $H_2S$  a partir del sofre elemental, sulfat, sulfit i cisteïna (Rauhut, 1993). Aquest compost és producte de la Seqüència de Reducció del Sulfat (SRS), en la qual, l' $H_2S$  és un intermediari de la biosíntesi de tots els compostos que contenen sofre, inclosos els aminoàcids, metionina i cisteïna, i el donador de grups metil, S-adenosilmetionina. D'aquesta manera la seva producció en el vi està relacionada tant amb el metabolisme del sofre com del nitrogen.

Les altes temperatures de fermentació, pHs alts i mostos poc desfangats donen lloc a vins a més continguts en  $H_2S$  (Rauhut, 1993). Així mateix, les deficiències en pirodoxina (vitamina  $B_6$ ) i àcid pantotènic, els quals són necessaris per a la síntesi de metionina i cisteïna , respectivament, també provoquen grans produccions de  $H_2S$ . La soca de llevat també té una incidència cabdal en la formació d' $H_2S$ , fins al punt que és un criteri de selecció (Lambrechts i Pretorius, 2000).

#### 1.a.2.3.4 Carbamat d'etil

Degut a que el carbamat d'etil és considerat com un possible cancerigen humà que es produeix en molts aliments i begudes fermentades per la pròpia activitat metabòlica dels microorganismes (Ough, 1976), diferents recerques van encaminades a estudiar l'origen i factors que afavoreixen la seva producció en el vi, a fi de reduir al màxim les seves quantitats. Si bé, els vins joves no contenen nivells de carbamat d'etil detectables ( $< 10 \mu\text{g/l}$ ), els precursors necessaris presents poden generar aquest compost quan el vi envelleix o s'emmagatzema a altes temperatures (Ough i col., 1988). Les begudes víniques amb gran quantitat d'alcohol, com són els Jerez, vins de postres i destil·lats, contenen més carbamat d'etil que els vins joves. L'aparició d'aquest compost en aquestes begudes, està motivat per la reactivitat dels compostos carbamils, com poden ser la urea o la citrulina (en menys mesura), amb l'etanol en condicions àcides (Ough i col., 1988):



En el passat, un origen obvi de la urea, eren els compostos que contenen aquesta font nitrogenada pels llevats utilitzats per a afavorir la fermentació (Ingledeu i col., 1987), i l'abús de fertilitzants que contenen urea en els vinyers (Lambrechts i Pretorius, 2000). L'origen principal d'urea a llarg de la FAL és la ruptura enzimàtica de l'arginina per l'arginasa, que allibera urea i ornitina (Monterio i col. 1989). La urea pot ser finalment degradada en amoni i  $\text{CO}_2$  per la urea carboxilasa i al·lofanat hidrolasa (Davis, 1986).

Una solució viable per a l'eliminació de la urea als vins, proposada per Ough i Trioli, 1988, i aprovada per l'OIV (Pretorius, 2000), és l'ús de la ureasa àcida.

### 1.a.3 Adjuvants nitrogenats

La indústria vitivinícola recorre a diferents additius per corregir deficiències nutritives de mostos, a fi d'evitar problemes en aturades o endarreriments de les fermentacions alcohòliques, i aconseguir una qualitat òptima del vi. Així, es poden distingir tres categories de deficiències nutritives que tenen una incidència sobre la FAL: nitrogen assimilable, factors de creixement (vitamines) i factors de supervivència

(esterols, àcids grassos insaturats i O<sub>2</sub>) . Aquests darrers factors no es tracten directament en aquesta tesi.

Com ja s'ha indicat, el mínim nitrogen assimilable necessari pels llevats per a que portin a terme la FAL es situa entre 140 i 150 mg/l. Trioli, 1997, agrupa els mostos italians en rangs de quantitats de nitrogen assimilable relacionat amb la fermentabilitat i qualitat del vi resultant. Així, els mostos per sota de 150 mg de nitrogen disponible per litre, tenen compromesa tant la cinètica de fermentació com la qualitat del vi; per a nivells entre 150 i 250 mg/l , només la qualitat del vi pot ressentir-se; i finalment, valors per sobre de 250 mg/l, es situarien en els nivells de seguretat. Les addicions tenen l'objecte de situar les quantitats de nitrogen disponible dels mostos deficitaris dins d'aquests nivells de seguretat, respectant el màxim imposat per la legislació.

Diferents fonts nitrogenades són emprades per suplementar mostos deficitaris, com les sals amoniacals (fosfat de diamoni, sulfat d'amoni), urea, extracte de llevats, i preparats comercials anomenats "yeast foods".

A nivell pràctic, el sulfat d'amoni (  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ) no és utilitzat perquè pot ser una font de H<sub>2</sub>S. El fosfat de diamoni (  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ) és la font nitrogenada emprada més estesa, el qual aporta un 21, 2 % de nitrogen p/p. Valors per sobre de 300 mg/l són quantitats permissibles per la legislació vitícola europea (Henschke i Jiranek, 1993). L'addició de fosfat de diamoni en qualsevol moment de la fase exponencial de creixement del llevat, fa augmentar ràpidament el creixement dels llevats i la velocitat de fermentació, de manera que disminueix el temps total de fermentació (Jiranek i col., 1993). L'efectivitat de les addicions de fosfat de diamoni en l'augment de biomassa i en la velocitat de fermentació, minven a mesura que es retarda l'addició respecte a l'addició l'inici de la FAL. En canvi, la reducció de temps total de fermentació és similar a l'addició realitzada l'inici (Bely i col., 1991). Aquesta observació té unes repercussions tècniques importants. L'energia necessària per mantenir una fermentació isoterma és proporcional al canvi de la velocitat de la FAL. Per tant, si es consideren els dos paràmetres, durada de la FAL i requeriment d'energia per regular la temperatura, el millor moment d'addició d'una font nitrogenada seria a la meitat de la progressió de la FAL (Sablayrolles, 1997). Durant la fase estacionària de la FAL, l'addició de fosfat de diamoni estimula progressivament menys el creixement dels llevats, i es torna

insignificant a mitja fase estacionària. El màxim de resposta, en aquestes addicions, es retarda i és menor. També, aquestes addicions es tornen menys efectives per reduir el temps total de fermentació (Bely i col., 1991). L'explicació bioquímica d'aquestes observacions és fonamenta en la fallida dels mecanismes de transport del llevat en presència d'etanol (veure apartat a.2.1.). La resposta a l'addició és dependent de la quantitat inicial de nitrogen disponible pels llevats. Per tant, la resposta s'observa més important en mostos amb concentracions baixes de nitrogen, i no s'aprecia gairebé amb aquells que el nitrogen disponible excedeix a 300 mg/l (Bely i col., 1991).

En relació a la qualitat del vi, les addicions de fosfat de diamoni augmenten significativament el contingut en èsters del vi, i disminueixen les quantitats d'alcohols superiors (Rapp i Versini, 1997). Vos i col, 1979 i Tromp, 1984, mostren que les addicions disminueixen la formació d'H<sub>2</sub>S. Per tant, les addicions de fosfat de diamoni i , en general, de font nitrogenada, contribueixen a la qualitat aromàtica del vi.

Els extractes de llevats, aporten, a part de fonts nitrogenades en forma d'aminoàcids, factors de creixement i de supervivència. Sota diferents marques, es troben els "yeast foods", que són mescles de fonts nitrogenades, vitamines, sals minerals, extractes de llevats en proporcions elaborades pels fabricants. Es solen afegir alhora amb el fosfat de diamoni.

La tiamina pot ser limitant i provocar endarreriments de la FAL així com aturades (veure apartat a.1.7.). La limitació no és deguda a quantitats baixes en els mostos sinó a tractaments pre-fermentatius (Ournac i Flanzy, 1970). Els llevats l'incorporen ràpidament gràcies a un transport actiu (veure apartat a.2.1.), provocant un fenomen de manca induïda. Les necessitats en tiamina són menors per a mostos amb menor quantitat de nitrogen assimilable (Sablayrolles i col., 1996). La tiamina s'afegeix en forma d'hidroclorid de tiamina.

## **1.b Sucres: glucosa i fructosa**

### **1.b.1 Composició en el most i vi: factors que la condiciona**

La concentració inicial en sucres fermentables, glucosa i fructosa, del most determina la concentració final d'etanol del vi, així mateix la temperatura de la FAL, donat que com més etanol s'evapora en les fermentacions més calentes i ràpides. Per aquest motiu, el contingut de sucres del raïm és un factor determinant per decidir les dates de verema.

Per una altra banda, la quantitat inicial de sucres influeix de manera evident l'inici, el desenvolupament i l'acabament de la FAL. Així, les concentracions de sucre del most són suficientment elevades per alentir el creixement inicial dels llevats (fase de latència), fenomen conegut com inhibició per substrat (Boulton, 1980). Les fermentacions a temperatura no controlada de mostos amb més contingut de sucre acaben abans que aquelles amb menys contingut de sucre, degut a la major dissipació de calor de les primeres (Boulton, 1980). Per contra, Dubois i col., 1996, arriben a la conclusió que la concentració de sucre inicial, a causa de l'efecte tòxic d'etanol sobre els llevats, és el paràmetre que més incideix en els finals de fermentacions a temperatura controlada de mostos no deficientes en components nitrogenats. La concentració de sucre inicial estaria correlacionada de manera positiva amb el risc d'aturada de fermentació.

Si bé, la demanda mínima de nitrogen per portar a terme la FAL és bastant independent de la concentració inicial de sucre (veure apartat 1.a.1.), a excepció de valors extrems, de manera que s'observa una major demanda de nitrogen per mostos amb continguts molt grans de sucre, i a l'inrevés (Jiranek i col., 1993).

Les quantitats de sucres que es deixen després de la FAL determinen el tipus de vi. Unes quantitats relativament altes són pròpies de vins dolços o de postres, i resulten indesitjables per gran part del vins de taula o secs. Des del punt de vista organolèptic, les quantitats de sucre residual s'han de mantenir equilibrades amb les quantitats d'etanol i àcids en el producte acabat (Bisson, 1993).

Generalment el contingut de sucre total del most destinat a vi conté unes concentracions de sucre que van de 140 a 260 g/l (Taula 2). Aquest sucre majoritàriament consisteix en glucosa i fructosa, en concentracions equimolars, ja que prové de la ruptura de la sacarosa en el gra de raïm, i conseqüentment, es troben traces de sacarosa al most. Les pentoses, les quals no serveixen a *Saccharomyces* com a substrats de creixement i d'obtenció d'energia, també es troben en baixes concentracions. Al most de raïm no es troben concentracions importants de manosa, galactosa, maltosa o rafinosa, que són sucres fàcilment metabolitzables per *Saccharomyces* (Walker, 1998).

La concentració de sucre del most depèn de la varietat, moment de verema, de la composició del sòl i del clima, així com de la disposició del conreu (densitat de plantació), dels tractaments, tal com la fertilització i la irrigació, i dels rendiments. La Taula 11 ens mostra la incidència de la varietat, clima i rendiments sobre la concentració de sucre del most.

**Taula 11.** Relació entre la concentració de sucre al most (expressat com grau probable) i la varietat, clima i producció en diferents localitats vitícoles de Catalunya (modificat de DARP, 1993).

Localització/varietat	Densitat (ceps/ha)	Producció		Grau probable (g/l)
		Kg/ha	Kg/cep	
<b>La Granada</b>	2.550			
Ull de llebre			4,6	12
Carinyena			5,3	10,5
Cabernet sauvignon			3,7	12,4
<b>Bràfim</b>	2.600			
Ull de llebre		14.072	5,4	10,8
Cabernet sauvignon		9.983	3,8	11,1
<b>Barberà</b>	2.520			
Ull de llebre		14.666	5,8	10,6
Carinyena		18.640	7,4	9,4
Cabernet sauvignon		12.081	4,8	11,6
<b>Verdú</b>	2.390			
Ull de llebre		8.117	3,2	11,8
Carinyena		9.100	3,2	11,6
Cabernet sauvignon		5.960	2,5	13,7
<b>Falset</b>	2.740			
Ull de llebre		6.622	2,4	11,1
Carinyena		15.381	5,6	10,9
Cabernet sauvignon		7.963	2,9	11,9

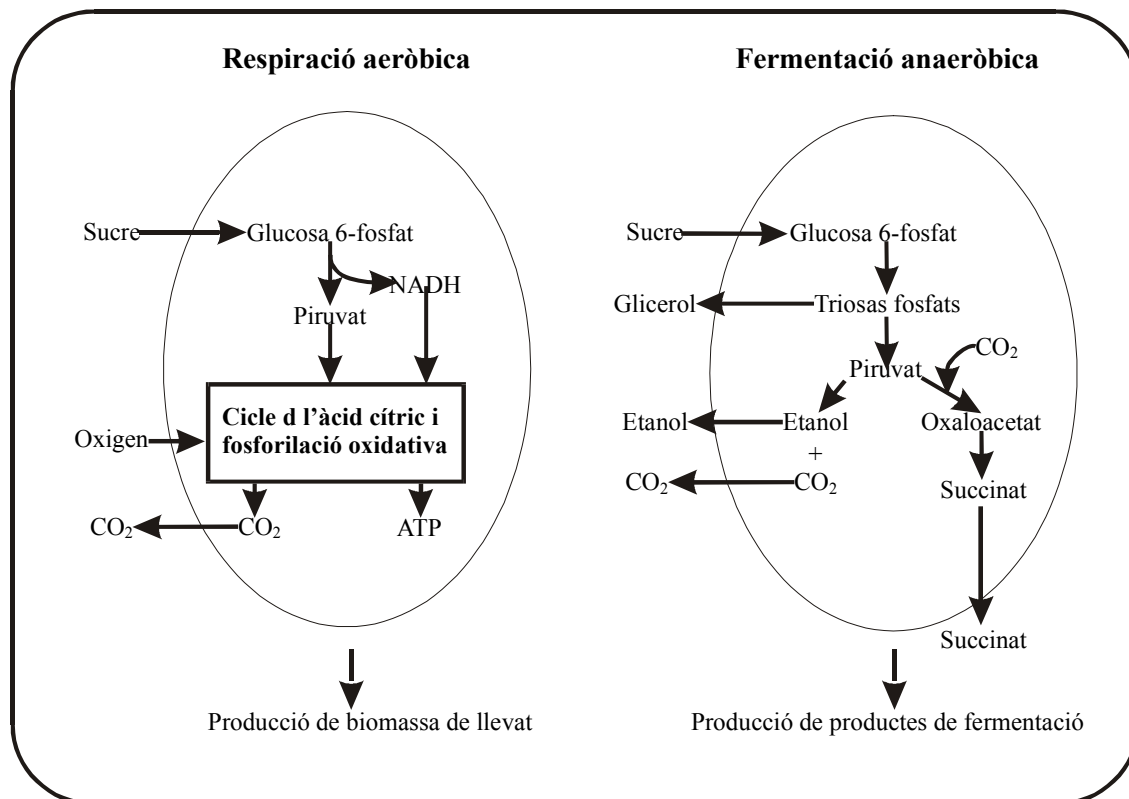


## 1.b.2 Captació, metabolisme i productes

La glucosa i la fructosa són les fonts principals de carboni i energia que *Saccharomyces* té per a desenvolupar-se en el most de raïm. Les condicions pròpies del most d'elevada concentració de les esmentades hexoses, fa que *S. cerevisiae* segueixi una ruta catabòlica dels sucres predominantment fermentativa, en presència fins i tot d'oxigen. Aquest fenomen s'anomena efecte Crabtree, o de la glucosa, o contra efecte Pasteur, per indicar que l'efecte Pasteur no es verifica quan hi ha una elevada concentració de glucosa (Walker, 1998). Käppli i Sonnleitner, 1986, assenyalen que el metabolisme fermentatiu en presència d'oxigen caldria referir-ho com respirofermentatiu, per denotar que sempre existeixen unes capacitats respiratòries mínimes. En condicions anaeròbiques, el catabolisme de les hexoses és absolutament fermentatiu, i el creixement de *Saccharomyces* es troba interromput per l'absència d'esterols i àcids grassos, els quals només es poden sintetitzar en ambient aeròbic (Walker, 1998).

L'efecte Crabtree només es manifesta, en llevats sensibles a la glucosa com és el cas de *S. cerevisiae*. El sentit fisiològic d'aquest efecte és la major capacitat de recuperació del  $\text{NAD}^+$ , provenint del NADH format durant la glucòlisi, del procés fermentatiu respecte a la respiració. La glucosa present al medi o algun producte inicial del seu metabolisme reprimiria la síntesi de diferents enzims respiratoris i gluconeogènics (repressió per catabòlit). A més, l'efecte repressor de la glucosa actuaria sobre la morfogènesi del mitocondri, la qual durant la fermentació no té membrana interna ni crestes. Aquestes estructures tornen a aparèixer quan el metabolisme aeròbic desplaça a la FAL (Walker, 1998). Si bé, la funcionalitat respiratòria del mitocondri no és operativa, sembla que s'hi donen diferents funcions cel·lulars essencials que són crítiques per a l'eficiència de la FAL i la qualitat del producte final (O'Connor-Cox i col., 1996).

Per una altra banda, la glucosa pot inactivar ràpidament enzims gluconeogènics (inactivació per catabòlit) com la fructosa 1,6-bisfosfatasa, mitjançant fosforilació per una quinasa dependent d'AMP cíclic (Walker, 1998).



**Figura 6.** Esquema de les vies catabòliques principals dels llevats.

En el sector industrial s'afavoreix el metabolisme respiratiu o fermentatiu segons els objectius, formació de biomassa cel·lular o de productes de fermentació, respectivament (Figura 6).

A continuació s'aporten detalls sobre la captació del sucres, metabolització mitjançant el procés fermentatiu, desviacions de la FAL i productes resultants, que tenen una incidència en la qualitat del producte final.

### 1.b.2.1 Captació

El transport dels sucres dins de la cèl·lula de llevat per difusió facilitada es pot considerar com el primer pas de la glucòlisi, i conseqüentment de la FAL. Es pensa que podria ser un punt clau del flux glicolític sota les condicions anaeròbiques (Bisson, 1993), no només per ser l'etapa més lenta del catabolisme del sucres, sinó pel control sobre el sistema de transport en consonància amb les condicions metabòliques i fisiològiques de la cèl·lula (McClellan i col., 1989). Així doncs, la velocitat del flux a

través de la glucòlisi és equivalent a la velocitat de flux del transport de sucres (Bisson, 1999). En el transport de sucres en *Saccharomyces* estan implicats diferents transportadors que s'expressen sota condicions específiques, per la qual cosa és un procés complex, i es desconeix les funcions fisiològiques de tots ells (Kruckeberg i Bisson, 1990; Bisson, 1999).

Es distingeixen principalment tres grups de transportadors en *Saccharomyces* codificats per la família multigènica anomenada gens *HXT* (transportadors d'hexoses), composta per 18 membres (de *HXT1* a *HXT17* i *GAL2*) (Taula 12).

Taula 12. Transportadors de sucres de *Saccharomyces cerevisiae*.

Transportador	K <sub>m</sub> glucosa (mM)	K <sub>m</sub> fructosa (mM)	Expressió gènica	Observació
Hxt6p, Hxt7p i Gal2p	1-2	5-7	-	No es troben en presència d'alt contingut de sucre
Hxt2p i Hxt4p	10	10	-/+	No es troben en presència d'alt contingut de sucre
Hxt1p i Hxt3p	50-200	250-700	C	Activitat independent a la quantitat de sucre. Activitat decau en fase estacionària.

-: repressió per glucosa; +: inducció per glucosa; c: expressió constitutiva. McClellan i col., 1989; Reifenberger i col., 1997; Bisson, 1999.

Vist que les quantitats de sucre del most és 20 % (p/v) o més, i el sucre residual generalment dels vins és de 1 i 2 % (p/v), es pot pensar que els transportadors d'alta afinitat no intervenen de manera important durant la vinificació.

La glucosa exerceix com a factor clau en la regulació de l'expressió dels gens *HXT* mitjançant proteïnes reguladores que detecten la presència de glucosa, i no estan implicades directament en el transport, com són els productes dels gens *SNF3* i *RGT2* (Bisson, 1999). Els nivells de nitrogen també influeix sobre l'expressió dels gens *HXT* (Bisson, 1999).

Cal indicar, que la velocitat de renovament (turnover) dels transportadors de sucres de la membrana del llevat és molt ràpida mitjançant degradació al vacúol. Això permet una regulació fina dels transportadors presents a la membrana en sintonia amb

les condicions del medi, i permet explicar perquè nivells baixos de nitrogen donen lloc a aturades o endarreriments de la FAL (Busturia i Laguna, 1986).

Alguns autors indiquen que l'etanol exerceix un efecte inhibitori directe (no competitiu) sobre el transport del sucre (Leao i Van Uden, 1985), i/o incideix sobre propietats de la membrana, com ocorre amb el transport dels compostos nitrogenats (veure apartat 1.a.2.1.). Alteracions en propietats de la membrana afectarien als canvis conformacionals de les proteïnes per a dur a terme el transport. Actualment es proposa que els efectes de l'etanol sobre la membrana no són a nivell d'alteració de la fluïdesa de la membrana, sinó per incidència amb interaccions polars, dielèctriques, i de ponts d'hidrogen sobre caps i grups polars dels fosfolípids i proteïnes integrals, respectivament. El llevat respon incrementant a nivell de membrana la proporció d'àcids grassos insaturats i ergosterol, i disminuint el contingut de proteïna (Jones, 1990; Bisson, 1999).

La temperatura afecta a la fluïdesa de la membrana, i per tant al rendiment del transport. Temperatures massa baixes redueixen la fluïdesa de la membrana i limiten el canvis conformacionals dels transportadors, mentre que temperatures altes incrementen la fluïdesa, i provoquen una dissociació massa gran de l'estructura del transportador durant el canvi conformacional. Així doncs, tant l'etanol com la temperatura actuen sobre la mateixa funció cel·lular, i és de no estranyar que ambdós factors afectin la FAL de manera sinèrgica (Bisson, 1999).

Els transportadors de sucres tenen major afinitat per la glucosa que per la fructosa, degut a que la fructosa és presentada en solució en forma de furanosa al voltant d'un 30 %, mentre que la forma piranosa és la realment reconeguda pels transportadors (Lagunas, 1993). Això fa que la glucosa sigui consumida del most més ràpidament en relació a la fructosa, i es canviï la relació inicial de 1:1 d'ambdós sucres. Gafner i Schütz, 1997, assenyalen que la relació de glucosa i fructosa (GFR) de vins provinents d'aturades o alentiments de fermentació estan al voltant de 0,1 o per sota, en canvi els vins elaborats sense problemes fermentatius estan per sobre de 0,5.

### 1.b.2.2 Glucòlisi

Una vegada incorporades la glucosa i la fructosa, el següent pas de la glucòlisi (Figura 8) és la fosforilació del sucres. A *Saccharomyces* aquesta la du a terme una de les tres quinases. La hexoquinasa II s'expressa de manera constitutiva i és l'isoenzim majoritàriament expressat durant la FAL en medis d'alt contingut en sucre (Bisson, 1993). Aquest isoenzim fosforila a la mateixa velocitat la glucosa i la fructosa (Colowick, 1973). En canvi, la hexoquinasa I, l'expressió de la qual és reprimible per la glucosa, té una velocitat de fosforilació de la fructosa tres vegades més elevada respecte a la velocitat de fosforilació de la glucosa. (D'Amore i col., 1989). D'aquesta manera, el llevat compensa la major velocitat de captació i fosfolització, i en definitiva el major consum de la glucosa en relació a la fructosa (Bisson, 1999), amb l'objecte de mantenir el flux glucolític. Schütz i Garner, (1997), suggereixen que baixes expressions de l'hexoquinasa I estan associades a soques susceptibles a provocar aturades o endarreriments de fermentació.

Dues quinases més, fosfofructoquinasa i piruvat quinasa, participen en la glucòlisi, que juntament amb les hexoquinases, catalitzen les reaccions irreversibles. Les altres reaccions són reversibles, de manera que la glucòlisi comparteix els mateixos enzims amb la gluconeogènesi. Aquestes reaccions catalitzades per les quinases serien etapes claus de la regulació del flux glucolític. La fosfofructoquinasa està regulada per gran nombre d'efectors al·lostèrics, com AMP, ADP, ATP,  $P_i$ , 6-fosfatfructosa, 1,6-difosfatfructosa, amoni, i altres metabòlits (Rhodes i col., 1986). Així mateix, la piruvat quinasa, que catalitza la darrera reacció de la glucòlisi, també estaria sota el control d'efectors al·lostèrics, entre ells, l'amoni. La limitació de nutrients nitrogenats tindria un efecte sobre el flux de la glucòlisi, i per tant de la FAL, a nivell de les reaccions catalitzades per aquestes quinases (Bisson, 1993).

La glucòlisi rendeix 2 molècules d'ATP i poder reductor en forma de NADH, el qual és reoxidat a  $NAD^+$  en les posteriors reaccions, pròpies de la FAL.

### 1.b.2.3 Del piruvat a l'etanol

Dues reaccions consecutives permeten la reoxidació del NADH (Figura 7). Una descarboxilació del piruvat per l'enzim piruvat descarboxilasa, i la subsegüent reducció de l'acetaldehid a etanol per l'alcohol-deshidrogenasa.

Dos isoenzims d'activitat piruvat descarboxilasa s'han aïllat, PDC1 i PDC5. L'isoenzim PDC1 porta la major part de l'activitat piruvat descarboxilada (Hohmann i Cederberg, 1990).

L'activitat alcohol deshidrogenasa està representada per quatre isoenzims, ADHI, ADHII, ADHIII i ADHIV (Walton i col., 1986). L'ADHI enzim citoplasmàtic està implicat en la FAL. Igualment citoplasmàtica, l'ADHII està reprimida per les altes concentracions de glucosa, i està implicada en el consum d'etanol. L'ADHIII, isoenzim mitocondrial, es creu que té un paper en el creixement de *Saccharomyces* en etanol (Bisson, 1993). Finalment, el darrer isoenzim d'alcohol-deshidrogenasa descobert, ADHIV, confereix resistència a antimicina A i complementa la pèrdua de l'ADHI, quan és sobreexpressada (Walton i col., 1986).

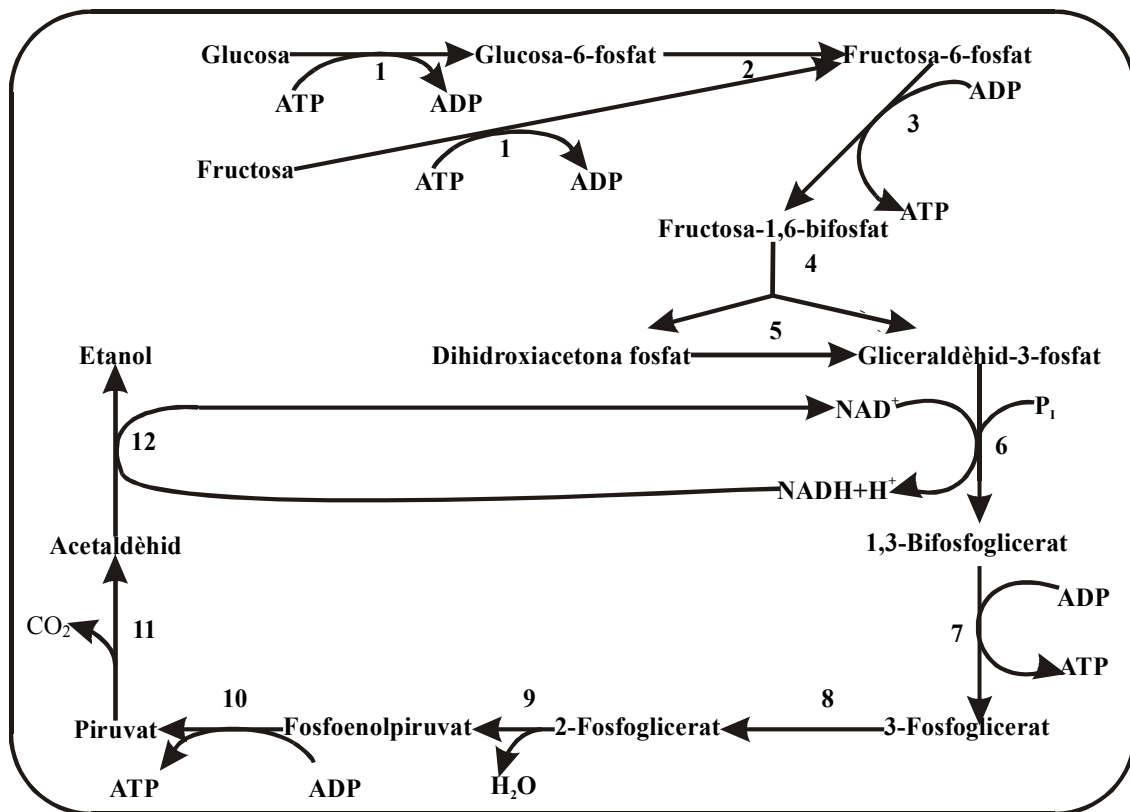


Figura 7. Via de la glucòlisi i de la fermentació alcohòlica (FAL).

1: Hexoquinasa; 2: Fosfoglucosa-isomerasa; 3: Fosfofructoquinasa; 4: Aldolasa; 5: Triosa-fosfat isomerasa; 6: Gliceraldehid 3-fosfat-deshidrogenasa; 7: Fosfoglicerat-quinasa; 8: Fosfogliceromutasa; 9: Enolasa; 10: Piruvat-quinasa; 11: Piruvat-descarboxilasa; 12: Alcohol-deshidrogenasa.

#### **1.b.2.4 Productes secundaris**

No només es produeix etanol a partir del sucre incorporat mitjançant la FAL durant la vinificació, sinó que el llevat produeix altres productes minoritaris i biomassa (Taula 1, Figura 4), com a resultat de desviacions de la FAL.

L'anomenada fermentació gliceropirúvica (Figura 8), és una d'aquestes vies alternatives de la FAL, que rendeix glicerol i piruvat, a més de productes secundaris de la fermentació que deriven d'aquest últim com diacetil, succinat i altres àcids orgànics. Aquest procés és molt actiu en els llevats crescuts en presència d'O<sub>2</sub>, com els provinents d'un peu de cuba, acabats d'inocular al most. En aquests moments inicials, les cèl·lules respiren i les activats piruvat descarboxilasa i alcohol deshidrogenasa no estan gaire expressades, produint-se els compostos esmentats i no etanol. Aquesta via reoxida el NADH, sense una producció neta d'ATP. Gran part del glicerol es forma amb els primers 100 grams de sucres i després minva la producció, encara que la producció mai és nul·la. Per tant, la fermentació gliceropirúvica està solapada amb la FAL a llarg de la vinificació, de manera que cada vegada que una molècula de piruvat, provinent de la glucòlisi, no és utilitzada per la FAL però serveix per la formació de productes secundaris, una molècula de glicerol es forma per reducció de la dihidroxiacetona. La producció de glicerol permet al llevat eliminar NADH excedentari que prové de la síntesi d'aminoàcids, proteïnes i oxidacions generadores de productes secundaris. D'aquesta manera, el llevat manté en equilibri el potencial òxid-reductor (Bisson, 1993; Ribéreau-Gayon i col., 1998).

A nivell industrial la producció de glicerol s'afavoreix afegint grans quantitats de sulfurós al substrat a fermentar. L'acetaldèhid es combina amb el sulfurós i no es pot reduir a etanol, afavorint d'aquesta manera la fermentació gliceropirúvica (Ribéreau-Gayon i col., 1998). Per una altra banda, el sulfurós es combina amb la tiamina, de manera que és eliminada de la cèl·lula (Bisson, 1993). Cal recordar que la tiamina participa en les reaccions de descarboxilacions, com la catalitzada per la piruvat-descarboxilasa (veure apartat 1.a.1.7.).

Als vins negres, quantitats elevades de glicerol (10 g/l o més) contribueixen favorablement a la qualitat, ja que aporta cos i franquesa. En canvi, als vins blancs convé que no sobrepassi els 5 g/l (Rainieri i col., 1998).

Els productes secundaris es formen a partir del piruvat, que no és transformat en etanol. En les condicions anaeròbiques de la vinificació, aquest piruvat entra en un cicle incomplet de l'àcid cítric al citosol mitjançant una carboxilació catalitzada per la piruvat-carboxilasa, que rendeix oxaloacetat. Aquest enzim té com a grup prostètic la biotina, que fa de transportador de CO<sub>2</sub>, i requereix una molècula d'ATP. Les successions de transformacions segueixen com el cicle del àcid cítric al mitocondri, que es troba inactiu en aquestes condicions. La cadena de reaccions s'interromp a nivell del succinat, degut a que l'activitat succinodeshidrogenasa requereix la presència de FAD, coenzim estrictament respiratori. El succinat arriba a acumular-se entre valors de 0,5 a 1,5 g/l. El NADH produït durant aquestes reaccions, és reoxidat al formar-se glicerol a partir de dihidroxiacetona (Ribéreau-Gayon i col., 1998).

La formació d'àcid acètic per part del llevat durant la FAL és dependent de la soca (Bisson, 1993). L'origen bioquímic no està gaire elucidat. Pot provenir de l'hidròlisi de l'acetil-CoA, el qual prové de la descarboxilació oxidativa del piruvat, reacció catalitzada pel complex piruvat deshidrogenasa. Aquest complex es troba a la matriu del mitocondri, i per tant, limitat en condicions de vinificació. Un altre origen, és a partir de l'oxidació de l'acetaldèhid per part d'aldèhid deshidrogenasa, enzim actiu durant la vinificació, amb formació de NADPH, utilitzat en la síntesi de lípids. L'acetat format s'uniria al coenzim A (CoA) per formar acetil-CoA gràcies a l'activitat de l'acetil-CoA sintetasa. S'ha comprovat que les soques que produeixen menys àcid acètic són aquelles que tenen més activitat acetil-CoA sintetasa (Verduyn i col., 1990).

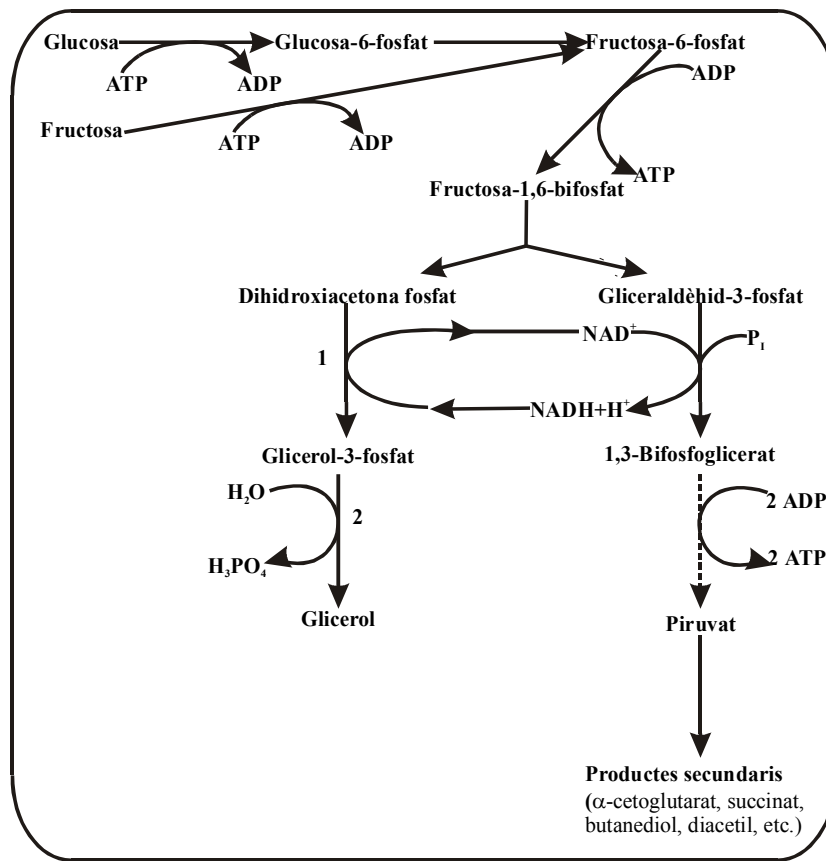
Les quantitats d'àcid acètic en els vins, a l'igual que el glicerol, són dependents de les quantitats dels sucres inicials del most. Més grans són les quantitats de sucres del most més àcid acètic i glicerol produeix el llevat durant la FAL (Ribéreau-Gayon i col., 1998). Altres factors que incideixen durant vinificació, poden afavorir la producció d'àcid acètic per part de *Saccharomyces cerevisiae*. Així, l'anaerobiosi, els pHs extrems, certes carències d'aminoàcids i vitamines del most, i les temperatures elevades, són factors que fan augmentar la producció d'àcid acètic. Un factor addicional que està relacionat amb la vinificació de blancs i rosats és el grau de desfangament. Un desfangament molt estricte empobreix el most en lípids, vitamines i aminoàcids, de manera que es verifica un augment en les quantitats d'àcid acètic en els vins (Ribéreau-Gayon i col., 1998).



El llevat pot produir àcid làctic a partir dels sucres durant la FAL. Directament per reducció del piruvat per l'activitat D(-)-lactat-deshidrogenasa, majoritària en condicions anaeròbiques, s'arriben a produir entre 200 i 300 mg/l d'àcid D(-)-làctic i unes desenes d'àcid L(+)-làctic. Aquest darrer enantiòmer es produeix de manera important durant la FML, portada a terme pels bacteris làctics (Ribéreau-Gayon i col., 1998).

Així mateix, el llevat produeix diacetil, acetoïna, compostos odorants que recorden a la mantega, i 2,3-butanediol (Figura 4). Les quantitats dels primers productes produïdes pel llevats no arriben als llindars de percepció, a diferència de les quantitats produïdes pels bacteris làctics durant la FML. La condensació entre una molècula d'acetaldehid actiu combinat amb pirofosfat de tiamina i una molècula de piruvat formen  $\alpha$ -acetolactat; el diacetil prové de la descarboxilació oxidativa de l' $\alpha$ -acetolactat; l'acetoïna, pot provindre de la reducció de diacetil, o directament de la descarboxilació no oxidativa de l' $\alpha$ -acetolactat; i finalment 2,3-butanediol es forma per reducció de l'acetoïna, reacció aquesta reversible. El diacetil es produeix des del principi de la FAL, però és ràpidament reduït a acetoïna i 2,3-butanediol. Aquesta reducció es prolonga una vegada acabada la FAL quan els vins es conserven amb la biomassa de llevats (Ribéreau-Gayon i col., 1998).

Finalment, dos productes sense cap incidència organolèptica sintetitzats pels llevats amb origen glucídic són el citramalat (0-300 mg/l) i dimetilglicerat (0-600 mg/l). Es formen per condensació de l'acetil-CoA i l'àcid pirúvic (Ribéreau-Gayon i col., 1998).



**Figura 8.** Via de la fermentació gliceropirúvica.  
1: Dihidroxiacetona-fosfat-reductasa. 2: Glicerol-fosfatasa.

## 2 Llevats: ecologia de les espècies i soques enològiques

Com s'ha descrit a la primera part, els llevats són els màxims responsables de la transformació de most en vi, i específicament, els llevats del gènere *Saccharomyces* són els que realment duen a terme la FAL. No totes les espècies del gènere *Saccharomyces* intervenen en la FAL del most, i dins d'aquestes espècies enològiques hi han soques més interessants que altres en termes fermentatius i d'obtenció d'un producte de qualitat. Cal indicar que els llevats no-*Saccharomyces* presents en el raïm i en el most-vi poden contribuir favorablement o no, i aquesta contribució pot ser important en certes vinificacions, per exemple en vinificacions a baixa temperatura i vinificacions espontànies (Lema i García-Jares, 2000).

## 2.1 Llevats del raïm i del vi

Els llevats són fongs superiors unicel·lulars que es multipliquen formant gemes. A l'igual que els membres micel·liars (cenocítics), els llevats s'agrupen en base al seu desenvolupament sexual, es a dir com formen les espores sexuals. Així, filogenèticament es distingeixen dos grups, Ascomicets i Basidiomicets, tant en les seves formes teleomòrfiques (amb etapa sexual) com anamòrfiques (sense etapa sexual) (Kurtzman i Fell, 1998). Si bé, la diferenciació taxonòmica es sol fonamentar en característiques morfològiques i fisiològiques (Krejer-van Rij, 1984; Barnett i col., 1990), representa en ocasions una incorrecta classificació d'espècies.

Els llevats trobats al raïm i al vi (llevats enològics) pertanyen principalment al grup dels Ascomicets. D'entre varis milers d'espècies de llevats que es coneixen, els llevats enològics estan representats per una quinzena (Ribéreau-Gayon, 1998) (veure Taula 13).

La taxonomia del gènere *Saccharomyces* ha anat canviant al llarg de la segona meitat del segle XX, passant de la distinció d'unes 30 espècies a 10. Els criteris basats en la morfologia, fisiologia i bioquímica (p. e. perfil d'utilització de sucres) han estat substituïts per criteris genètics. Així, Kreger-Van Rij, 1984, a partir dels treballs de Yarrow i Nakase, 1975, sobre el percentatge de guanina i citosina de l'ADN dels llevats, redueix el nombre d'espècies a set. Moltes espècies assignades com a diferents segons el perfil d'utilització de sucres, s'inclouen a l'espècie *S. cerevisiae*. Avui en dia, enòlegs, i en extensió els productors de llevats, usen el terme de raça o varietat fisiològica unit al nom *S. cerevisiae*, com a seqüela de l'antiga classificació.

Finalment, Barnett i col., 1990, basant-se en els tests de reassociació ADN-ADN portats a terme per Vaughan Martini i Martini, 1987, i experiments d'hibridació entre soques (Naumov, 1987) canvia de nou la classificació del gènere *Saccharomyces*. Delimita 3 grups diferents que agrupen un total de 10 espècies. El Grup I (*Saccharomyces sensu stricto*), inclou als *Saccharomyces* enològics i cervesseres de tipus "ale" (*S. cerevisiae* i *S. bayanus*), a les soques de llevats de cervessera de tipus "lager" (*S. pastorianus*, que substitueix el nom de *S. carlsbergensis*), i *S. paradoxus*. Aquesta darrera espècie agrupa soques aïllades en arbres, insectes i sols, i es considerada com predecessora natural de les altres tres. Els llevats del Grup II

(*Saccharomyces sensu lato*), *S. darensis*, *S. exiguus*, *S. servazii*, *S. unisporus*, *S. castelli*, i del Grup III, *S. kluyveri*, no intervenen en la vinificació (Ribéreau-Gayon i col., 1998).

**Taula 13.** Principals espècies de llevats trobat al raïm i al vi (Ribéreau-Gayon, col., 1998) segons classificació de Kurtzman i Fell, 1998.

<b>Ascomycota</b>				
<b>Família</b> <b>Schizosaccharomycetaceae</b>	<b>Família</b> <b>Saccharimycodaceae</b>	<b>Família</b> <b>Saccharomycetaceae</b>	<b>Família</b> <b>Spermophtoraceae</b>	<b>Família</b> <b>Candidaceae</b>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>  <i>Hanseniaspora uvarum</i> ( <i>Kloeckera apiculat</i> ) ?	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>  <i>Saccharomyces bayanus</i>  <i>Debaryomyces sp. ?</i>  <i>Dekkera anomala ?</i>  <i>Dekkera bruxellensis</i> ( <i>Brettanomyces bruxellensis</i> ) ?  <i>Hansenula mrakii</i>  <i>Kluyveromyces thermolerens</i>  <i>Pichia anomala ?</i>  <i>Pichia fermentens ?</i>  <i>Pichia membranefociens ?</i>  <i>Zygosaccharomyces bailii</i>  <i>Torulaspota delbreuckii</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	( <i>Candida stellata</i> )  ( <i>Candida vini</i> )  ( <i>Candida famata</i> )
<b>Basidiomycota</b>				
<b>Família</b>				
<b>(<i>Rhodotorula sp.</i>)</b>				

(anamorf); ?: ubicació no totalment confirmada.

Abundants treballs sobre l'ecologia dels llevats al raïm i al vi s'han realitzat en diferents zones vitícoles del món (Fleet i Heard, 1993; Ribéreau-Gayon i col., 1998) les conclusions de les quals han estat validades o renovades amb treballs recents (Querol, i col. 1994; Guillamón i col., 1996; Constantí i col., 1997; Egli i col., 1998). A la superfície del raïm es verifica una successió d'espècies, les poblacions totals de les quals poden arribar de  $10^3$  a  $10^4$  cèl·lules just abans de la verema, depenent de la situació geogràfica del conreu, de la climatologia durant la maduració, l'estat sanitari de la verema i els tractaments fitosanitaris aplicats. El nombre d'espècies que s'hi identifiquen és reduït. Es troben des de llevats estrictament oxidatius com els que pertanyen al gènere *Rhodotorula*, a fèblement fermentatius, predominant l'espècie

*Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*), i menys presents com *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida famata*, *Candida stellata*, *Pichia membranefaciens*, *Pichia fermentans*, *Hansenula anomala* (Ribéreau-Gayon i col., 1998).

Tots aquests treballs coincideixen en assenyalar la reduïda presència de les espècies fermentatives *S. cerevisiae* i *S. bayanus* sobre el raïm, encara que s'hi troben. Això, juntament amb l'observació de que els cellers de nova instal·lació tenen dificultat a portar a terme fermentacions espontànies, comparat amb les instal·lacions de vinificació ja utilitzades en campanyes anteriors, indicarien que d'alguna manera aquests llevats es mantenen en les instal·lacions (parets, sòls, maquinària, ...) durant el temps d'entrecampanya. Constantí i col., 1997, confirmen aquesta idea, en trobar soques de llevats comercials inoculades en la campanya anterior en fermentacions espontànies. Els llevats no-*Saccharomyces* colonitzen d'una manera encara més important les instal·lacions dels cellers, fet que fa necessària una higiene exhaustiva (Ribéreau-Gayon i col., 1998).

El perfil dels llevats identificats en el most és molt similar als trobats en el raïm en les primeres hores d'omplir les tines, predominant els llevats apiculats (*H. uvarum* i la seva forma anamòrfica, *K. apicula*) i *M. pulcherrima*. En condicions normals de vinificació espontània, les poblacions de *S. cerevisiae* es desenvolupen després d'una vintena d'hores, coexistint amb llevats del raïm. Aquests darrers desapareixen ràpidament a l'inici de la fermentació. *S. cerevisiae* es selecciona, en detriment dels llevats no-*Saccharomyces*, sota la pressió de quatre paràmetres de major pes com són, l'aenarobiosi, el sulfitat de la verema i el most, la quantitat de sucre, i la presència creixent d'etanol.

En les vinificacions en blanc, existeix un empobriment de llevats al most degut a l'efecte de separar la pellofa després de la premsada i del desfangat, almenys les primeres veremes de la campanya. Avançada la campanya, *S. cerevisiae* contamina el material de collita, el de transport del raïm, i sobretot el d'acollida, com són l'esgranadora i premses; de manera que inicialment al most pot representar el 50 % de la població de llevats. Aquest fet, pot dificultar el desfangament del most destinat a vi blanc, inclús a baixa temperatura degut al desenvolupament de la fermentació (Ribéreau-Gayon i col., 1998).

A la darrera etapa de la FAL, la fase estacionària, les poblacions de *S. cerevisiae* disminueixen de manera progressiva, arribant a poblacions mai inferiors a  $10^6$  cèl·lules per ml. En un principi, si la fermentació s'ha caracteritzat per un consum ràpid i complet dels sucres, cap altre espècie de llevat apareix de manera important al final de fermentació. En canvi, en fermentacions dificultoses poden sorgir espècies que malmeten qualitativament el vi, com l'aparició de llevats del gènere *Brettanomyces*.

Setmanes després de l'acabament de la FAL, les poblacions viables de *S. cerevisiae* decauen ràpidament per situar-se a nivells per sota de varis centenars de cèl·lules per ml. En aquests moments poden sorgir altres espècies de llevats, que provoquen alteracions als vins que segueixen un envelliment o que es conserven en ampolla. Així, poden aparèixer llevats que desenvolupen un metabolisme oxidatiu de l'etanol, com les espècies de *Pichia* o *Candida*, i algunes soques de *S. cerevisiae* apreciades per a la producció de Vin Jaune del Jura i vins de Xerès. Altres espècies dels gèneres *Brettanomyces* o *Dekkera*, poden desenvolupar-se en anaerobiosis aprofitant els sucres residuals no consumits per *S. cerevisiae*. Finalment, en vins dolços o licorosos existeixen riscos de refermentacions al llarg de la criaça o en l'ampolla per la proliferació de *Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii*, així com per certes soques de *S. cerevisiae* resistents a alts continguts d'etanol i  $\text{SO}_2$ . (Sponholz, 1993).

## 2.2 Soques dels llevats vinificadors

L'espècie de llevat que porta el major pes en la vinificació és *S. cerevisiae*, la qual està constituïda per nombroses soques. Aquestes soques ofereixen propietats tecnològiques extremadament variables. La soca té incidència en la capacitat de fermentar fins a un cert grau d'alcohol i contingut de  $\text{SO}_2$ , en la velocitat de fermentació, en la capacitat fermentativa a temperatures extremes, en la natura i quantitat de productes secundaris produïts, i en les característiques aromàtiques dels vins (Ribéreau-Gayon i col., 1998).

Les tècniques basades en l'estudi de l'ADN han permès estudiar l'ecologia dels llevats nadius responsables de la fermentació espontània de la verema. Així mateix, són unes eines imprescindibles en la selecció de les soques amb millors aptituds enològiques, en el control de producció de dites soques per part dels industrials de

biomassa, en la verificació d'implantació de la soca inoculada, i en la creació i manteniment de les col·leccions de soques.

Les soques cercades pels industrials que puguin ser candidates a ser llevats iniciadors de la fermentació (starters) o llevats secs actius (LSA) han de reunir unes certes característiques, que es resumeixen a la Taula 14.

S'ha comprovat que la FAL, en vinificacions espontànies, es portada per una successió de soques, de manera que van apareixent unes i/o desapareixent altres al llarg de la fermentació. Les fermentacions que es desenvolupen sense problemes es caracteritzen per la presència dominant de poques soques. En canvi, la presència de moltes soques durant tota la fermentació sol ser indicatiu de FALs problemàtiques (Frezier i Dubourdiou, 1992; Querol i col, 1994; Masneuf, 1996; Constantí i col., 1997).

La inoculació de soques seleccionades implica en principi una imposició ràpida de la soca introduïda, encara que certes soques indígenes es mantenen amb unes poblacions significativament elevades fins el final de la fermentació.

La utilització d'un equip de remuntatge per totes les tines de vinificació en negre assegura una ràpida disseminació de les soques inoculada i indígenes a altres tines sense necessitat d'inocular-les. En canvi, en la vinificació en blanc aquest efecte disseminador no es verifica a nivell dels remuntatges, al no efectuar-se per a aquests tipus de vi. Sí té lloc a nivell de la premsada de la verema. Llavors només s'expandirien pel celler soques indígenes, ja que la inoculació de soques seleccionades s'efectua en etapes posteriors (Ribéraeau-Gayon, i col. 1998).

Els treballs d'ecologia de llevats d'una zona vitivinícola ressalten l'existència d'unes soques dominants en la FAL (una o dues per fermentació), dins del conjunt de soques de les poblacions fementatives, pel fet que es troben en anyades consecutives en el mateix celler. Per certes zones vitivinícoles aquestes soques dominants estarien dissiminades pel vinyer (Vezinhet i col. 1992; Versavaud i col. 1993). Aquest fet no és sistemàtic, hi ha anyades que les soques dominants habituals no apareixen. En sentit contrari a aquestes observacions, Torija i col., 2000, observen que per la zona del

Priorat i Terra Alta, en cellers que mai han utilitzat LSAs, la fermentació es desenvolupa gràcies a una successió d'un gran nombre de soques, sense que hagi cap soca dominant. Aquests autors argumenten que la falta d'una o unes soques predominants és motivada per absència de fenotip killer de les soques de la zona i la no utilització prèvia de LSAs.

**Taula 14.** Característiques desitjables i inadequades dels llevats vínics (Degre, 1993; Jiménez, 1994).

<b>Adients</b>	<b>No adients</b>
Alta tolerància al alcohol	Producció de SO <sub>2</sub>
Resistència al SO <sub>2</sub>	Producció de SH <sub>2</sub>
Ràpid començament de la fermentació després de la rehidratació.	Producció acidesa volàtil
Fermentació completa dels sucres	Producció en excés d'acetat d'etil
Floculació ràpida acabada la fermentació	Producció de acetaldèhid i piruvat
Fermentació a baixes temperatures	Producció d'escuma
Fermentació sota pressió	Formació de precursors d'etil carbat
Degradació de l'àcid màlic	Producció de polifenoloxidasas
Producció de glicerol	
Producció de β-glucosidasa	
Fenotip Killer	
Resistència a la dessecació i manteniment de la viabilitat en estat sec	
Balanç apropiat d'isobutanol (0,04 g/l), n-propanol (0,02 g/l) i alcohol amílic (0,15 g/l)	

La idea de “llevat de clos” (“levure de cru”) no està gens confirmada per les observacions ecològiques, donat que certes soques indígenes, dominants en un clos concret, es poden trobar ja sigui en closos propers o geogràficament allunyats (Ribéreau-Gayon i col. 1998).



### 2.3 Incidència qualitativa dels llevats no-*Saccharomyces*

La influència dels llevats no-*Saccharomyces* sobre el desenvolupament de la FAL ja s'ha exposat a la part de metabolisme. Aquí s'insisteix sobre possibles incidències d'aquest llevats sobre la qualitat final del vi. En aquest sentit els llevats tindran major incidència en la mesura que s'allargui la seva presència en el most-vi. Això és possible, disminuint les concentracions de SO<sub>2</sub> o prescindint-ne i portant la vinificació per sota de 20 °C, de manera que el desenvolupament de *S. cerevisiae* i conseqüentment l'acumulació d'alcohol estigui retardada (Fleet i Heard, 1993). Addicionalment, les espècies de llevats no-*Saccharomyces* resisteixen en general més la toxicitat de l'etanol a baixes temperatures (D'Amore i Stewart, 1987; Fleet i col., 1989).

Fleet i Heard, 1993, ressenyen els potencials dels compostos volàtils amb influència organolèptica de les principals espècies de llevats no-*Saccharomyces* i *S. cerevisiae*. En termes generals, els llevats no-*Saccharomyces* són poc alcoholigens en comparació amb *S. cerevisiae*; produeixen més àcid acètic, a excepció de *M. pulcherrima*, i acetat d'etil, a destacar *H. anomala*; són pocs productors d'alcohols superiors i acetaldèhid.

Diferents treballs comparen els efectes de diferents soques iniciadores i els llevats indígenes mostrant l'existència de diferències en la composició química dels vins finals (Mora i col., 1990; Longo i col., 1992; Lema i col., 1996). Més recentment, en aquest tipus de treballs s'inclouen pannells de tast, de manera que queden reflectits els llinars sensorials dels compostos responsables de l'aroma, i s'arriben a conclusions que poden tenir incidència en el consumidor final. Egli i col., 1998, indiquen que els vins elaborats sense la inoculació d'iniciadors, i per tant amb forta influència de no-*Saccharomyces* són classificats pels tastadors amb les millors i pitjors puntuacions en els atributs sensorials.

### 2.4 Altres microorganismes del vi: bacteris làctics i bacteris acètics

Aquests microorganismes contribueixen d'una manera positiva o negativa en l'elaboració del vi.

Cal destacar dins dels bacteris làctics, l'espècie *Oenococcus oeni* (abans *Leuconostoc oenos*), responsable directe de la FML, ja que és l'espècie millor adaptada a les condicions del vi (Versari i col., 1999). Aquest bacteri, i els altres bacteris làctics trobats al vi dels gèneres *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Pediococcus* provenen de la superfícies del raïm i les fulles, i del material del celler. Al most tenen un petit creixement, que és ràpidament inhibit per la proliferació dels llevats, passant a un estat de latència. L'enriquiment d'etanol del medi fa que es seleccioni positivament *O. oeni* en detriment d'altres bacteris. Finalitzada la FAL, l'autòlisi dels llevats aporta nutrients, factors de creixement i de protecció enfront a àcids grassos tòxics, permetent el proliferament d'*O. oeni*. Arribada a una població de  $10^6$  cèl·lules/ml té l'inici la FML (Lonvaud-Funel i col., 1991). La FML consisteix en la descarboxilació de l'àcid L-(-)-màlic a àcid L-(+)-làctic amb formació de diòxid de carboni, produint-se una disminució de l'acidesa del vi. Aquesta disminució d'acidesa és el principal benefici de la FML, especialment en vins produïts en regions de clima fred, on el raïm té un contingut més alt d'àcid L-(-)-màlic (Wibowo i col., 1985). A banda d'aquest benefici, la FML dona major estabilitat microbiològica al vi per la desaparició d'àcid L-(-)-màlic i d'altres nutrients (Rankine i Bridson, 1971) i es generen una sèrie de compostos que donen major complexitat aromàtica al vi i n'arrodoneixen el bouquet (Laurent i col., 1994).

Uns dels defectes que poden induir els bacteris làctics al vi és l'anomenada picadura làctica. En mostos amb poblacions altes de bacteris làctics (veremes podrides o poc sulfitades) i en situacions d'aturada o alentiment de la FAL per manca d'imposició dels llevats fermentatius, els bacteris làctics proliferen fermentant els sucres i produeixen àcid D-(-)-làctic, àcid acètic i etanol. D'aquesta manera es produeix una acidificació del vi, així com un augment de l'acidesa volàtil (Sponholz, 1993).

Huang i col., 1996 i Edwards i col., 1999, assenyalen que algunes espècies i soques de *Lactobacillus* poden estar implicades en aturades i alentiments en la FAL, no només degut l'augment del contingut d'àcid acètic en el medi sinó a l'existència d'altres mecanismes antagònics als llevats.

L'avinagrament del vi està motivada principalment per la proliferació de bacteris acètics, com són: *Acetobacter pasteurianus*, *A. aceti* i *Gluconobacter oxydans*. L'etanol

s'oxida a acetaldèhid per l'alcohol dehidrogenasa, i llavors l'acetaldèhid s'oxida a àcid acètic per l'acetaldèhid dehidrogenasa. Aquests bacteris poden incidir sobre la qualitat del vi a nivell de raïm (veremes malmeses), fermentació alcohòlica i emmagatzement del vi al celler. Tenen un metabolisme oxidatiu, per la qual cosa la seva incidència és mínima durant FALs no problemàtiques. A més, d'àcid acètic, la proliferació d'aquest bacteris fan augmentar el continguts d'acetaldèhid, acetat d'etil i dihidroxiacetona provinent del metabolisme del glicerol (Sponholz, 1993).

### 3 Fermentacions a baixes temperatures

En certes vinificacions tradicionals europees la FAL es desenvolupa a temperatures per sota de 20 °C, mentre que la temperatura òptima de creixement per *S. cerevisiae* es situa a voltant de 25 °C. Així, moltes d'aquestes vinificacions parteixen de veremes tardanes i/o pansificades o botrititzades que són fermentades en ple hivern, quan en alguns casos la temperatura del celler està a voltant de 4 °C. Les FALs d'aquestes vins es caracteritzen per la seva durada, en ocasions varis mesos, i l'aturada prematura donant vins amb sucres residuals, com el vi de Sauternes, vin de Paille del Jura o Vinosanto grec. En altres casos, la FAL es reactiva a la primavera consumint totalment el sucre, com el cas de l'Amarone del Valpolicella italià. La segona fermentació en ampolla dels escumosos, Cava, Champagne i Zitsa grec, també transcorre a l'hivern (Jobé, 1982; Argiriou i col., 1996; Torriani i col., 1998).

Per una altra banda, el consumidor demana vins blancs i rosats aromàtics i fruitats, els quals s'aconsegueixen amb FALs portades per sota de 20 °C. El caràcter exergònic de la FAL, l'augment de volum dels recipients de fermentació, amb la conseqüent disminució de superfície de dissipació de calor respecte al volum, i l'elaboració d'aquest vins en països càlids implica la necessitat de forçar la refrigeració de manera artificial (Ribéreau-Gayon i col., 1998).

#### 3.1 Influència de la temperatura sobre les poblacions de llevats

De tots els factors implicats en la vinificació, la temperatura té l'efecte més clar sobre el creixement dels llevats i l'ecologia de la fermentació. La velocitat de creixement i la població màxima incrementa amb la temperatura fins a un màxim que

correspon a la temperatura òptima. Els llevats no-*Saccharomyces*, en concret soques de *K. apiculata*, creixen millor a baixes temperatura que *S. cerevisiae*, de manera que contribueixen incisivament en el conjunt de la fermentació (Fleet i col., 1989; Charoenchai i col., 1998). Egli i col., 1998, indiquen que la regulació de la temperatura és una eina important pels elaboradors en la selecció de llevats no-*Saccharomyces* i *Saccharomyces*. A més desaconsellen, l'elaboració a baixes temperatures sense la inoculació de llevats seleccionats pel perill que llevats no-*Saccharomyces* que siguin grans productors de substàncies volàtils desagradables es tornin dominants sota aquestes condicions.

### 3.2 Soques criotolerants de *Saccharomyces*

Les quatre espècies actualment reconegudes de *Saccharomyces sensu stricto* es consideren habitualment mesofíliques respecte a la temperatura (Watson, 1993). Amb tot, exhibeixen diferents rangs de temperatura de creixement. Així doncs, *S. cerevisiae* i *S. paradoxus* tenen una temperatura òptima de creixement major a 30 °C i una temperatura màxima de creixement per sobre de 37 °C, mentre que *S. bayanus* i *S. pastorianus* tenen una temperatura òptima de creixement per sota de 30 °C i la temperatura màxima sempre és per sota a 37 °C. Aquests llevats són anomenats criotolerants, criofílics o psicrotolerants, i s'aïllen normalment en vinificacions tradicionalment realitzades a baixes temperatures (Torriani i col., 1998). Algunes soques amb característiques semblants a *S. cerevisiae* i temperatures òptimes de creixement comparables a *S. cerevisiae* i *S. paradoxus*, poden fermentar correctament per sobre de 42 °C. Degut a aquesta darrera característica s'anomenen termotolerants (Rainieri i col., 1998). Per tant, alguns estudis donen importància a la temperatura com a criteri taxonòmic (van Uden i Farinha, 1958; Walsh i Martin, 1977; Vaughan-Martini i Martini, 1993). Un fet que suporta aquesta idea és que els híbrids entre soques de *Saccharomyces* criotolerants i no-criotolerants són estèrils (Zambonelli i col., 1993; Kishimoto, 1994). Giudici i col., 1998, precisen que encara que existeixin totes aquestes evidències, la posició taxonòmica exacta dels criotolerants no està totalment definida.

Els rangs de temperatures a les que les soques criotolerants poden desenvolupar la FAL va entre 6 °C i 30 °C, i inclús al voltant de 0 °C (Argiriou i col., 1996). Generalment, produeixen grans quantitats de glicerol i àcid succínic, baixes quantitats

d'àcid acètic, i solen sintetitzar àcid màlic en lloc de degradar-ne (a diferència de les soques mesofíliques i termotolerants). La sobreproducció d'aquests compostos es contraresta en detriment de la formació d'etanol. Una altra característica enològica de les soques criotolerants és la major sensibilitat al SO<sub>2</sub>. Les soques criotolerants desenvolupen aquestes característiques interessants a les temperatures òptimes o subòptimes (18 °C a 24 °C) (Castellari i col., 1995).

### **3.3 Solucions a l'estrès tèrmic en el moment de la inoculació**

La inoculació del most a fermentar amb LSA implica una rehidratació prèvia amb aigua calenta (35 °C a 42 °C, segons fabricant). Aquest procés i la inoculació dels llevats rehidratats en un most més fred poden representar un estrès fisiològic dels llevats inoculats que condicioni el correcte funcionament de la FAL (Bauer i Pretorius, 2000).

Du Plessis, 1983, proposa la rehidratació dels LSA a temperatures més baixes o a la temperatura de fermentació. Les proves fetes indiquen un inici de fermentació molt més ràpids per a les temperatures de rehidratació més baixes. L'efecte de la temperatura de rehidratació en el temps de fermentació global es torna menys accentuat, la qual cosa fa pensar en una interacció soca de llevat/temperatura de rehidratació.

Una altra solució aquest estrès tèrmic és el creixement previ del llevat a inocular a la temperatura de fermentació (Argiriou i col., 1996). Aquests autors realitzen un tractament d'adaptació de soques criotolerants, la qual cosa permet una major activitat en fermentacions a baixes temperatures.



**PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL**





## **PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL**

El plantejament global del present treball, condicionants de la fermentació alcohòlica, es va realitzar seguint els objectius determinats com s'exposen a continuació. Tot el treball roman emmarcat en l'estudi de fermentacions de mostos de fermentabilitat difícil i de fermentacions a baixa temperatura (13 °C).

### 1<sup>er</sup> Objectiu. Caracterització de les fermentacions a baixes temperatures de varietats de mostos amb fermentabilitat compromesa.

A partir de mostos frescs subministrats per les bodegues Miguel Torres, S.A. durant la verema de 1996 es van portar a terme microvinificacions al laboratori. El tret comú dels mostos subministrats era presentar antecedents de dificultat fermentativa, observades en campanyes anteriors.

Es varen assajar dues temperatures de fermentació, l'habitual (17 °C) per a fermentacions a temperatura controlada en l'elaboració de vins blancs i rosats, i a baixa temperatura (13 °C). Així mateix, es va estudiar l'efecte sobre la fermentació dels adjuvants nutritius, subministrats als mosts segons l'ús habitual en el celler que té en compte la varietat del most.

Les anàlisis de la composició dels mostos varen permetre trobar relacions amb el desenvolupament de la fermentació alcohòlica. Per una altra banda, l'anàlisi dels vins i la comparació amb la composició del most d'on provenen va servir per estudiar els efectes de la varietat del most, temperatura de fermentació i afegiments d'adjuvants nutritius sobre la composició dels vins i en concret sobre compostos rellevants en la qualitat del vi.

### 2<sup>on</sup> Objectiu. Interrelació dels adjuvants nutritius i llevats en el desenvolupament de la fermentació alcohòlica a baixa temperatura.

Es va avaluar l'eficiència com a activadors de fermentació de dos adjuvants nutritius mitjançant microfermentacions de most fresc de la verema de 1997, a temperatura habitual (17 °C) i a temperatura baixa (13 °C). L'estudi es va realitzar de manera que permetés valorar els efectes tant del subministrament individual, com

conjunt, per verificar possibles efectes sinèrgics. Aquestes fermentacions es van portar a terme inoculant dues soques de llevats comercials diferents per comprovar la influència de la soca sobre l'assimilació dels nutrients i en definitiva l'eficàcia dels adjuvants nutritius. A part d'un seguiment de la cinètica fermentativa, l'estudi va consistir en descriure la dinàmica poblacional dels llevats al llarg de la fermentació, el consum d'amoni, el consum diferencial de glucosa i fructosa, i s'analitzaren els continguts de glicerol i àcid acètic dels vins resultants.

Fora de campanya de la verema, i per tant a partir de most que s'havia conservat congelat des de la campanya anterior (verema 1997) i esterilitzat es va estudiar l'efecte sobre la cinètica fermentativa a baixa temperatura de diferents dosis de fosfat de diamoni (FDA), font barata de nitrogen disponible pels llevats.

A partir del mateix most, es realitzaren una sèrie de microvinificacions amb la idea de valorar la incidència sobre el desenvolupament de la fermentació alcohòlica dels llevats nadius i en concret del llevat *Candida stellata*, aïllat dels mostos frescs emprats.

### 3<sup>er</sup> Objectiu. Pre-adaptació a la temperatura de fermentació alcohòlica de llevats vínics.

Amb la idea de millorar el procés fermentatiu a baixes temperatures es varen assajar dues soques de llevats comercials crescudes prèviament a la temperatura de fermentació, ja sigui 13 °C o 17 °C. Aquestes fermentacions es van comparar amb les portades a terme per una soca criotolerant. El most fermentat consistia en un most fresc de la varietat Carinyena de la campanya de 1998.

S'analitzaren l'evolució dels compostos nitrogenats (amoni i aminoàcids) al llarg de la fermentació alcohòlica, dinàmica poblacional dels llevats i la composició dels vins per avaluar l'efecte de l'ús d'inòculs pre-adaptats a la temperatura de fermentació.

## RESULTATS I DISCUSSIÓ



## A) CARACTERITZACIÓ DE LES FERMENTACIONS A BAIXES TEMPERATURES DE VARIETATS DE MOSTOS AMB FERMENTABILITAT COMPROMESA

Durant la campanya de verema de 1996, Miguel Torres, S.A. va subministrar cinc mostos d'origens diferents d'arreu de Catalunya. Tots aquests mostos coincideixen en tenir graus probables elevats i antecedents de fermentabilitat problemàtics. Tres dels cinc mostos són de varietats blanques, Garnatxa Blanca, Chardonnay i Riesling, i els altres dos de varietats negres, Pinot Noir i Carinyena. Aquests mostos arriben al laboratori tractats com s'indica a l'apartat 1.2 de l'annex I, sulfitats i amb l'acidesa corregida als valors habituals del celler. A la Taula 15 s'indiquen els valors dels paràmetres bàsics i tractaments específics dels mostos de partida.

**Taula 15.** Característiques dels mostos emprats.

	Chardonnay	Garnatxa blanca	Riesling	Carinyena	Pinot noir
Sucre (g/l)	230	220	260	220	206
Acidesa total (g àcid tartàric/ l)	6,8	7,6	9,6	8,0	8,0
pH	3,40	3,29	3,19	3,20	3,47
SO <sub>2</sub> total (mg/l)	60	10	42	29	20
Tractament pre-fermentatiu	Desfangat	Desfangat 1g/100kg enzim Sankyo	Desfangat	Macerat Sagnat 10g/Hl bentonita	Macerat Sagnat 10g/Hl bentonita

Per a cada most es fan dos lots, en un no es fa cap tractament i en l'altre s'afegeixen additius nutritius utilitzats habitualment en el celler que es descriuen a la Taula 16. Pel cas del most de Riesling s'afegeixen els nutrients al sisè dia d'inoculació en fermentadors sense afegiment inicial. Veure Figura 9.

El fosfat de diamoni [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>] (FDA) conté un 21,1 % de nitrogen disponible pels llevats (ND) en forma d'amoni.

Segons el productor, la composició de Fermaid K (FDK) és de 29,85 % en fosfat de diamoni; un 31 % en sulfat de magnesi ; 39 % en llevats inactius (soca 2122); un 0,15 % d'hidroclorit de tiamina; i traces d'àcid fòlic, niacina i pantotenat càlcic. De manera que 1 g/l de FDK representa 100 mg de ND per litre.

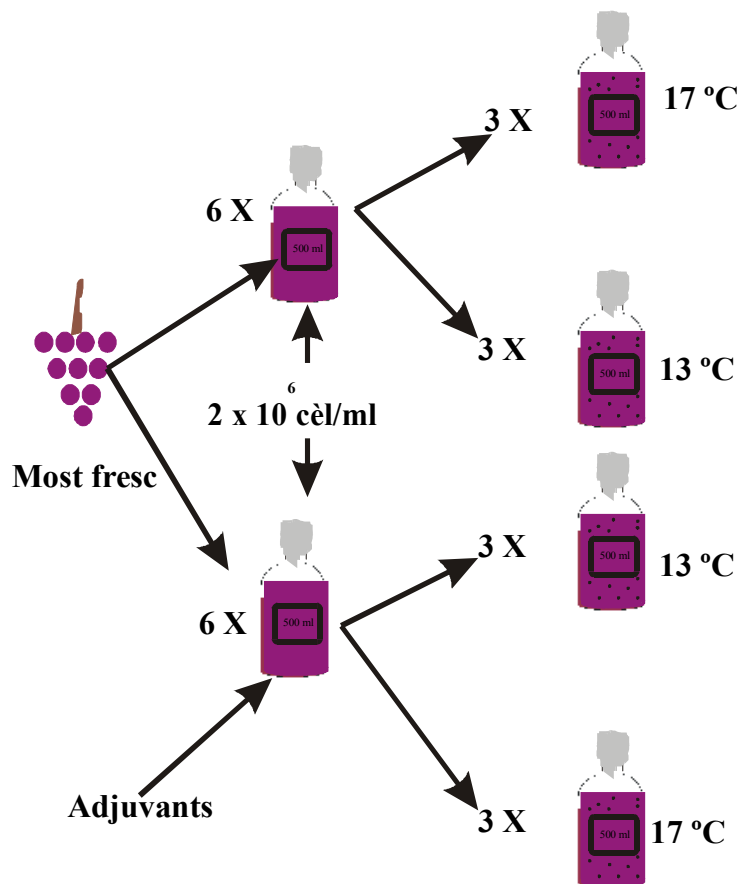
**Taula 16.** Adjuvants nutritius emprats, quantitats i moment d'aplicació.

	Chardonnay	Garnatxa blanca	Riesling	Carinyena	Pinot noir
Fosfat de diamoni (g/l)	0,2 (inici)	2 (inici) <sup>2</sup>	0,2 (dia 6)	0,2 (inici)	0,2 (inici)
Fermaid K ® (g/l) <sup>1</sup>	-	3 (inici) <sup>2</sup>	0,13 (dia 6)	0,2 (inici)	0,2 (inici)

<sup>1</sup>Lallemand Inc, Montreal, Quebec, Canadà. <sup>2</sup>Quantitats 10 vegades les habituals.

Per tal de portar a terme l'experiment, s'omplen per cada lot sis ampolles de 500 ml, que representen tres rèpliques de fermentacions portades a 17 °C (temperatura de fermentació habitual per a vinificació en blanc i rosat) i tres portades a 13 °C (fermentacions a baixa temperatura).

Cada ampolla s'inocula amb el llevat comercial Enoferm M2 (Lallemand Inc, Montreal, Quebec, Canadà) a una població inicial de  $2 \times 10^6$  cèl./ml, preparat com s'indica a l'apartat 1.4 de l'annex I. Aquest llevat s'ha identificat com pertanyent a l'espècie *Saccharomyces cerevisiae* i s'ha tipificat (Annex III).

**Figura 9.** Distribució dels microfermentadors per most.

Es realitzà un seguiment de la fermentació i de la població de cada microfermentació, s'analitzaren els components nitrogenats (amoni, aminoàcids, proteïna) dels mostos i dels vins resultants, així com altres productes trobats als vins (etanol, glicerol, àcid acètic, àcid succínic, acetaldehid, acetat d'etil, i alcohols superiors), seguint la metodologia descrita a l'annex I.

## 1 Composició dels mostos

El contingut en sucre de tots els mostos és superior a 200 g/l (Taula 15), la qual cosa representa graus probables que van de 12,1 a 15, 3% (v/v). Els alts continguts en sucre augmenten els riscos d'alentiments i aturades de fermentació (Lafon-Lafourcade i col., 1979; Dubois i col., 1996). Per una altra banda, l'acidesa total està equilibrada amb el contingut de sucre (o grau alcohòlic probable) favorable per a l'elaboració de vins blancs i rosats tranquils. Aquest equilibri indica també, que el raïm s'ha veremat amb un grau de maduració alt, que pot representar una disminució del contingut de nitrogen disponible (ND) pels llevats en el most resultant (Feuillat i col., 1998). El raïm va entrar al celler en òptimes condicions sanitàries i per tant es va optar per un sulfitat lleuger, com mostren els valors de sulfurós total (Taula 15).

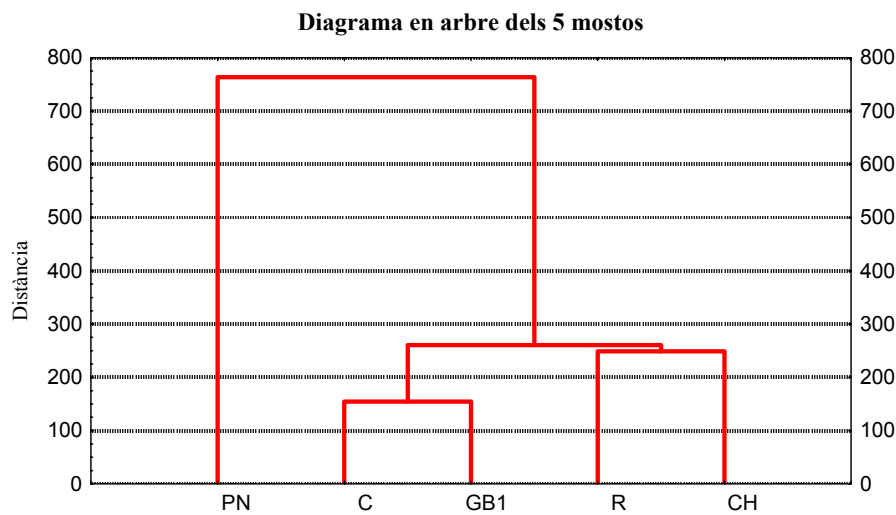
S'aprecien grans diferències respecte a la composició de compostos nitrogenats entre els mostos (Taula 17 i Taula A4 de l'annex II, i Figures 10 i 11). S'ha descrit que la disparitat de les quantitats d'amoni, aminoàcids totals, proteïna i de ND entre els mostos té un origen varietal (Lamikanra i Inyang, 1988; Huang i Ough, 1991; Jiranek, 1992; Dubois i col., 1996), influenciat per un efecte del terrer i de les pràctiques de conreu (Ooghe i col., 1981; Ough i Kriel, 1985; Paetzold i col., 1990; Spayd i Andersen-Bagge, 1996).

**Taula 17.** Compostos nitrogenats del most.

	Chardonnay	Garnatxa blanca	Riesling	Carinyena	Pinot noir
<b>Amoni (mg/l)</b>	114	204	80	70	142
<b>Aminoàcid (mg Gly/l)<sup>1</sup></b>	1980	1231	1120	750	2290
<b>Proteïna (mg BSA/l)<sup>2</sup></b>	105	19	57	179	96
<b>Nitrogen disponible (mg/l)<sup>3</sup></b>	407	328	351	194	640

<sup>1</sup> Quantitat total d'aminoàcids determinat per la tècnica de la ninhidrina, expressat en quantitat de glicina. <sup>2</sup> BSA, albúmina sèrica bovina. <sup>3</sup> nitrogen contingut en les quantitats d'amoni i aminoàcids excepte prolina.

D'entre els aminoàcids, l'aminoàcid majoritari en tots els mostos és l'arginina (veure Taula A4 de l'annex II i Figura 12), que juntament amb la prolina haurien de ser els aminoàcids predominants (Feuillat i col., 1998). Les quantitats observades de prolina no són tant elevades com es podria pensar en un principi. Sabent que la prolina s'acumula en la baia a mesura que avança la maduració ( Ough, 1968; Kliewer, 1970), podria indicar que el raïm es va collir amb grau de maduració alt però no màxim. La quantitat més gran d'arginina es troba en el most de varietat Pinot Noir i de prolina pel most de la varietat Chardonnay, trets varietals descrits en treballs anteriors (Huang i Ough, 1991; Sauvage i col., 1993). Cal destacar la no detecció de glutamina en el most de Pinot Noir, mentre que aquest aminoàcid està en quantitats relativament importants en els altres mostos.

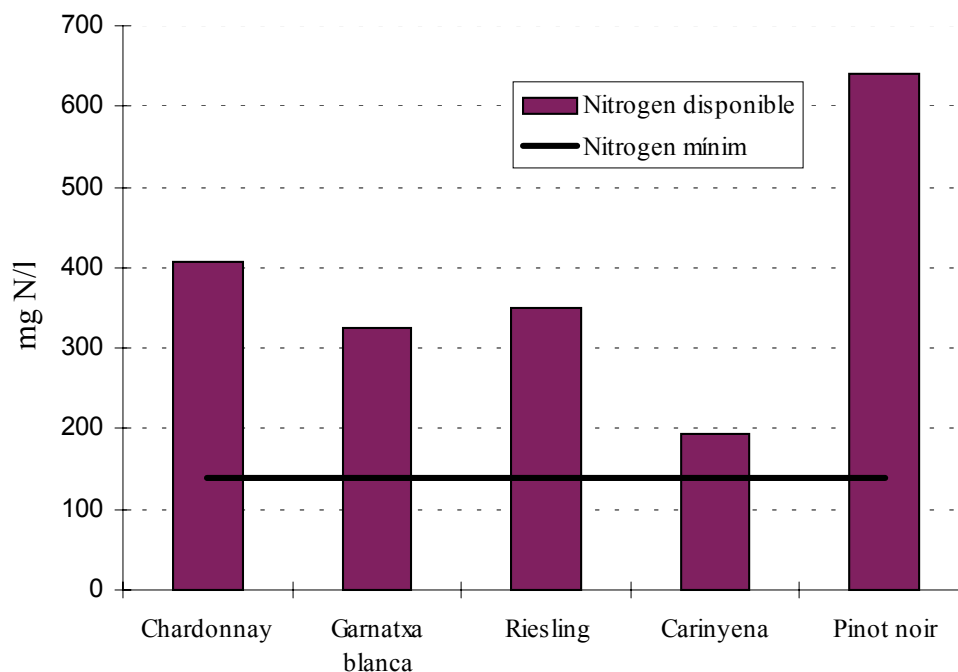


**Figura 10.** Anàlisi d'agrupament jeràrquic dels 5 mostos en base a la composició d'aminoàcids. PN: Pinot noir. C: Carinyena. GB1: Garnatxa blanca. R: Riesling. CH: Chardonnay.

L'anàlisi d'agrupament jeràrquic ascendent ("clusters", veure annex I) de la composició dels aminoàcids dels 5 mostos (Figura 10) remarquen la disparitat de la varietat Pinot noir respecte als altres mostos. Per una altra banda, les varietats tradicionalment autòctones, Carinyena i Garnatxa blanca, i les varietats septentrionals, Riesling i Chardonnay, s'agrupen en dos grups ben diferenciats. Sembla indicar que factors genètics, climàtics i de pràctiques de conreu determinarien les diferències trobades en la composició d'aminoàcids entre les varietats de mostos.



Referent al contingut total dels aminoàcids individualitzats no coincideix exactament amb el valor total d'aminoàcids determinat per la tècnica de la ninhidrina, encara que la tendència es manté. Aquesta darrera tècnica és bastant inespecífica ja que la ninhidrina reacciona amb els compostos que contenen un grup amino, entre ells l'amoni, proteïna, pèptids, urea, ... La interferència de l'amoni es soluciona realitzant la valoració de la ninhidrina amb una recta patró d'amoni, i s'infereix l'absorbància que hi representa a la mostra la quantitat coneguda d'amoni (veure apartat 4.2 de l'annex I).



**Figura 11.** Nitrogen disponible (mg N/l) dels mostos emprats. Comparació amb el mínim de nitrogen disponible (140- 150 mg/l).

Tots els mostos superen àmpliament, a excepció del most de Carinyena, el valor de nitrogen disponible mínim (Figura 11) que es considera necessari per a que els llevats puguin desenvolupar la fermentació alcohòlica, que es situa entre els valors de 140 i 150 mg de ND per litre (Bely i col, 1990; Bisson, 1991). La quantitat de ND del most de Carinyena supera lleugerament aquest valor mínim, i estaria dins del marge de 150-250 mg N/ml en que Trioli (1995), considera que pot estar compromesa la qualitat del vi, encara que no la cinètica fermentativa. Per sobre de 250 mg N/l es trobarien els valors de ND de seguretat tant per a la cinètica fermentativa com per a la qualitat final del vi.

## 2 Composició nitrogenada de l'adjuvant nutritiu Fermaid K

L'anàlisi dels components nitrogenats de FDK (Taula 18) mostra que ND està en forma d'amoni. Existeix una gran disparitat entre la determinació d'aminoàcids mitjançant el mètode de la ninhidrina i el sumatori total dels aminoàcids analitzats per HPLC, degut segurament a la inespecificitat del primer mètode. Aquestes determinacions indiquen que FDK conté poques quantitats d'aminoàcids que aportin nitrogen assimilable pels llevats, tenint en compte a més que la concentració d'adjuvant analitzada correspon aproximadament a 10 vegades la dosi habitualment emprada.

**Taula 18.** Compostos nitrogenats de l'adjuvant Fermaid K a 3 g/l.

<b>Amoni (mg/l)</b>	686		
<b>Aminoàcid (mg Gly/l)<sup>1</sup></b>	2646		
<b>Proteïna (mg BSA/l)<sup>2</sup></b>	14,3		
<b>Nitrogen disponible (mg/l)<sup>3</sup></b>	540		
<b>Aminoàcids (mg/l)</b>			
<b>Asp</b>	1,9	<b>Tyr</b>	1,4
<b>Glu</b>	9,2	<b>Aba<sup>5</sup></b>	n.d.
<b>Cys</b>	n.d.	<b>Val</b>	3,0
<b>Asn</b>	1,0	<b>Met</b>	0,4
<b>Ser</b>	1,5	<b>Trp</b>	0,7
<b>His</b>	0,8	<b>Phe</b>	2,4
<b>Gln</b>	1,2	<b>Ile</b>	2,5
<b>Gly</b>	1,2	<b>Leu</b>	3,3
<b>Thr</b>	1,7	<b>Orn</b>	3,9
<b>Cit</b>	0,5	<b>Lys</b>	0,9
<b>Arg</b>	0,5	<b>Hpro</b>	n.d.
<b>Ala</b>	6,9	<b>Pro</b>	20,3
<b>Tau</b>	0,2	<b>TOTAL</b>	68,7
<b>Gaba<sup>4</sup></b>	3,5		

<sup>1</sup> Quantitat total d'aminoàcids determinat per la tècnica de la ninhidrina, expressat en quantitat de glicina.

<sup>2</sup> BSA, albúmina sèrica bovina. <sup>3</sup> nitrogen contingut en les quantitats d'amoni i aminoàcids excepte prolina.

<sup>4</sup> àcid  $\gamma$ -aminobutíric. <sup>5</sup> àcid  $\alpha$ -aminobutíric. n.d.: no detectat.

A partir d'aquestes anàlisis es comprova que un 1 g/l de FDK aporta en forma de ND 180 mg N/l, valor del mateix ordre que el que indica el fabricant.

### 3 Composició nitrogenada dels mostos suplementats

L'addició dels adjuvants nutritius FDA i FDK als mostos (Taules 17 i 19) fa incrementar les quantitats d'amoni, aminoàcids totals determinats pel mètode de la ninhidrina i el valor ND, i no significativament les quantitats de proteïna. Aquests increments són notables pel most de Garnatxa blanca al qual s'afegeix una dosi 10 vegades superior a la habitual, que fa que la proteïna s'incrementi poc més d'un 60 %. Per a la resta dels mostos, els adjuvants representen com a mínim un increment del 30 % d'amoni, un 10 % d'aminoàcids totals i més d'un 13 % de ND. Aquest s'aportaria majoritàriament en forma d'amoni del FDA inclòs en el FDK, i/o del FDA directament.

S'observa al dia 6 per a les fermentacions de Riesling un descens dels compostos nitrogenats fruit de l'assimilació dels llevats, a excepció de la proteïna. Aquest descens és més important per a les fermentacions a 17 °C, i està amortida per la contribució dels adjuvants.

**Taula 19.** Compostos nitrogenats dels mostos suplementats.

	<b>Chardonnay</b> (0,2 g/l FDA)	<b>Garnatxa blanca</b> (2 g/l FDA+3 g/l FDK)	<b>Riesling<sup>4</sup></b> (0,2 g/l FDA+0,13 g/l FDK)	<b>Carinyena</b> (0,2 g/l FDA+0,2 g/l FDK)	<b>Pinot noir</b> (0,2 g/l FDA+0,2 g/l FDK)
<b>Amoni (mg/l)</b>	163	1592	40/64	140	198
<b>Aminoàcid (mg Gly/l)<sup>1</sup></b>	2000	3877	384/648	1090	2520
<b>Proteïna (mg BSA/l)<sup>2</sup></b>	105	50	8,0/8,3	166	108
<b>Nitrogen disponible (mg/l)<sup>3</sup></b>	734	1415	74/232	242	743

<sup>1</sup> Quantitat total d'aminoàcids determinat per la tècnica de la ninhidrina, expressat en quantitat de glicina.  
<sup>2</sup> BSA, albúmina sèrica bovina. <sup>3</sup> nitrogen en forma d'amoni i aminoàcids excepte prolina. <sup>4</sup>Correspon a les determinacions mitjanes dels mostos-vins suplementats al sisè dia des de l'inoculació per les fermentacions a 17 °C i a 13 °C (17 °C/13 °C).

Els adjuvants no modifiquen els perfils característics dels aminoàcids dels mostos (Taules A4 i A5 de l'annex II), de manera que l'anàlisi d'agrupament reuneix el most original i el most amb adjuvants en un mateix grup, mantenint-se la distribució per varietats de mostos de la Figura 11. A la vista de la composició aminoacídica del FDK (Taula 18) i dels mostos suplementats inicialment (Taula A5 de l'annex II), aquest

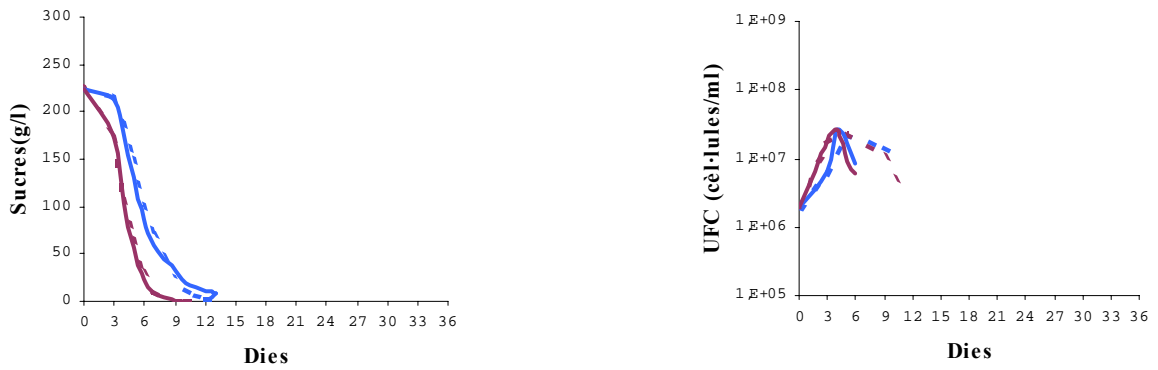
adjuvant no aporta una quantitat significativa d'aminoàcids al most, i les petites diferències observades respecte al most original (Taula A4 de l'annex II) són degudes a errors propis de la metodologia de determinació dels aminoàcids.

Es verifica un descens de més del 90 % per a gran part dels aminoàcids al dia 6 de les fermentacions de Riesling. Aquest descens és menor per a la glutamina, àcid glutàmic, glicina i prolina. Això coincideix amb les observacions que indiquen que les fonts nitrogenades s'assimilen als primers moments de la fermentació (Bisson, 1991). Altres aminoàcids, la taurina, ornitina, lisina, i asparagina i àcid  $\gamma$ -aminobutíric, augmenten les seves quantitats.

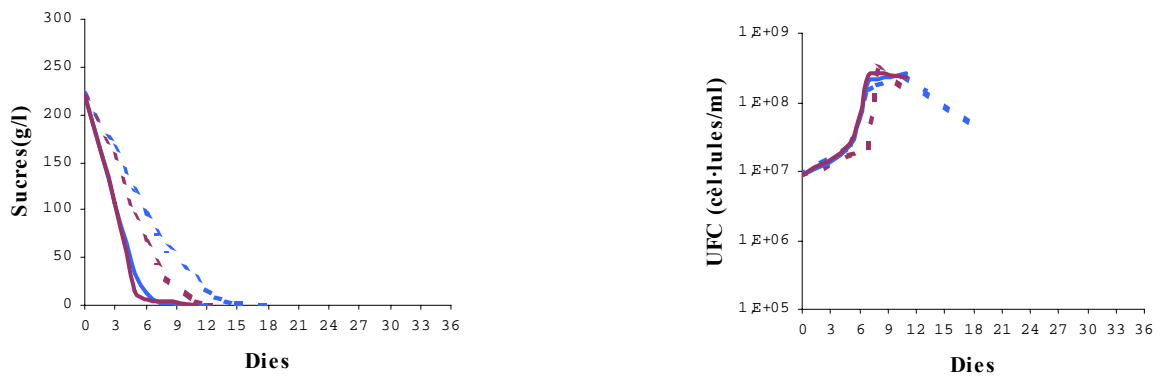
#### **4 Descripció de les cinètiques i paràmetres fermentatius**

Les representacions de les cinètiques de la FAL ens mostren si el procés s'ha desenvolupat correctament. Els perfils de les fermentacions (Figura 12) de Chardonnay, Garnatxa blanca i Pinot noir, tots portats a 13 °C i 17 °C, s'ajusten al perfil tipus que Bisson i Butzke, 2000, indiquen com a pròpies de les soques de *S. bayanus* Prise de Mousse. Aquestes es caracteritzen per desenvolupar fermentacions amb períodes de latències curts, assoleixen la velocitat màxima en poc temps una vegada superat el temps de latència, i la velocitat màxima no es manté molt de temps. En contrast, descriuen un altre perfil tipus de les soques pròpies de *S. cerevisiae* Epernay II descrites com a ferments lents, caracteritzades per mostrar latències llargues, trigar en assolir la velocitat màxima, i velocitats màximes baixes però de durada prolongada. Cal assenyalar que encara que aquestes fermentacions s'ajusten a les fermentacions tipus soques de *S. bayanus*, el llevat inoculat és de l'espècie *S. cerevisiae*, i per tant si bé aquest models descriuen dos desenvolupaments correctes de la FAL, no es poden associar a una espècie concreta de llevat, i sí a unes condicions de desenvolupament de la FAL, que inclourien la soca inoculada, característiques dels most i temperatura de fermentació.

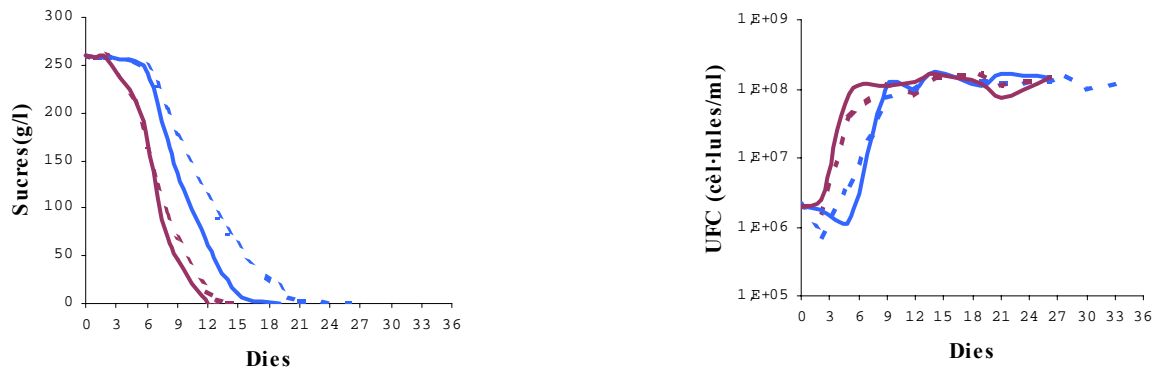
### Chardonnay



### Garnatxa blanca

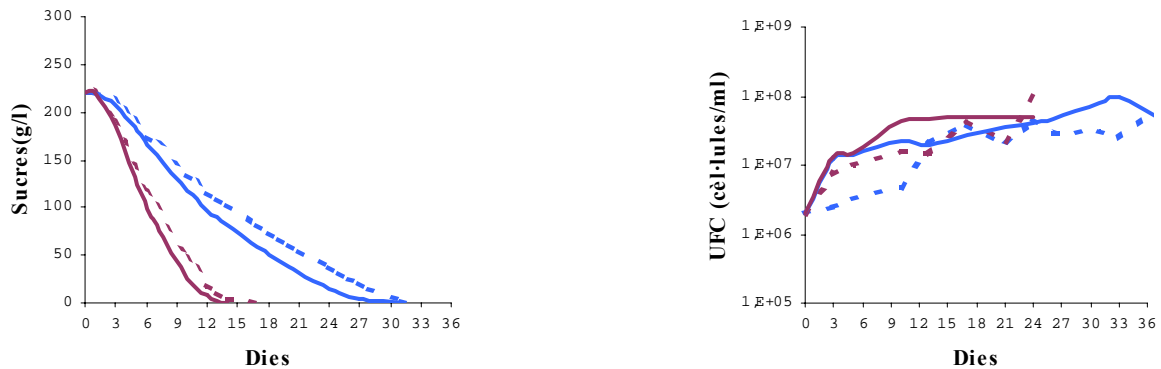


### Riesling

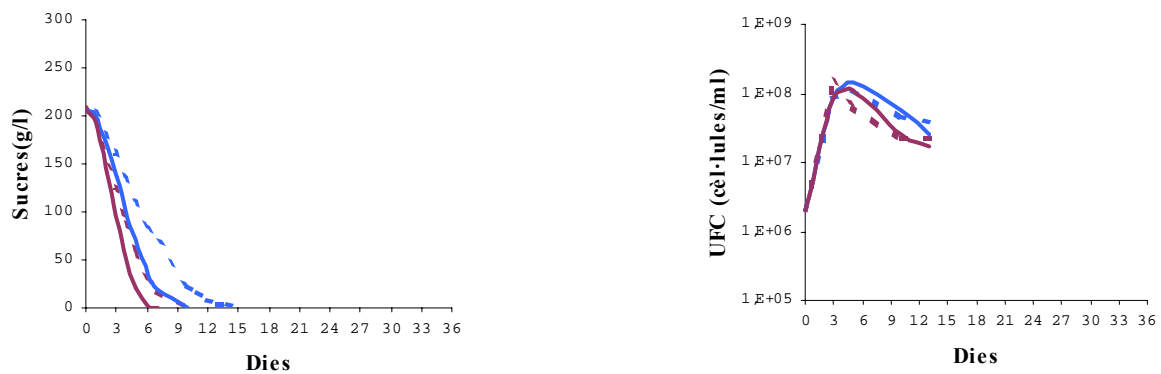


**Figura 12.** Representacions de les cinètiques fermentatives i de creixement de viables per cada un de les varietats de mostos. — i — fermentacions de mostos suplementats, a 17 °C i 13 °C respectivament. ····· i ······ fermentacions de mostos no suplementats, a 17 °C i 13 °C respectivament.

## Carinyena



## Pinot noir



**Figura 12. (cont.).** Representacions de les cinètiques fermentatives i de creixement de viables per cada un de les varietats de mostos. — i — fermentacions de mostos suplementats, a 17 °C i 13 °C respectivament ..... i ..... fermentacions de mostos no suplementats, a 17 °C i 13 °C respectivament.

Les fermentacions a 17 °C i 13 °C de Riesling i de Carinyena (Figura 12), donen lloc a perfils de fermentació que no s'ajusten al dos tipus descrits, i per tant indicaria que la fermentació alcohòlica s'ha desenvolupat de manera problemàtica.

Així, per a les fermentacions del most Riesling, el temps de latència és anormalment prolongat, si més no una vegada superada la latència la velocitat de fermentació recupera els valors esperats. Una baixada inicial de la viabilitat dels llevats com es mostra en la corba de recompte de viables (Figura 12) explicaria la prolongació de la latència. Aquesta baixada de viabilitat inicial podria ser motivada per un estrès provocat per l'elevada concentració de sucre del most Riesling (Lafon-Lafourcade, 1983), que supera àmpliament les concentracions de sucre dels altres mostos assajats

(Taula 15). Cal remarcar, que la viabilitat dels llevats a final de la fermentació és molt més prolongada que en les altres fermentacions. L'adaptació a l'estrès inicial durant la latència hauria permès un augment de viabilitat a final de fermentació.

Respecte a les fermentacions de Carinyena, aquestes es verifiquen lentes al llarg de tot el procés. A més, el nombre de cèl·lules viables màxim no arriba a les  $10^8$  cèl/ml (Figura 12) i el creixement es constata difícilment. Aquesta manca de població viable de llevat fermentador determina unes fermentacions alentides. La presència important de població de llevats no-*Saccharomyces*, en concret de *Candida stellata* (dades no mostrades) al llarg de tota la fermentació que competeix pels nutrients amb el llevat inoculat, i el fet de que el most de Carinyena conté quantitats de ND properes al mínim necessari (veure Taula 17 i Figura 11) comprometen la fermentabilitat d'aquest most.

La temperatura de fermentació marca de manera significativa el desenvolupament de la fermentació com es mostra a les corbes de cinètica fermentativa (Figura 12) i als valors de paràmetres cinètics (Taula 20). A 13 °C, disminueixen les velocitats màximes i es prolonga la durada de la fermentació en comparació a les fermentacions portades a 17 °C. Aquest fet està en acord amb l'observació que el temps de generació dels llevats durant la FAL s'incrementa al disminuir la temperatura (Charoenchai i col., 1998).

A més, els mostos de fermentabilitat compromesa veuen ampliat els problemes fermentatius a 13 °C. Així, pel most de Riesling augmenta encara més el temps de latència. L'increment del temps de generació fa que es necessiti major temps d'adaptació. Favorablement, la baixa temperatura pot reduir els efectes tòxics d'etanol sobre el ritme fermentatiu per disfunció de les proteïnes transportadores, al contrarestar l'augment de la fluïdesa a nivell de membrana plasmàtica dels llevats (Bisson, 1999). Pel que fa a les fermentacions del most de Carinyena, les velocitats màximes disminueixen i els temps total de fermentació es perllonga de manera notòria. A baixes temperatures, el creixement de *C. stellata* estaria afavorida enfront al llevat inoculat. Així mateix, s'incrementa la tolerància a l'etanol (Gao i Fleet, 1988) al qual els llevats no-*Saccharomyces* són molt sensibles a temperatures més elevades. Per una altra banda, es pot pensar que la població de microorganismes silvestres s'enriqueix abans de la inoculació durant la maceració (Thomas i Ingledew, 1992). Per tot això, la competència

de *C. stellata* enfront al llevat inoculat s'intensifica a baixes temperatures i pot ser una de les causes de l'alentiment.

**Taula 20.** Paràmetres cinètics de la fermentació.

	T	Chardonnay	Garnatxa	Riesling	Carinyena	Pinot Noir
<b>Blanca</b>						
<b>Temps de latència (dies)</b>	17°C	3	3	5	3	1
	13°C	3	3	6	3	3
<b>Velocitat màxima de fermentació (g sucre/l dia)</b>	17°C	47,8±0,8	28,8±0,7	35,9±2,2	25,5±0,7	35,3±0,9
	13°C	40,5±0,8 <sup>v,t</sup>	21,7±2,2 <sup>v,t</sup>	20,6±0,7 <sup>v,t</sup>	10,1±0,2 <sup>v,t</sup>	26,8±1,5 <sup>v,t</sup>
<b>Temps total de fermentació (dies)</b>	17°C	9	12	14	17	10
	13°C	13	15	21	32	15

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de tres fermentacions paral·leles. T, temperatura de fermentació. Diferències significatives ( $p \leq 0.05$ ) per factor varietat (v) i/o factor temperatura (t).

Els perfils de les FALs dels mostos suplementats no varien respecte als perfils de les FALs dels mostos no suplementats (Figura 12), mantenint-se el perfil descrit. Els efectes dels adjuvants són el desplaçament cap a l'esquerra de les corbes de la FAL, i l'augment del pendent de la part rectilínia, és a dir un escurçament de la durada de la FAL i un augment de la velocitat màxima (Taula 21), com assenyalen Jiranek i col., 1993. Aquest fet queda ben palès, a les fermentacions a 13 °C dels mostos de Garnatxa blanca i Pinot noir suplementats, que superen o igualen per aquest paràmetre fins i tot les fermentacions a 17 °C sense adjuvants.

**Taula 21.** Paràmetres cinètics de la fermentació dels mostos suplementats.

	T	Chardonnay (0,2 g/l FDA)	Garnatxa blanca (2 g/l FDA+3 g/l FDK)	Riesling (0,2 g/l FDA+ 0,13 g/l FDK)	Carinyena (0,2 g/l FDA+0,2 g/l FDK)	Pinot noir (0,2 g/l FDA+0,2 g/l FDK)
<b>Temps de latència (dies)</b>	17°C	3	3	5	1	1
	13°C	3	3	6	3	3
<b>Velocitat màxima de fermentació (g sucre/l dia)</b>	17°C	57,8±0,1	51,0±0,1	45,6±6,3	25,4±3,9	43,9±1,0
	13°C	42,1±0,8 <sup>v,t</sup>	41,7±0,9 <sup>v,t</sup>	31,9±1,8 <sup>v,t</sup>	7,3±1,3 <sup>v,t</sup>	34,5±2,0 <sup>v,t</sup>
<b>Temps total de fermentació (dies)</b>	17°C	9	9	11	14	7
	13°C	13	10	18	28	10

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de tres fermentacions paral·leles. T, temperatura de fermentació. Diferències significatives ( $p \leq 0.05$ ) per factor varietat (v) i/o factor temperatura (t).



En el cas de les FALs del most Chardonnay suplementat no s'ajusten al descrit sobre l'efecte dels adjuvants. L'afegiment únicament de FDA, que només aporta ND, no estimula gaire la FAL, cosa que s'explica per la gran quantitat de ND que conté el most original. Com els valors de ND pels mostos de Garnatxa Blanca, Riesling i Pinot noir són similars o superen als valors de ND del Chardonnay, i per aquests mostos sí s'aprecia un efecte dels adjuvants (FDA+FDK) sobre la cinètica fermentativa, és pot pensar que l'efecte és degut principalment al FDK, que estimularia la fermentació per altres mecanismes diferents a l'aportació de nitrogen pels llevats. Per una altra banda, els adjuvants no solucionen els alentiments de les fermentacions de Carinyena, la qual cosa corrobora que les causes de les aturades i alentiments a les FALs tenen diferents orígens que poden actuar de manera conjunta (Bisson, 1999).

L'eficiència de l'adjuvant varia segons el punt de la progressió de la FAL en què s'afegeix, com es mostra en comparar les fermentacions de Riesling a 13 °C i 17 °C. Al sisè dia de fermentació, les fermentacions a 17 °C es troben més avançades que les fermentacions a 13 °C, i conseqüentment el medi de les primeres conté més etanol que el medi de les segones, de manera que l'eficàcia dels llevats per a transportar els nutrients aportats per l'adjuvant es veu disminuïda, com indica Bely i col., 1991. Això es confirma al no veure cap efecte sobre la cinètica fermentativa en afegir l'adjuvant al setè dia de les fermentacions de Garnatxa blanca a ambdues temperatures (dades no mostrades).

## **5 Assimilació dels components nitrogenats**

L'anàlisi de la composició dels compostos nitrogenats en els vins i la comparació dels continguts d'aquests en els mostos ens revelen que el desenvolupament dels llevats al llarg de la FAL fan variar de manera important la composició nitrogenada inicial (Taula 22 i Figura 13).

L'amoni desapareix pràcticament del medi i en alguns vins es troba en quantitats mitges no superiors a 10 mg/l. Cal indicar que la variació trobada en alguns valors estaria motivada perquè el mètode de quantificació d'amoni es troba en el límit de detecció, i per tant les diferències estadísticament contrastades del contingut d'amoni residual entre els vins no tindrien prou valor per treure conclusions.

Les quantitats d'aminoàcids totals (Taula 22) al final de la fermentació són el resultat del consum d'aminoàcids per part dels llevats i l'alliberament d'aminoàcids de les reserves intracel·lulars com a resposta fisiològica per l'exhauriment dels sucres (Bidan i col., 1985). Aquestes quantitats varien amb la varietat i la temperatura. Si l'alliberament d'aminoàcids al final de fermentació es considera menyspreable (Henschke i Jiranek, 1993), així com l'autolisi degut a que aquest procés és lent a baixes temperatures (Charpentier i Feuillat, 1993) i que la biomassa es retira de seguida una vegada acabada la FAL, es pot estimar el consum d'aminoàcids com la diferència entre els valors inicials al most i els valors als vins. El consum a 17 °C tendeix a ser major que a 13 °C, de manera que coincideix amb resultats d'altres treballs (López i col., 1996). Es verifica el consum més petit per a les fermentacions alentides de Carinyena a 13 °C i les fermentacions a aquesta mateixa temperatura de Pinot noir, most que conté inicialment gran quantitat d'aminoàcids totals. A la Figura 13, es mostra que gran part dels aminoàcids es consumeixen. L'esmentat consum està afavorit per a les fermentacions a 17 °C. En canvi, les quantitats de prolina es troben generalment en concentracions augmentades en els vins degut a que la degradació de la prolina requereix oxigen el qual es troba limitat en condicions de vinificació (Ingledeu i col., 1987), i a que aquest aminoàcid seria un producte de la degradació de l'arginina en aquestes condicions (veure Figura 4 de la introducció). La incorporació directa de prolina a proteïnes del llevat no compensarien la prolina produïda a partir de l'arginina.

Per a les fermentacions de Chardonnay i Riesling es verifica un descens de la concentració inicial del contingut de proteïnes (Taula 22) en els vins respecte el most en acord amb les observacions realitzades per diferents autors sobre l'efecte de la FAL sobre el contingut de proteïna (Hsu i Heatherbell, 1987; Ayestaran i col., 1995). Canvis de les propietats fisicoquímiques del medi, com el descens del pH i augment d'etanol al transformar-se el most en vi, i la formació de complexos de les proteïnes amb les substàncies fenòliques i polisacàrids podrien propiciar la precipitació de les proteïnes, i per tant explicar aquest descens. Per les altres varietats, no hi han canvis importants, cas de les fermentacions de Carinyena o augments per les fermentacions de Garnatxa blanca i Pinot noir. Els augments de proteïna són difícils d'explicar simplement per l'autolisi dels llevats al final de fermentació, degut a que els augments són prou importants, els vins es centrifuguen una vegada acabada la FAL i les baixes temperatures de fermentació alenteixen aquest procés (Charpentier i Feuillat, 1993). Es podria pensar

que en aquests augments de proteïna intervindrien interferències d'altres substàncies no proteiques com són els polifenols. La disminució del contingut de proteïnes és més evident per a les fermentacions a 17 °C que per a les fermentacions a 13 °C.

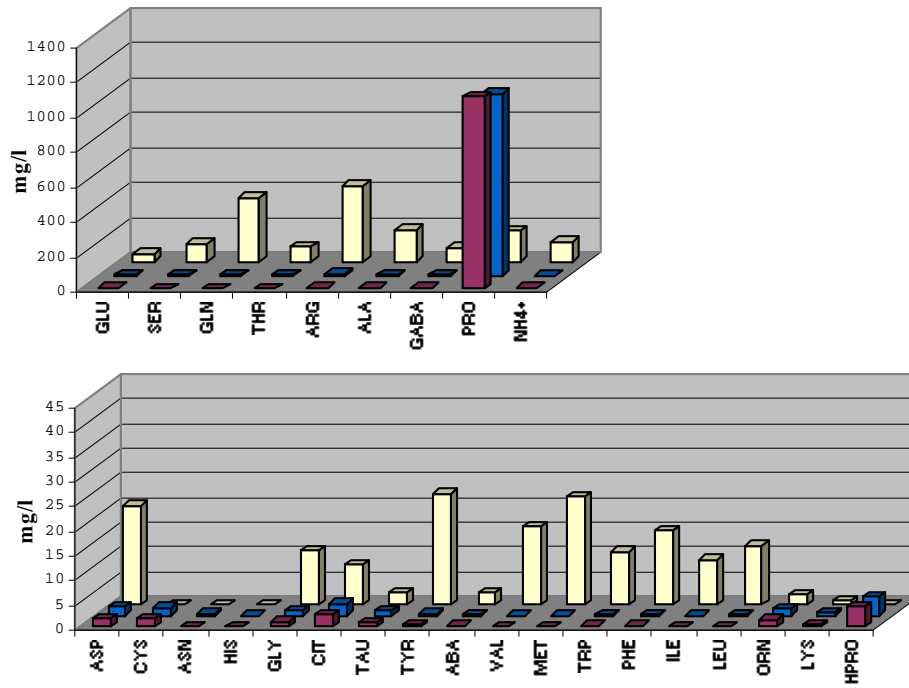
**Taula 22.** Compostos nitrogenats dels vins.

	<i>T</i>	Chardonnay	Garnatxa blanca	Riesling	Carinyena	Pinot noir	P
<b>Amoni (mg/l)</b>	17°C	2,0±1,5 (-98,3±1,3)	0,8±0,0 (-99,6±0,0)	4,0±0,6 (-95,1±0,7)	0,8±0,5 (-98,8±0,7)	4,3±0,4 (-97,0±0,3)	v/-
	13°C	n.d. (-100±0,0)	n.d. (-100±0,0)	2,0±0,1 (-97,5±0,2)	1,3±0,3 (-98,2±0,4)	8,2±8,0 (-94,2±5,6)	
<b>Aminoàcid (mg Gly/l)<sup>1</sup></b>	17°C	499±21 (-74,8±1,1)	172±3 (-86,2±0,3)	348±105 (-68,99,4)	507±39 (-16,4±1,7)	963±12 (-58,0±0,5)	v/t/◇
	13°C	484±15 (-75,6±0,7)	179±4 (-85,5±0,3)	233±35 (-79,2±3,1)	627±13 (-32,4±5,2)	1186±103 (-48,2±4,5)	
<b>Proteïna (mg BSA/l)<sup>2</sup></b>	17°C	30±3 (-71,3±3,0)	25±3 (32,3±0,3)	17±1 (-70,9±0,7)	151±22 (-15,7±12)	116±14 (20,4±14)	v/t
	13°C	36±1 (-66,2±0,5)	26±3 (30,3±14,4)	20±1 (-65,1±0,8)	182±13 (1,9±7,2)	130±29 (35,4±29,8)	
<b>Nitrogen disponible (mg/l)<sup>3</sup></b>	17°C	6,3±1,1 (-98,5±0,3)	33±0 (-90,1±0,3)	34±4 (-90,2±1,2)	22±1 (-88,8±1,2)	349±10 (-45,5±1,5)	v/-/◇
	13°C	3,8±0,6 (-99,1±0,1)	2,7±0,3 (-99,2±0,1)	22±2 (-93,7±0,6)	52±1 (-73,2±0,7)	369±18 (-42,4±2,8)	

<sup>1</sup> Quantitat total d'aminoàcids determinada per la tècnica de la ninhidrina, expressat en quantitat de glicina. <sup>2</sup> BSA, albúmina sèrica bovina. <sup>3</sup> nitrogen en forma d'amoní i aminoàcids excepte prolina. Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de les tres rèpliques. ( ) diferència en % respecte als valors en el most corresponent. T, temperatura de fermentació. Anova (anàlisi de la variància) de dos factors (varietat/temperatura) sobre el contingut dels vins. -: diferències no significatives. v: efecte de varietat. t: efecte de la temperatura fermentació. ◇: diferència significativa d'ambdós factors conjuntament. Nivell de significació: p≤0.05. n.d.: no detectat.

El contingut de ND als vins és diferent segons la varietat fermentada, i per tant dependent del contingut inicial al most. Els descens del ND és superior a 90 % per les fermentacions desenvolupades correctament, menys del 90 % per a les fermentacions alentides de Carinyena, i no arriba al 50 % per a les fermentacions del most de Pinot noir, el qual té un contingut de ND molt més elevat que els altres mostos (Taula 17) i en excés. Aquest fet, és indicatiu de que els llevats assimilen per desenvolupar la FAL fins a un màxim de ND, que Jiranek i col., 1993, situen proper a 500 mg/l. Les fermentacions a 17 °C consumeixen més ND que les fermentacions portades a 13 °C, encara que no hi hagin diferències significatives de l'efecte temperatura sobre el contingut de ND, sí és prou significatiu l'efecte de la temperatura sobre el consum.

### Chardonnay



### Garnatxa blanca

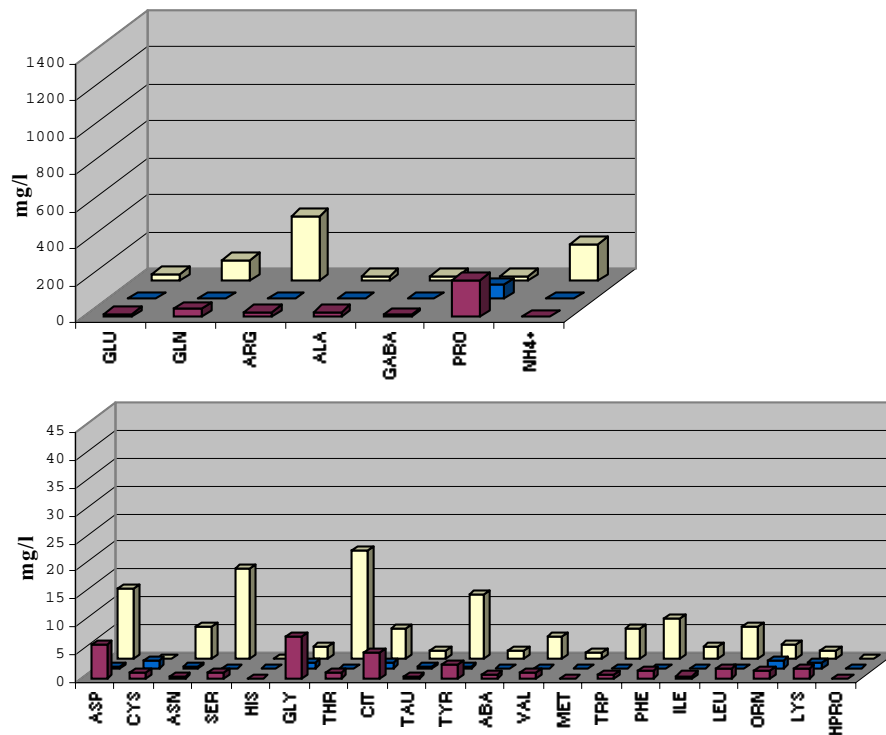
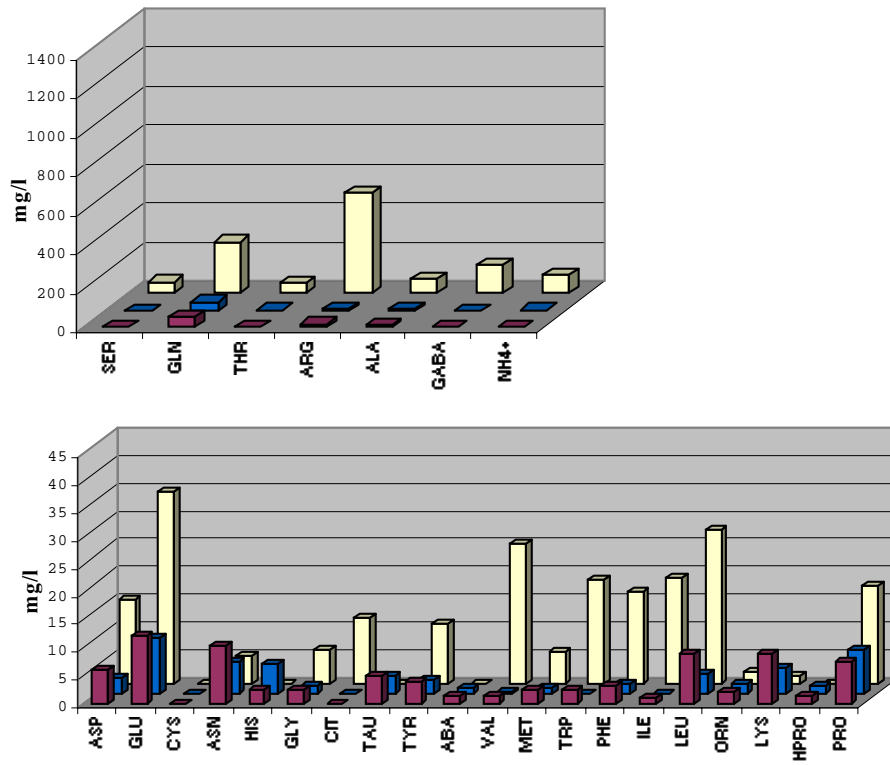


Figura 13 . Composició d'aminoàcids en mostos i vins. Most. Fermentacions a 13 °C. Fermentacions a 17 °C.

### Riesling



### Carinyena

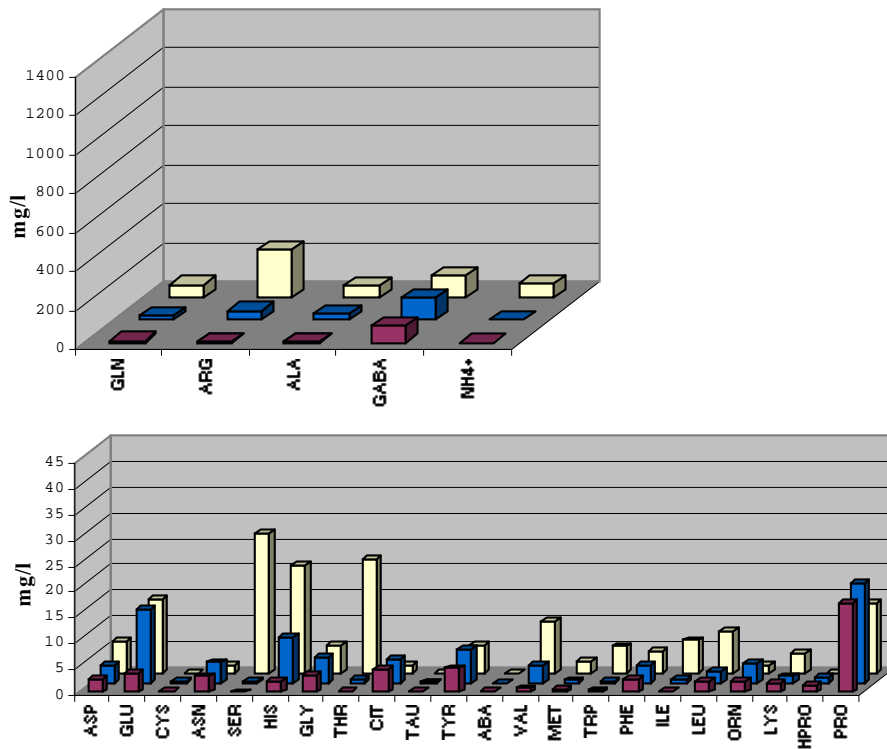
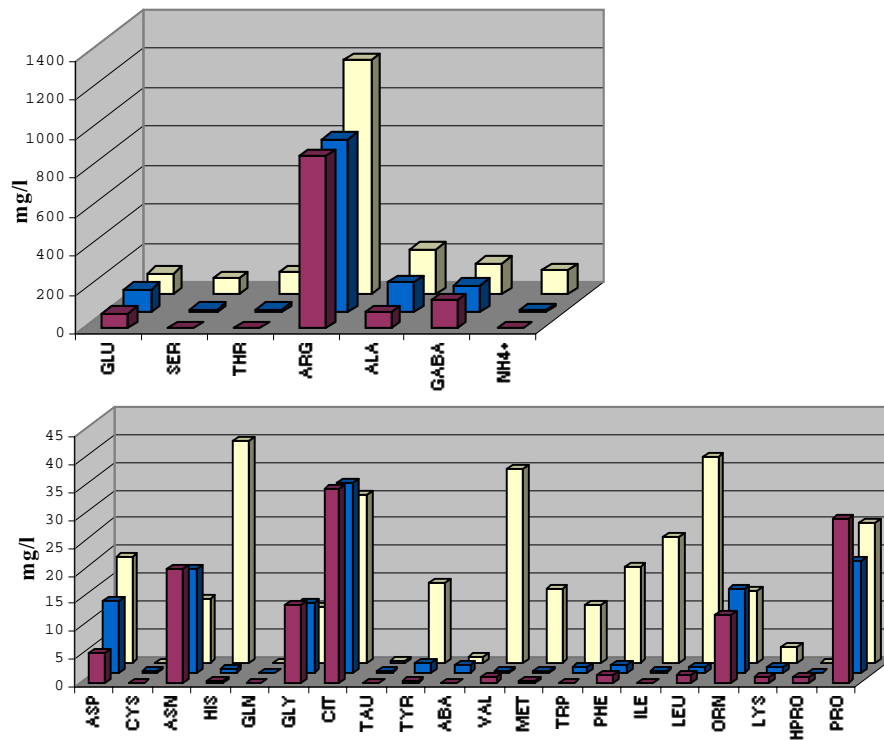


Figura 13 (cont.). Composició d'aminoàcids en mostos i vins. ■ Most. ■ Fermentacions a 13 °C. ■ Fermentacions a 17 °C.

## Pinot noir



**Figura 13 (cont.).** Composició d'aminoàcids en mostos i vins. ■ Most. ■ Fermentacions a 13 °C. ■ Fermentacions a 17 °C.

Pels paràmetres de contingut de nitrogen dels vins originats a partir dels mostos suplementats (Taula 23 i Figura 14) el factor varietat és determinant a l'igual que els vins procedents dels mostos sense suplementar (Taula 22). Es constata per a les fermentacions de Pinot noir i Carinyena el pitjor aprofitament dels recursos nitrogenats.

Així mateix, amb major significació estadística, a 17 °C la desaparició del medi d'amoní, aminoàcid i nitrogen disponible és més important que a 13 °C. Ambdós factors, varietat i temperatura interactuen.

**Taula 23.** Compostos nitrogenats dels vins.

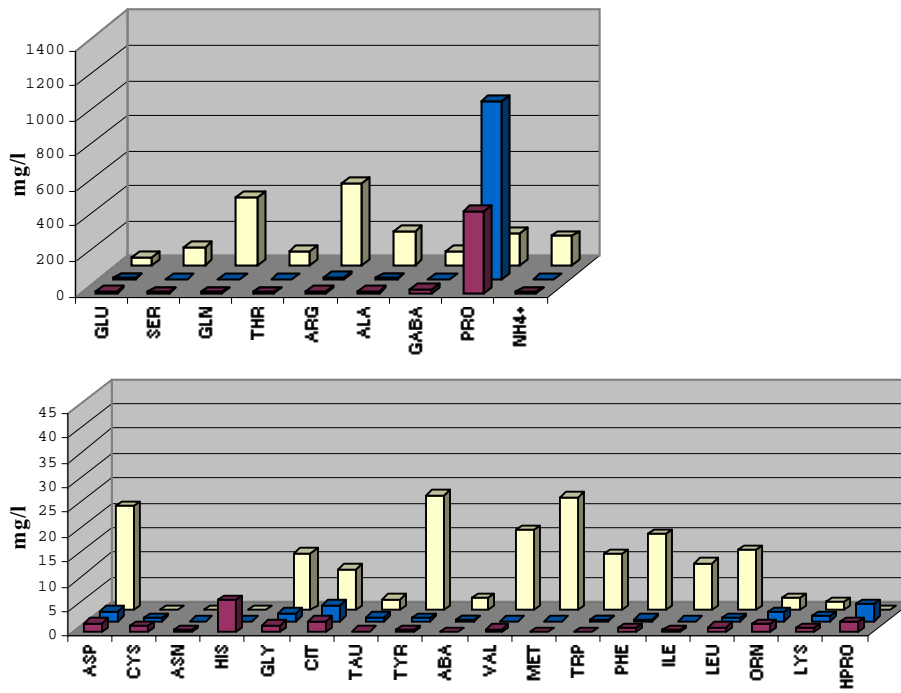
	<i>T</i>	<b>Chardonnay</b> (0,2 g/l FDA)	<b>Garnatxa blanca</b> (2 g/l FDA+3 g/l FDK)	<b>Riesling</b> (0,2 g/l FDA+ 0,13 g/l FDK)	<b>Carinyena</b> (0,2 g/l FDA+0,2 g/l FDK)	<b>Pinot noir</b> (0,2 g/l FDA+0,2 g/l FDK)	<b>P</b>
<b>Amoni (mg/l)</b>	17°C	1,1±0,5 (-99,3±0,3)	1020±0,0 (-35,9±0,0)	4,2±0,5 (-95,1±0,7)	9,4±5,6 (-93,3±4,1)	36±1,7 (-81,6±0,8)	v/t/a/◇
	13°C	0,8±0,5 (-99,5±0,3)	1080±0,0 (-32,2±0,0)	3,9±0,1 (-97,5±0,2)	29±3 (-79,3±2,0)	24±6 (-87,7±3,2)	
<b>Aminoàcid (mg Gly/l)<sup>1</sup></b>	17°C	650±141 (-67,5±7,1)	3049±9,6 (-21,4±0,3)	296±17 (-27,9±11)	653±56 (-40,1±5,2)	1074±29 (-57,4±1,1)	v/t/a/◇
	13°C	488±4 (-75,6±0,2)	3446±13 (-11,1±0,3)	265±4 (-59±2,6)	762±17 (-30,1±1,5)	1202±45 (-52,3±1,8)	
<b>Proteïna (mg BSA/l)<sup>2</sup></b>	17°C	26±2 (-75,6±1,4)	27±2 (-46,5±3,2)	16±1 (99,5±20)	171±20 (3,1±11)	16±0,5 (11,2±6,9)	v/t/-/◇
	13°C	34±3,8 (-68,1±3,6)	22 ±1 (-55,1±2,3)	21±0,7 (151±32)	196±10 (18,2±6,2)	21±0,7 (4,3±7,5)	
<b>Nitrogen disponible (mg/l)<sup>3</sup></b>	17°C	10±3 (-98,6±0,5)	798±2 (-43,6±0,2)	54±1 (-76,6±1,0)	56±8 (-76,7±3,3)	420±1 (-43,5±0,1)	v/t/a/◇
	13°C	7,1±4,6 (-99,0±0,6)	843±3 (-40,5±0,2)	36±7 (-50,8±11)	91±5 (-62,6±2,2)	420±25 (-43,4±3,4)	

<sup>1</sup> Quantitat total d'aminoàcids determinada per la tècnica de la ninhidrina, expressada en quantitat de glicina. <sup>2</sup> BSA, albúmina sèrica bovina. <sup>3</sup> nitrogen en forma d'amoni i aminoàcids excepte prolina.

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de les tres rèpliques. () diferència en % respecte als valors en el most corresponent. **T**, temperatura de fermentació. Anova (anàlisi de la variància) de tres factors (varietat/temperatura/adjuvant) sobre el contingut dels vins. -: diferències no significatives. v: efecte de varietat. t: efecte de la temperatura fermentació. a: efecte d'addició d'adjuvant ◇: diferència significativa dels tres factors conjuntament. Nivell de significació: p≤0.05. n.d.: no detectat.

Per una altra banda, l'anàlisi de la variància (ANOVA) indica que els mostos suplementats (Taula 23) donen lloc a vins amb contingut d'amoni, aminoàcids, proteïna i nitrogen disponible més elevats comparats amb aquests que provenen de mostos sense adjuvants (Taula 22), de manera que el percentatge relatiu de desaparició és menor pels primers. Cal indicar que l'anàlisi estadística s'ha realitzat també sense tenir en compte els resultats de la Garnatxa blanca, que podrien distorsionar l'anàlisi ja que recordem que s'afegien 10 vegades la dosi habitual, obtenint els mateixos resultats.

### Chardonnay + adjuvants



### Garnatxa blanca + adjuvants

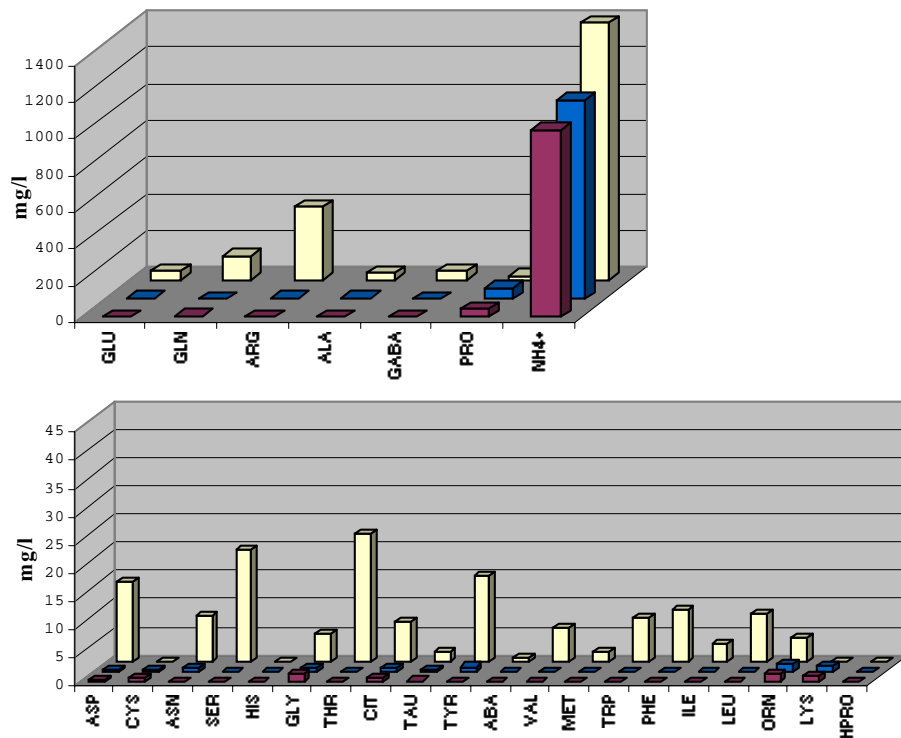
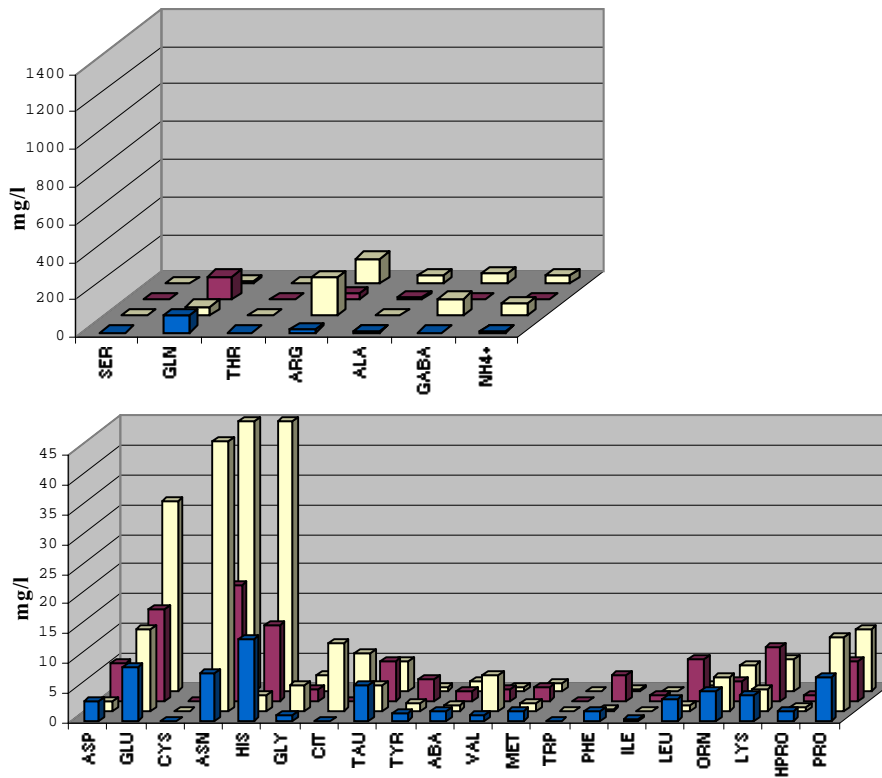


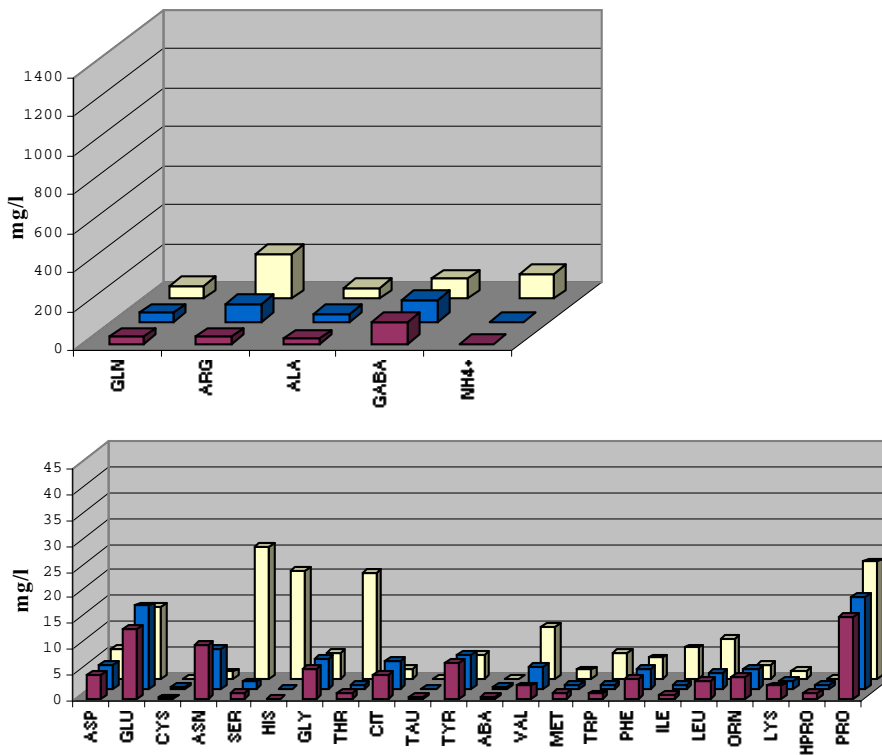
Figura 14. Composició d'aminoàcids en mostos i vins. Most. Fermentacions a 13 °C. Fermentacions a 17 °C.



### Riesling + adjuvants

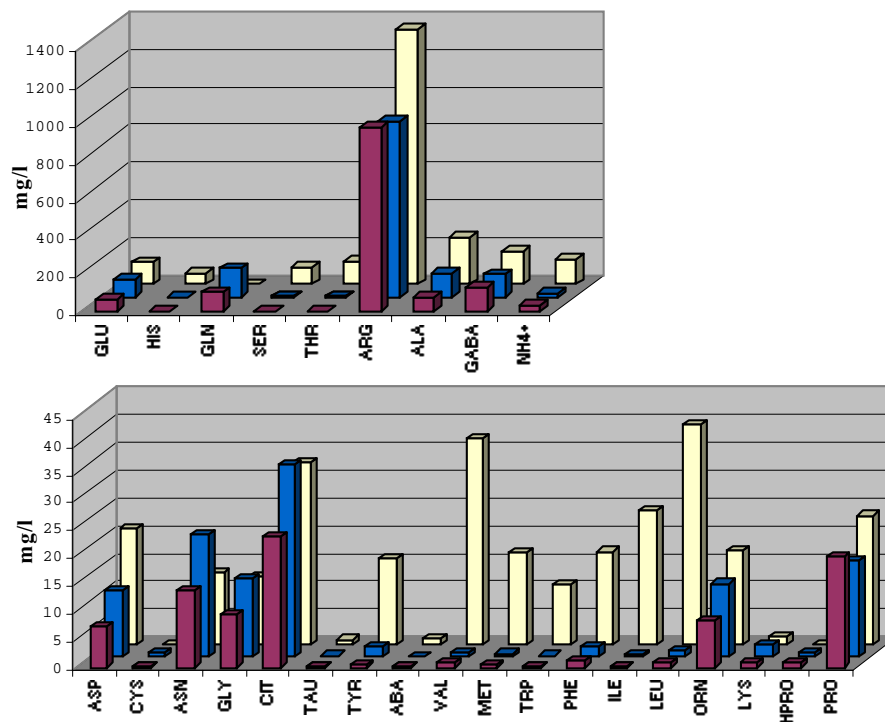


### Carinyena + adjuvants



**Figura 14 (cont.).** Composició d'aminoàcids en mostos i vins. ■ Most o dia 6 de fermentació per les fermentacions de Riesling. ■ Fermentacions a 13 °C. ■ Fermentacions a 17 °C.

## Pinot noir + adjuvants



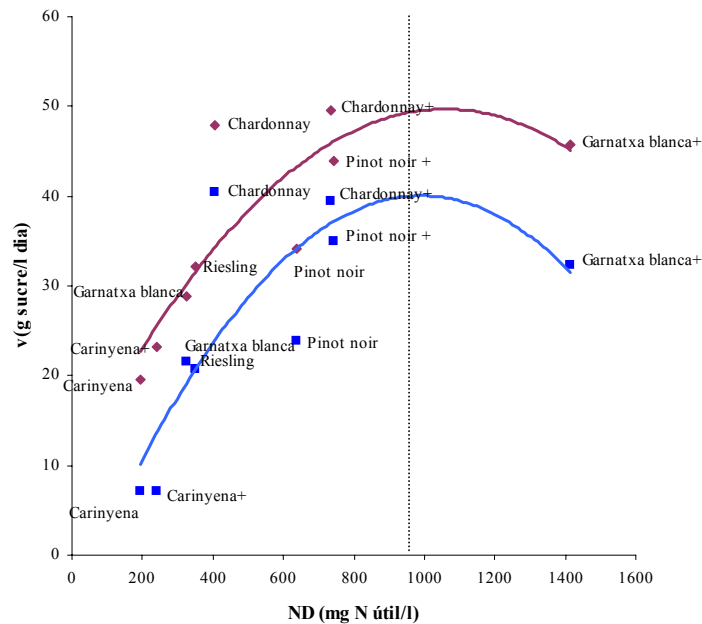
**Figura 14 (cont.).** Composició d'aminoàcids en mostos i vins. ■ Most. ■ Fermentacions a 13 °C. ■ Fermentacions a 17 °C.

Pels perfils d'aminoàcids dels vins (Figura 14) obtinguts a partir dels mostos suplementats no s'aprecia gran variació respecte als vins de mostos sense addicions nutritives (Figura 13).

El contingut inicial de ND en el most té un efecte considerable sobre les velocitats de fermentació i en definitiva en la fermentabilitat del most. L'ajust polinomial de segon grau dels valors de velocitat màxima (V) i nitrogen disponible (ND) per a les fermentacions fins ara realitzades (Figura 15), és a dir, tant pels mostos sense adjuvants com pels mostos amb adjuvants, ens mostren uns màxims de velocitat de la FAL per ambdues temperatures. Així, per a les FALs a 17 °C s'obté un ajust amb la següent equació,  $V_{17^{\circ}\text{C}} = -4 \cdot 10^{-5} \cdot \text{ND}^2 + 0,08 \cdot \text{ND} + 9,17$ ;  $r^2 = 0,690$ ; i un màxim a  $V_{17^{\circ}\text{C}} = 45,75$  g sucre/l·dia i  $\text{ND} = 956$  mg N/l. Per la seva banda, a 13 °C, l'ajust s'expressa per la següent equació,  $V_{13^{\circ}\text{C}} = -5 \cdot 10^{-5} \cdot \text{ND}^2 + 0,09 \cdot \text{ND} - 6,16$ ;  $r^2 = 0,647$ ; i un màxim a  $V_{13^{\circ}\text{C}} = 37,37$  g sucre/l·dia i  $\text{ND} = 933$  mg N/l

L'ajust preveu que les velocitats màximes de les FALs a 13 °C mai superen les velocitats màximes a 17 °C, encara que certs valors empírics ho contradiuen (Figura 15, Taula 21). Per altra banda, els valors màxims de ND a ambdues temperatures són similars. Així mateix, els valors de velocitat màxima de les fermentacions Chardonnay superen lleugerament els valors màxims donats per l'ajust.

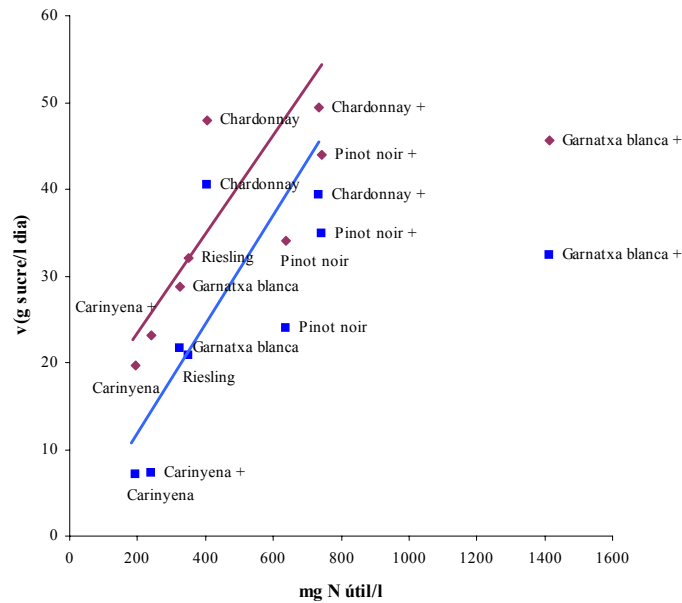
Els augments de ND aprop del màxim augmenten discretament les velocitats màximes que per a valors inferiors, de manera que l'addició d'adjuvants nitrogenats a aquest nivells de ND és menys eficient, com també proposen altres autors (Bely i col., 1991). Superat el màxim, els adjuvants nitrogenats poden tenir un efecte negatiu, probablement degut a la toxicitat sobre els llevats, com es pot veure per a les FALs de Garnatxa blanca amb adjuvant a una dosi deu vegades l'habitual (Figura 15).



**Figura 15.** Ajust polinomial de segon grau del ND i velocitat màxima de fermentació. — i — fermentacions, a 17 °C i 13 °C respectivament + Most amb adjuvant. ..... Quantitat de ND per qual s'obté límit màxim de velocitat màxima de fermentació.

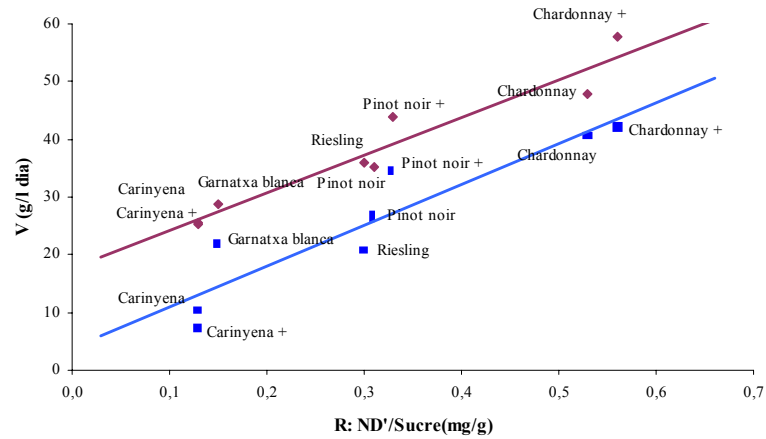
Descartant els valors extrems de les fermentacions del most de Garnatxa blanca suplementada, s'obté una correlació lineal entre el contingut de ND al most i la velocitat màxima de fermentació (V) a ambdues temperatures, i representada per les següents equacions,  $V_{13^{\circ}\text{C}}=0,063\cdot\text{ND}-0,8771$ ;  $r^2=0,671$  i  $V_{17^{\circ}\text{C}}=0,057\cdot\text{ND}+12,31$ ;  $r^2=0,744$  (Figura 16). Si bé aquestes equacions expliquen les fermentacions alentides de

Carinyena, no s'ajusten a les fermentacions de Pinot noir. Pels valors de ND, caldria esperar per a aquestes fermentacions unes velocitats majors.



**Figura 16.** Ajust lineal del ND i velocitat màxima de fermentació. — i — fermentacions, a 17 °C i 13 °C respectivament + Most amb adjuvant.

Segons Würdig i Woller, 1989 i Ough i col., 1991, els aminoàcids preferents pels llevats són els aminoàcids neutres (treonina, serina, asparagina, glutamina i alanina) seguits pels bàsics (arginina, lisina i histidina). S'ha provat un altre paràmetre basat en la composició del most i en la preferència dels llevats pels aminoàcids neutres que es relaciona amb la velocitat màxima de fermentació. El nou paràmetre es determina calculant el quocient entre el nitrogen en forma d'aminoàcids neutres esmentats (ND') i la concentració de sucre per a cada most, anomenant aquest paràmetre R. Així doncs, aquest paràmetre estimaria la fermentabilitat de cada most. La Figura 17 mostra que hi ha un bon ajust per a tots els mostos fermentats del paràmetre R i de les velocitats màximes de fermentació a ambdues temperatures,  $V_{13^{\circ}\text{C}}=71,10\cdot R+3,77$ ;  $r^2=0,856$  i  $V_{17^{\circ}\text{C}}=65,56\cdot R+17,55$ ;  $r^2=0,929$ .



**Figura 17.** Correlació del paràmetre R i les velocitats màximes de fermentació.  
 — Fermentacions a 13 °C. — Fermentacions a 17 °C.

Cal precisar que l'amoni, font de nitrogen ràpidament assimilada pels llevats i per tant utilitzada com activador de la fermentació, no intervé en aquest paràmetre. Així, no quedar clar en quin mesura i en quin nivell el nitrogen aportat per l'amoni influeix en la cinètica fermentativa.

## 6 Contingut d'etanol i productes secundaris en els vins

Els resultats indiquen que el contingut d'etanol als vins originats tant de mostos sense addicions d'adjuvants nutritius com mostos suplementats (Taula 24 i Taula 25, respectivament) depèn de la concentració inicial de sucre, i la temperatura no té pràcticament efecte.

Tampoc la temperatura fa variar de manera significativa el contingut de glicerol i d'àcid succínic, a diferència de Rankine i Bridson, 1971, que observen un augment en la producció de glicerol en augmentar la temperatura de fermentació de 15 °C a 25 °C. Les temperatures assajades, 13 °C i 17 °C es trobaven en un rang considerat com subòptim en relació a la capacitat metabòlica de *S. cerevisiae*. En canvi, existeix un efecte varietal (composició del most) sobre les quantitats de glicerol i àcid succínic trobades al vi. Com el cas de l'etanol el sucre inicial, precursor del glicerol i de l'àcid succínic, determinaria el seu contingut en el vi. Les dosis de SO<sub>2</sub> emprades en el tractament dels mostos no són prou importants per a que tinguin un efecte significatiu en la producció de glicerol per afavoriment de la fermentació gliceropirúvica, a l'evitar el SO<sub>2</sub> la reducció de l'acetaldehid a etanol (Zoecklein i col., 2001). Cal remarcar les quantitats majors de glicerol dels vins de Carinyena, en comparació amb vins que

provenen de mostos amb concentracions de sucres similars. Sponholz i col., 1986, indiquen que certs llevats no-*Saccharomyces* són majors productors de glicerol que *S. cerevisiae*. Entre aquests llevats està *C. stellata* present al llarg de les fermentacions de Carinyena.

Els nivells d'àcid acètic, acetaldèhid i acetat d'etil (Taules 24 i 25) segueixen un mateix perfil i varien per efecte de la varietat i temperatura. De manera que les fermentacions a baixes temperatures (13 °C) produeixen vins amb quantitats menors d'aquests productes, els quals contribueixen a la complexitat del vi sempre que es trobin en quantitats limitades però són nocius des del punt de vista organolèptic a partir d'unes concentracions (> 800 mg/l per a l'àcid acètic, > 125 mg/l per a l'acetaldèhid i > 200 mg/l per a l'acetat d'etil). Aquests resultats estan d'acord amb observacions prèvies de Castellari i col., 1995, i en conjunt no presenten efectes nocius. A excepció del que s'ha indicat i fora dels límits indicats, es troben les quantitats d'àcid acètic pels vins de Carinyena, que els donen un caràcter avinagrat. En la producció d'àcid acètic haurien contribuït a més del llevat inoculat altres microorganismes productors com la mateixa *C. stellata*, a més de la possibilitat de bacteris acètics i bacteris làctics, característics de fermentacions alentes.

Dins de l'efecte varietat sobre la quantitat d'acetaldèhid haurien contribuït les diferents dosis de SO<sub>2</sub> aplicades als mostos. Les aplicacions de SO<sub>2</sub> abans de l'inici o durant el procés fermentatiu fan augmentar la concentració d'acetaldèhid al vi degut a la reactivitat del SO<sub>2</sub> (en concret del bisulfit) amb l'acetaldèhid produint-se un producte molt estable (Zoecklein i col., 2001), i així mateix es redueixen les concentracions de SO<sub>2</sub> lliure.

L'estudi estadístic dels paràmetres reflectits a les Taules 24 i 25 respecte a l'efecte d'addicionar adjuvants indiquen que només afecten de manera estadísticament significativa a les concentracions d'acetaldèhid i d'acetat d'etil, en el sentit de disminuir el primer i augmentar el segon. Un dels possibles orígens de l'acetat d'etil és l'oxidació mitjançant NAD<sup>+</sup> del hemiacetal d'acetaldèhid i etanol realitzat dins de la cèl·lula de llevat (Zoecklein i col., 2001). D'alguna manera l'addició dels adjuvants hagués afavorit aquesta reacció.

**Taula 24.** Composició dels vins.

	<i>T</i>	Chardonnay	Garnatxa blanca	Riesling	Carinyena	Pinot Noir	P
<b>Ethanol (% v/v)</b>	17°C	12,5±0,1	12,3±0,0	13,9±0,4	12,0±0,2	12,5±0,0	v/-
	13°C	12,4±0,2	11,9±0,4	14,6±0,2	12,0±0,1	12,3±0,1	
<b>Glicerol (g/l)</b>	17°C	7,6±0,2	8,5±0,5	9,5±0,3	9,6±0,4	6,8±0,4	v/-
	13°C	7,5±0,6	8,0±0,1	9,4±0,5	9,7±0,2	6,2±0,4	
<b>Àcid succínic (g/l)</b>	17°C	0,8±0,1	0,8±0,0	1,0±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1	v/-
	13°C	0,8±0,1	0,9±0,1	0,8±0,1	1,1±0,5	0,7±0,1	
<b>Àcid acètic (mg/l)</b>	17°C	305±6	360±11	581±49	1545±185	252±46	v/t
	13°C	260±11	377±56	466±23	1276±258	179±24	
<b>Acetaldèhid (mg/l)</b>	17°C	33±8	27±3	99±11	23±4	113±22	v/t/◇
	13°C	26±1	23±1	64±3	32±6	94±8	
<b>Acetat d'etil (mg/l)</b>	17°C	n.d.	21±1	22±1	34±17	19±4	v/t/◇
	13°C	13±0,3	5,3±2	24±10	18±5	12±0,8	

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de tres vins de respectius fermentacions paral·leles. *T*, temperatura de fermentació. Anova (anàlisi de la variància) de dos factors (varietat/temperatura) sobre el contingut dels vins. -: diferències no significatives. v: efecte de varietat. t: efecte de la temperatura fermentació. ◇: diferència significativa de ambdós factors conjuntament. Nivell de significació:  $p \leq 0.05$ . n.d.: no detectat.

A les Taules 26 i 27 s'indiquen les quantitats dels principals alcohols superiors i la suma d'aquests, tant pels vins provinents de mostos sense adjuvants com per a vins de mostos amb adjuvants, respectivament. Les fermentacions realitzades a 13 °C reneixen vins amb continguts més baixos pels diferents alcohols per la suma total en comparació amb les fermentacions a 17 °C, fet que coincideix amb les observacions d'altres autors (du Plessis, 1983; Castellari i col., 1995). Aquest fet resta ben palès per les fermentacions de Pinot noir.

**Taula 25.** Composició dels vins originats amb mostos suplementats.

	<i>T</i>	<b>Chardonnay</b> (0,2 g/l FDA)	<b>Garnatxa blanca</b> (2 g/l FDA+3 g/l FDK)	<b>Riesling</b> (0,2 g/l FDA+ 0,13 g/l FDK)	<b>Carinyena</b> (0,2 g/l FDA+0,2 g/l FDK)	<b>Pinot noir</b> (0,2 g/l FDA+0,2 g/l FDK)	<b>P</b>
<b>Ethanol (% v/v)</b>	17°C	12,5±0,1	11,9±0,0	14,2±0,1	12,3±0,1	12,5±0,1	v/-/-
	13°C	12,6±0,1	12,0±0,0	14,6±0,1	12,4±0,1	12,2±0,1	
<b>Glicerol (g/l)</b>	17°C	7,9±0,3	8,4±0,8	9,5±0,2	10,7±0,8	7,1±0,3	v/-/-
	13°C	7,4±2,0	8,1±0,1	9,3±0,2	10,4±0,6	6,5±0,3	
<b>Àcid succínic (g/l)</b>	17°C	0,8±0,1	0,6±0,3	1,0±0,0	0,8±0,2	0,7±0,1	v/-/-
	13°C	0,8±0,2	0,9±0,0	0,8±0,1	0,9±0,0	0,8±0,1	
<b>Àcid acètic (mg/l)</b>	17°C	718±33	371±4	630±53	1365±297	363±36	v/t/-
	13°C	276±69	386±55	480±20	1025±68	296±17	
<b>Acetaldehid (mg/l)</b>	17°C	30±1	21±3	73±17	35±17	78±9	v/t/a
	13°C	22±10	9,1±3	55±22	21±2	58±3	
<b>Acetat d'etil (mg/l)</b>	17°C	37±18	16±2	29±4	36±7	23±10	v/t/a/◇
	13°C	15±2	23±3	25±5	20±2	13±2	

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de tres vins de respectius fermentacions paral·leles. **T**, temperatura de fermentació. Anova (anàlisi de la variància) de tres factors (varietat/temperatura/adjuvant) sobre el contingut dels vins. -: diferències no significatives. v: efecte de varietat. t: efecte de la temperatura fermentació. a: efecte d'addició d'adjuvant ◇: diferència significativa dels tres factors conjuntament. Nivell de significació:  $p \leq 0.05$ . n.d.: no detectat.

Dins de l'efecte varietat s'ha de tenir en compte les quantitats diferencials de ND dels mostos (Taulas 17 i 19). Així, per a les quantitats de 1-propanol, la tendència és ascendent en quantitat a mesura que el most de partida conté més ND, amb excepció dels vins de Garnatxa blanca, i per tant existeix una correlació positiva entre ND dels mostos i les quantitats de propanol, com indiquen Seeber i col, 1991.



**Taula 26.** Alcohols superiors dels vins (mg/l)

	<i>T</i>	Chardonnay	Garnatxa Blanca	Riesling	Carinyena	Pinot Noir	P
<b>1-Propanol</b>	17°C	141±23	n.d.	59±13	57±10	510±41	v/t/◇
	13°C	136±23	n.d.	91±15	66±4	295±44	
<b>2-Metil-1-propanol</b>	17°C	52±22	43±2	44±7	38±8	47±11	-/t
	13°C	37±8	21±11	39±10	29±3	29±4	
<b>2-Metil-1-butanol</b>	17°C	109±81	25±7	34±5	17±2	22±6	-/-/◇
	13°C	20±2	60±58	37±7	14±2	18±3	
<b>3-Metil-1-butanol</b>	17°C	169±34	123±23	135±11	66±2	109±1	-/-
	13°C	126±3	120±38	138±21	60±2	85±7	
<b>Alcohols superiors</b>	17°C	411±96	197±5	263±31	159±42	688±43	v/t/◇
(Σ)	13°C	320±18	161±45	305±51	169±0	423±45	

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de tres vins de respectius fermentacions paral·leles. **T**, temperatura de fermentació. Anova (anàlisi de la variància) de dos factors (varietat/temperatura) sobre el contingut dels vins. -: diferències no significatives. v: efecte de varietat. t: efecte de la temperatura fermentació. ◇: diferència significativa d'ambdós factors conjuntament. Nivell de significació:  $p \leq 0.05$ . n.d.: no detectat.

Les diferències en quantitat de 2-metil-1-propanol (Taula 26 i 27) no són prou significatives entre varietats de mostos. El ND no tindria efecte en la seva producció (Ough i Bell, 1980).

Les concentracions de 2-metil-1-butanol i 3-metil-1-butanol (Taula 26 i 27) segueixen les mateixes pautes entre les varietats, sense poder desvelar alguna relació amb el ND.

Les quantitats trobades de 1-propanol marquen la tendència del sumatori dels 4 alcohols superiors contemplats (Taula 26 i 27), de manera que la relació d'aquest valor amb el ND segueix la mateixa tònica que el primer amb el ND. De manera que, a més ND més gran és aquest sumatori. Això, està en contradicció amb les observacions que indiquen una correlació negativa entre la quantitat de ND i la totalitat d'alcohols superiors (Rapp i Versini, 1997).

**Taula 27.** Alcohols superiors dels vins originats de mostos suplementats (mg/l).

	<i>T</i>	Chardonnay	Garnatxa Blanca	Riesling	Carinyena	Pinot Noir	P
<b>1-Propanol</b>	17°C	232±42	5,0±5	101±13	67±4	317±34	v/-/a/∅
	13°C	226±14	155±5	114±15	77±42	365±50	
<b>2-Metil-1-propanol</b>	17°C	49±5	59±1	50±4	33±4	36±14	v/-/a
	13°C	34±4	43±3	36±6	29±6	27±3	
<b>2-Metil-1-butanol</b>	17°C	9±3	25±3	43±5	17±2	20±7	-/-/a/∅
	13°C	21±16	3±3	33±7	17±2	13±13	
<b>3-Metil-1-butanol</b>	17°C	161±12	197±10	164±15	86±10	149±9	v/t/a/∅
	13°C	124±21	17±3	154±23	85±8	145±52	
<b>Alcohols superiors</b>	17°C	306±32	105±5	199±41	132±12	388±29	v/t/a/∅
(Σ)	13°C	296±20	214±6	209±36	138±46	420±41	

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de tres vins de respectius fermentacions paral·leles. **T**, temperatura de fermentació. Anova (anàlisi de la variància) de tres factors (varietat/temperatura/adjuvant) sobre el contingut dels vins. -: diferències no significatives. v: efecte de varietat. t: efecte de la temperatura fermentació. a: efecte d'addició d'adjuvant ∅: diferència significativa dels tres factors conjuntament. Nivell de significació: p: p≤0.05. n.d.: no detectat.

Una clara influència té la suplementació amb nutrients als mostos sobre la composició d'alcohols superiors als vins resultants (Taula 27). Així, els vins de mostos suplementats augmenten en contingut de 1-propanol, 2-metil-1-propanol i 3-metil-1-butanol, i disminueixen en 2 metil-1-butanol i en el sumatori dels quatre compostos, respecte als vins de mostos sense addició de nutrients. La disminució d'aquest darrer paràmetre és en global de 70 mg/l en relació als vins de mostos no suplementats, de manera que un augment del ND afavoriria una disminució global d'alcohols superiors, ja que els llevats no mobilitzarien les reserves de nitrogen en forma d'aminoàcids, com proposen varis autors (Rapp i Versini, 1997; Ribéreau-Gayon i col., 1998).

B) INTERRELACIÓ DELS ADJUVANTS NUTRITIUS I LLEVATS EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA FERMENTACIÓ ALCOHÒLICA A BAIXA TEMPERATURA.

## 1 ESTUDI DE L'EFECTE DE DIFERENTS COMBINACIONS D'ADJUVANTS NUTRITIUS EN RELACIÓ A LA SOCA DE LLEVAT INOCULADA

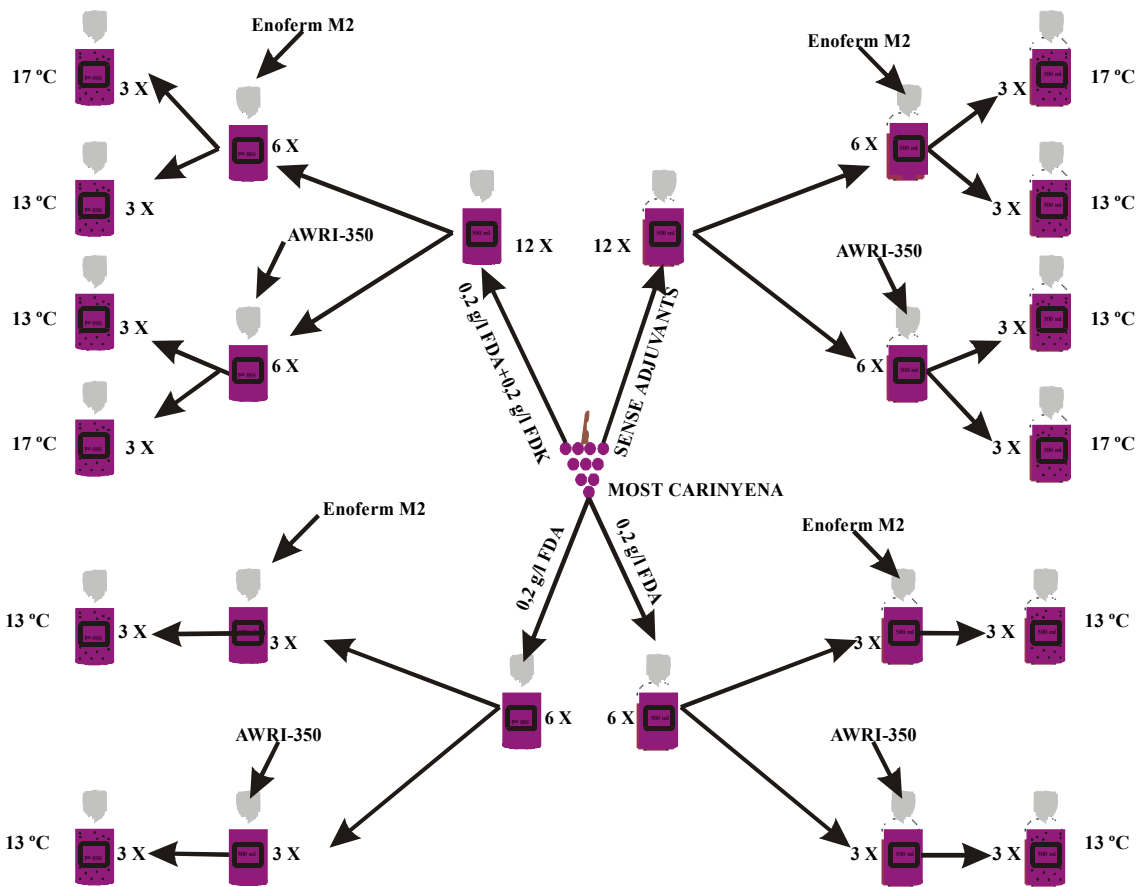
S'avaluà l'eficàcia sobre la cinètica fermentativa a baixa temperatura (13 °C) de l'addició de dos adjuvants, fosfat de diamoni (FDA) i Fermaid K<sup>®</sup> (veure apartat A.2) per separat i conjuntament amb la idea de verificar un possible efecte sinèrgic. El most fresc utilitzat originari de la D.O. Priorat (verema 22/09/97) de la varietat Carinyena tenia les característiques enològiques que es detallen a la Taula 28.

Les diferents microvinificacions (500 ml) es desenvolupen per triplicat a 13 °C amb les combinacions d'adjuvants que es detallen a continuació: sense adjuvant; amb 0,2 g/l de FDA; amb 0,2 g/l de FDK, i ambdós adjuvants conjuntament a la concentració de 0,2 g/l per cadascú. Com a control, es portaven a terme microvinificacions a 17 °C per triplicat sense adjuvants i amb els dos adjuvants conjuntament a la concentració esmentada.

Per a cada condició d'adjuvant s'inoculaven amb dos llevats comercials Enoferm M2 (Lallemand Inc, Montreal, Quebec, Canadà) i AWRI-350, aïllat per Australian Wine Research Institute, amb una població inicial de  $2 \times 10^6$  cèl./ml, amb la idea de valorar si l'efecte dels adjuvants és dependent de la soca inoculada. L'esquema de la distribució dels microfermentadors queda reflectit a la Figura 18.

**Taula 28.** Característiques del most de Carinyena.

	<b>Most</b>
<b>Sucre (g/l)</b>	228
<b>Acidesa total (g àcid tartàric/ l)</b>	6,99
<b>pH</b>	3,43
<b>SO<sub>2</sub> total (mg/l)</b>	30
<b>Tractament pre-fermentatiu</b>	Macerat Sagnat 10g/Hl bentonita

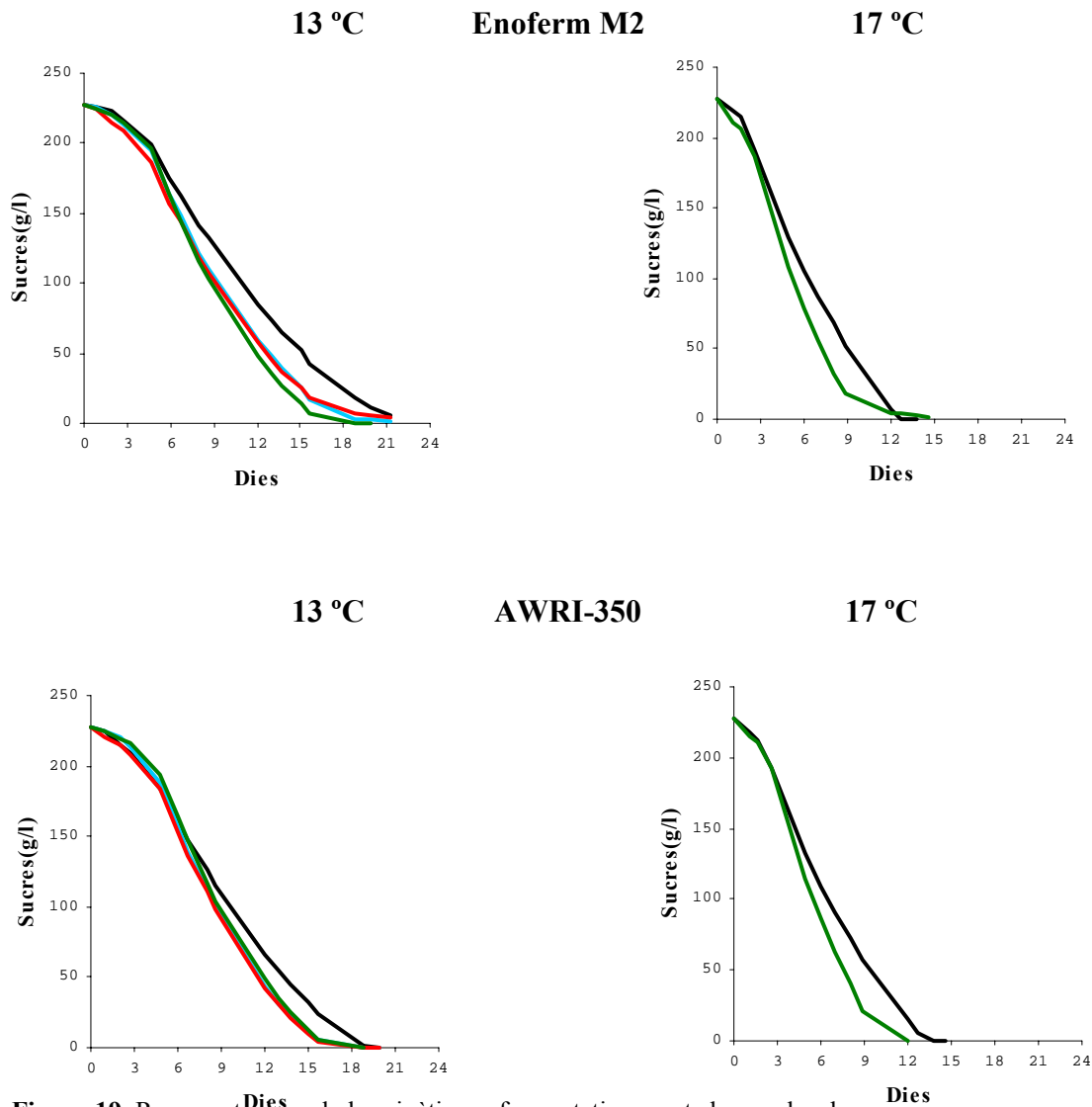


**Figura 18.** Distribució dels microfermentadors per les diferents condicions assajades de adjuvants nutritius, soca de llevat inoculat i temperatura de fermentació.

Es van determinar els paràmetres cinètics de les diferents fermentacions, i per a les fermentacions sense adjuvant i ambdós adjuvants conjuntament es va estudiar l'evolució de les quantitats d'amoni i glucosa/fructosa a llarg de la FAL A més per aquestes fermentacions, es va estudiar la imposició de la soca de llevat inoculada i l'evolució dels llevats no-*Saccharomyces* (veure apartats 2.2.2 i 2.2.3. de l'annex I). Pels vins resultants s'analitzaren els continguts de glicerol i àcid acètic.

### 1.1 Efecte dels adjuvants nutritius sobre la cinètica fermentativa, depenent de la soca inoculada

Sobre el desenvolupament de la FAL descrit pels diferents paràmetres cinètics (Figura 20, i Taules 29 i 30) l'efecte temperatura és predominant. Els adjuvants afegits fan augmentar les velocitats màximes, escurcen els temps totals de fermentació però no afecten la durada del període de latència, al comparar amb les fermentacions en que no participen adjuvants.



**Figura 19.** Representacions de les cinètiques fermentatives portades per les dues soques. — sense adjuvants — 0,2 g/l FDA. — 0,2 g/l. FDK. — 0,2 g/l. FDA més 0,2 g/l FDK.

Els augments de la velocitat màxima detectats no varien de manera significativa pel fet d'afegir només FDA o només FDK, per a les fermentacions inoculades amb la soca Enoferm M2. No obstant, el tractament amb només FDK el temps total de fermentació.

Al comparar les cinètiques i paràmetres fermentatius d'ambdues soques (Figures 19, i Taules 29 i 30) s'aprecia una major capacitat fermentativa de la soca AWRI-350 respecte a la soca Enoferm M2 a 13 °C en totes les condicions d'adjuvants nutritius assajades. En canvi, a 17 °C les fermentacions inoculades amb Enoferm M2 superen, si bé no de manera estadísticament significativa, les velocitats màximes mesurades per a les fermentacions inoculades amb AWRI-350.

**Taula 29.** Paràmetres cinètics de la fermentació portada per la soca Enoferm M2.

	T	Sense adjuvants	0,2 g/l FDA	0,2 g/l FDK	0,2 g/l FDA +0,2 g/l FDK
<b>Temps de latència (dies)</b>	17°C	2	-	-	2
	13°C	5	5	5	5
<b>Velocitat màxima de fermentació (g sucre/l dia)</b>	17°C	19,5±2,3	-	-	26,2±2,8 <sup>d</sup>
	13°C	13,8±0,1 <sup>1,a</sup>	15,4±0,9 <sup>b</sup>	15,8±0,6 <sup>b</sup>	18,2±0,5 <sup>1,c</sup>
<b>Diferència de velocitat màx. respecte al control<sup>1</sup> (g sucre/l dia)</b>	17 °C	0	-	-	6,7
	13 °C	0	1,6	2,0	4,3
<b>Temps total de fermentació (dies)</b>	17°C	12	-	-	14
	13°C	>23	23	20	17

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de tres fermentacions paral·leles. T, temperatura de fermentació. Diferències significatives ( $p \leq 0.05$ ) pel factor temperatura (t) i pel factor adjuvant (a, b, c i d). – Fermentacions no assajades. 1) Es considera el control les fermentacions portades a terme sense afegiment de adjuvants.

L'efecte dels adjuvants afegits sobre la velocitat màxima es valora com les unitats de velocitats màxima incrementades respecte a la velocitat màxima obtinguda sense afegir adjuvants. Els valors obtinguts pels afegiments de només FDA, només FDK i ambdós conjuntament per a les fermentacions desenvolupades per la soca Enoferm M2 i AWRI-350 es detallen a les Taules 29 i 30, respectivament. Així per a les fermentacions conduïdes per Enoferm M2, el sumatori dels efectes individuals és lleugerament inferior a l'efecte obtingut amb els adjuvants conjuntament. Aquest fet indica un efecte sinèrgic d'ambdós adjuvants respecte a la velocitat màxima. Cal pensar que FDK aporta a part de fonts nitrogenades, factors de creixement i desintoxicants d'àcids grassos de cadena mitjana pels llevats en forma de llevats inactius (veure Capítol A), de manera que FDK pot contribuir a més a l'activació de la FAL per altres mecanismes diferents a la nutrició nitrogenada.

**Taula 30.** Paràmetres cinètics de la fermentació portada per AWRI-350.

	T	Sense adjuvants	0,2 g/l FDA	0,2 g/l FDK	0,2 g/l FDA +0,2 g/l FDK
<b>Temps de latència (dies)</b>	17°C	2	-	-	2
	13°C	5	5	5	5
<b>Velocitat màxima de fermentació (g sucre/l dia)</b>	17°C	16,2±1,0	-	-	24,6±2,8 <sup>c</sup>
	13°C	14,5±0,5 <sup>t,a</sup>	19,5±0,8 <sup>b</sup>	21,6±2,1 <sup>b</sup>	20,1±0,6 <sup>t,b</sup>
<b>Diferència de velocitat màx. respecte al control<sup>1</sup> (g sucre/l dia)</b>	17 °C	0	-	-	8,4
	13 °C	0	5,0	7,1	5,6
<b>Temps total de fermentació (dies)</b>	17°C	13	-	-	12
	13°C	19	17	17	17

Cada valor representa la mitja  $\pm$  desviació estàndard de tres fermentacions paral·leles. T, temperatura de fermentació. Diferències significatives ( $p \leq 0.05$ ) pel factor temperatura (t) i pel factor adjuvant (a,b i c). - Fermentacions no assajades. 1) Es considera el control les fermentacions portades a terme sense afegiment de adjuvants.

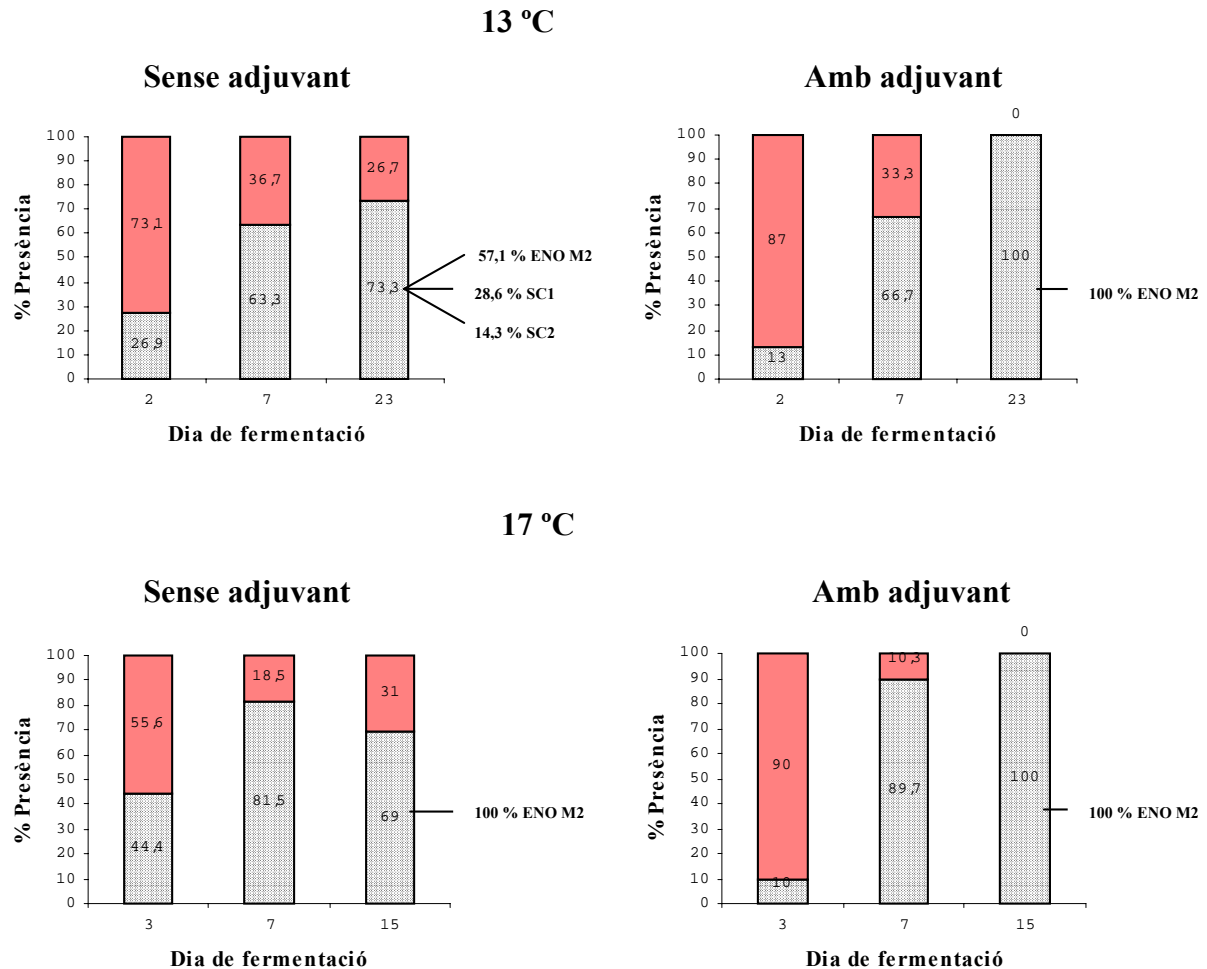
Per la seva banda, el comportament AWRI-350 és diferent a Enoferm M2 respecte a les diferents condicions d'adjuvants. Els diferents afegiments de nutrients incrementen la velocitat màxima respecte a les fermentacions sense addició d'adjuvant de manera més notòria, però no s'aprecien variacions entre les diferents condicions d'addició. Es podria pensar que aquesta soca desenvolupa les seves màximes capacitats fermentatives amb l'afegiment de les quantitats assajades de qualsevol dels dos adjuvants de manera que no es verifica cap efecte addicional a l'afegir els dos adjuvants conjuntament.

El comportament dependent de la soca en relació a altres adjuvants nutritius també l'observen altres autors (Trioli, 1997).

## 1.2 Dinàmica de poblacions de llevats

Malgrat haver inoculat el most amb llevat LSA de la soca Enoferm M2, les poblacions de llevats d'espècies no-*Saccharomyces* predominen sobre l'espècie *S. cerevisiae* a l'inici de la FAL (Figura 20). Els llevats *S. cerevisiae* augmenten la seva presència a mesura que avança el procés desplaçant als llevats de les espècies no-*Saccharomyces*. Aquesta imposició dels llevats *S. cerevisiae* es veu facilitada en les fermentacions portades a temperatura més elevada (17 °C) i amb adjuvants afegits

inicialment. En aquestes condicions el llevat inoculat es troba en millors condicions per a desenvolupar-se i imposar-se sobre llevats no-*Saccharomyces* i altres soques de *S. cerevisiae* (SC1 i SC2) presents inicialment en el most.

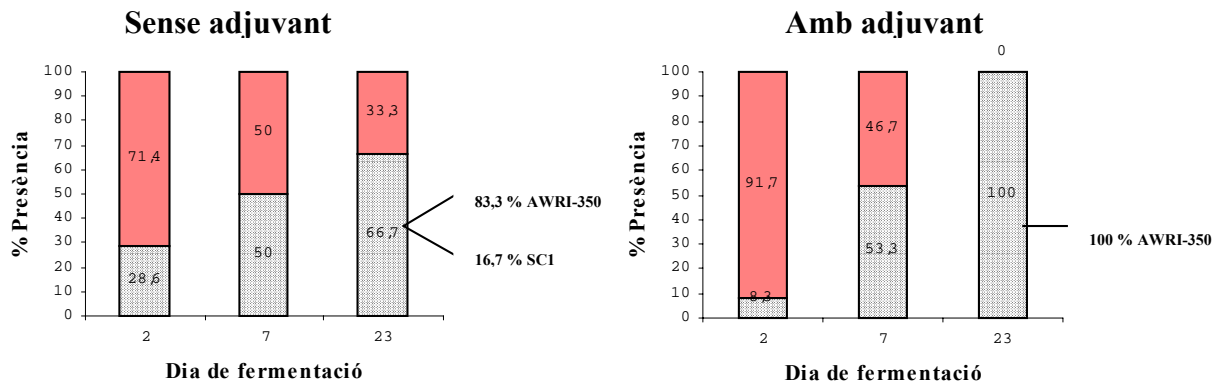


**Figura 20.** Evolució de les poblacions de llevats a llarg de la FAL a ambdues temperatures. *Saccharomyces cerevisiae*. No-*Saccharomyces*. Representen mitges de presència de 30 colònies escollides a l'atzar de plaques d'enumeració de població de tres fermentacions paral·leles. **ENO M2:** soca de *Saccharomyces cerevisiae* inoculada Enoferm M2 (Lallemand Inc, Montreal, Quebec, Canadà). **SC1 i SC2,** soques tipificades de *Saccharomyces cerevisiae* diferents a la soca inoculada. Adjuvants afegits: 0,2 g/l FDA i 0,2 g/l FDK.

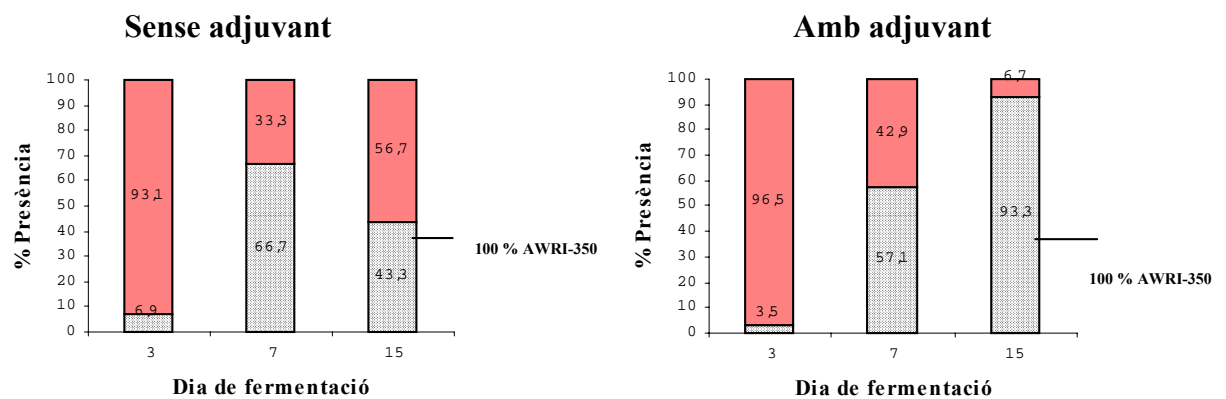
Com el cas de les fermentacions inoculades amb Enoferm M2 (Figura 20) l'addició d'adjuvants nutritius permet una millor imposició del llevat inoculat AWRI-350 (Figura 21) enfront altres soques de *S. cerevisiae* i llevats no-*Saccharomyces* que es troben inicialment al most. Al final de la fermentació es tipifiquen només dues soques per a les fermentacions sense adjuvants a 13 °C, la inoculada i una altra també ressenyada per a les fermentacions de Enoferm M2, SC1. Per a altres condicions la soca inoculada desplaça totalment les altres soques.



13 °C



17 °C



**Figura 21.** Evolució de les poblacions de llevats a llarg de la FAL a ambdues temperatures. *Saccharomyces cerevisiae*. No-*Saccharomyces*. Representen mitges de presència de 30 colònies escollides a l'atzar de plaques d'enumeració de població de tres fermentacions paral·leles. **AWRI-350:** soca de *Saccharomyces cerevisiae* inoculada. **SC1** soca tipificada de *Saccharomyces cerevisiae* diferent a la soca inoculada. Adjuvants afegits: 0,2 g/l FDA i 0,2 g/l FDK.

En aquests resultats hi han dos fets remarcables, que són la dificultat d'imposició del llevat inoculat i la presència amb alt percentatge de llevats no-*Saccharomyces* al final de fermentació en algunes de les fermentacions. La manca d'imposició del llevat inoculat estaria motivada en part per una carrega elevada de llevats nadius en el most, els quals competirien pels recursos del medi amb el primer. Un d'aquests recursos que es troba en quantitats limitades en els mostos de Carinyena seria el nitrogen disponible, de manera que l'afegiment d'adjuvants nutritius afavoreix la imposició del llevat inoculat. També es pot pensar com inherent d'aquest most les càrregues elevades de llevats nadius. Primer, degut a que la verema d'aquesta varietat és de les més tardanes, i per tant la superfície del raïm té més possibilitats d'estar fortament colonitzada per diferents poblacions de llevats. Segon, el most abans de ser inoculat roman unes hores en maceració amb la pellofa, fet que afavoreix la contaminació del most per llevats

nadius i el seu desenvolupament. A més a més, s'ha d'afegir la circumstància que aquest most està lleugerament sulfitat (veure Taula 28), i per tant els efectes negatius sobre els llevats no-*Saccharomyces* serien reduïts. Contrastada la viabilitat dels inòculs utilitzats (dades no mostrada) aquesta no es manté una vegada que s'inocula al most, al comprovar que les poblacions total de viables passades 48 hores es situen en general al voltant de  $5 \times 10^6$  i al tenir en compte els percentatges dels diferents tipus de llevats. Aquesta mortaldat inicial es deuria a l'estrès osmòtic provocat per la concentració elevada de sucres del most (Lafon-Lafourcade, 1983).

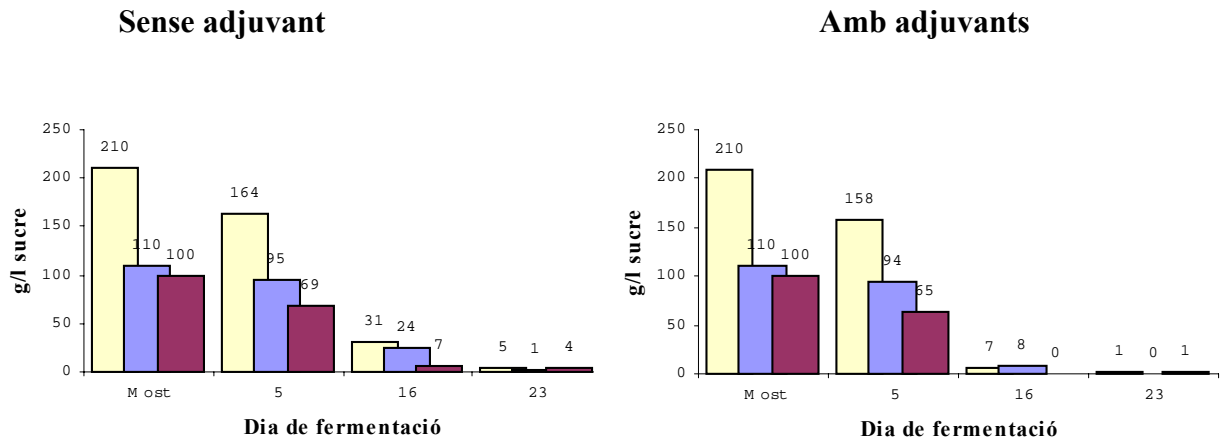
Estudis quantitius sobre el creixement de llevats en fermentacions industrials a Burdeus (Fleet i col., 1984), Austràlia (Heard i Fleet, 1985) i a Espanya (Martínez i col., 1989) indiquen que certes espècies de llevats no-*Sacchararomyces* poden sobreviure de manera prolongada i arribar a poblacions de fins i tot  $10^7$  cèl/ml, i per tant contribuint a la fermentació, fins i tot en mostos inoculats amb llevats comercials. Un d'aquests llevats no-*Saccharomyces* és *C. stellata*, llevat que s'identifica majoritàriament dins dels llevats no-*Saccharomyces* a final de fermentació mitjançant la metodologia descrita a l'apartat 2.2.3 de l'annex I. Un dels factors que hauria concorregut a la supervivència dels llevats no-*Saccharomyces* és la baixa temperatura de fermentació, que permet una major tolerància a l'etanol (Gao i Fleet, 1988).

### 1.3 Consum diferencial glucosa i fructosa

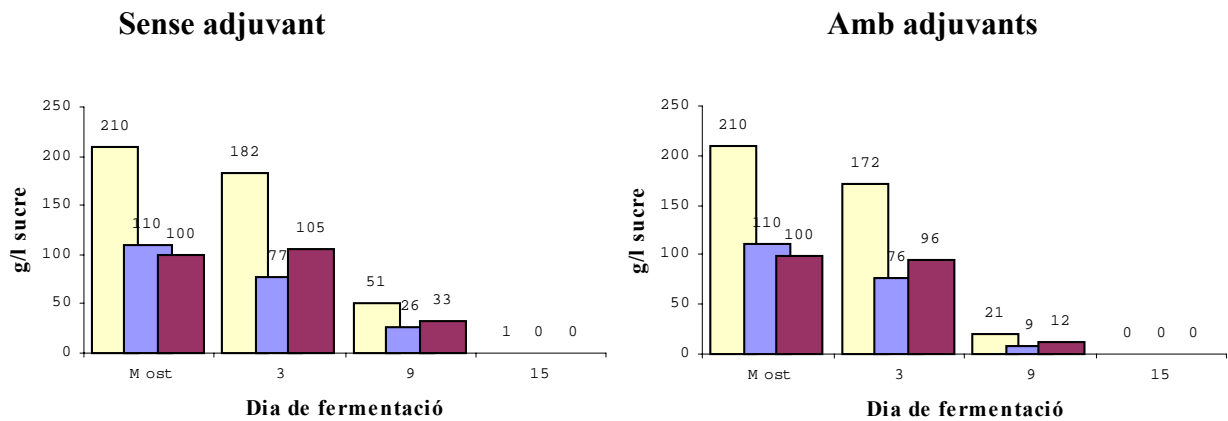
Les quantitats de glucosa i fructosa en el most tenen una relació equimolar com es pot observar a les Figures 22 i 23, fet suficientment descrit per molts autors (Ribéreau-Gayon, 1998). Aquesta relació varia al llarg de la FAL per l'activitat dels llevats. A les mateixes Figures 22 i 23 es comprova un comportament diferent de desaparició de sucre depenent de la temperatura. Es verifica una desaparició de fructosa més important que de glucosa a mitja fermentació a 13 °C. En canvi, a 17 °C és la glucosa el sucre consumit prioritàriament al llarg de tota la fermentació. Es coneix la preferència de la glucosa envers a la fructosa per part dels llevats *S. cerevisiae* (Lagunas, 1993). D'aquesta manera el sucre residual al final de la FAL està constituït principalment per fructosa com es comprova en totes les fermentacions. Una població elevada de llevats no-*Saccharomyces* inicial, el seu major manteniment de la població a la temperatura de 13 °C durant la FAL (veure apartat anterior) i l'existència d'espècies

descrites com fructòfiles com *C. stellata* (Ribéreau-Gayon i col, 1976 ), explicarien la major desaparició de fructosa a mitja fermentació a baixes temperatures.

13 °C



17 °C

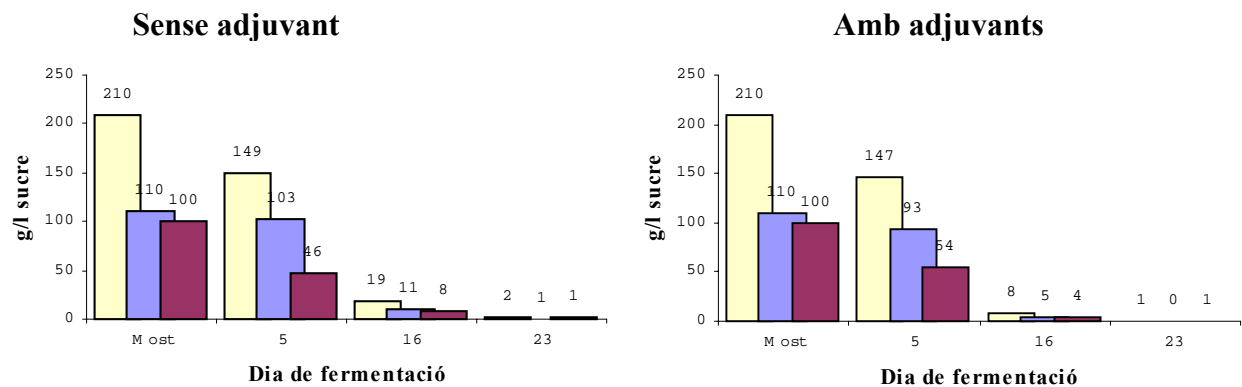


**Figura 22.** Evolució dels continguts en glucosa i fructosa a llarg de les fermentacions inoculades amb la soca Enoferm M2. Legend: Glucosa + fructosa (yellow), Glucosa (blue), Fructosa (maroon). Values representen mitges de tres fermentacions paral·leles. Adjuvants afegits: 0,2 g/l FDA i 0,2 g/l FDK.

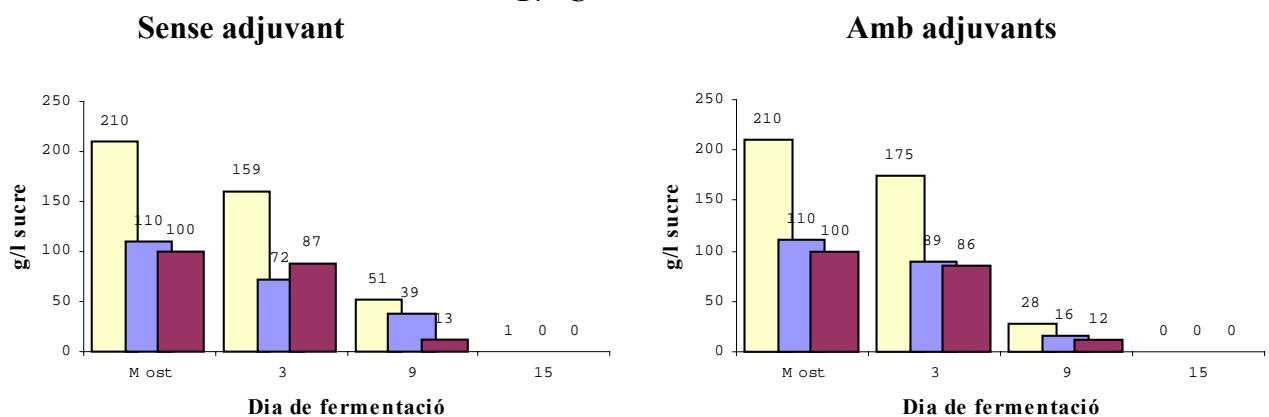
L'afegiment dels adjuvants no fa variar el comportament respecte a la desaparició diferencial dels sucres, només accelera el consum per part dels llevats, i per tant un avançament de la desaparició en el medi.

L'efecte de la soca sobre aquest aspecte és difícil de valorar.

13 °C



17 °C



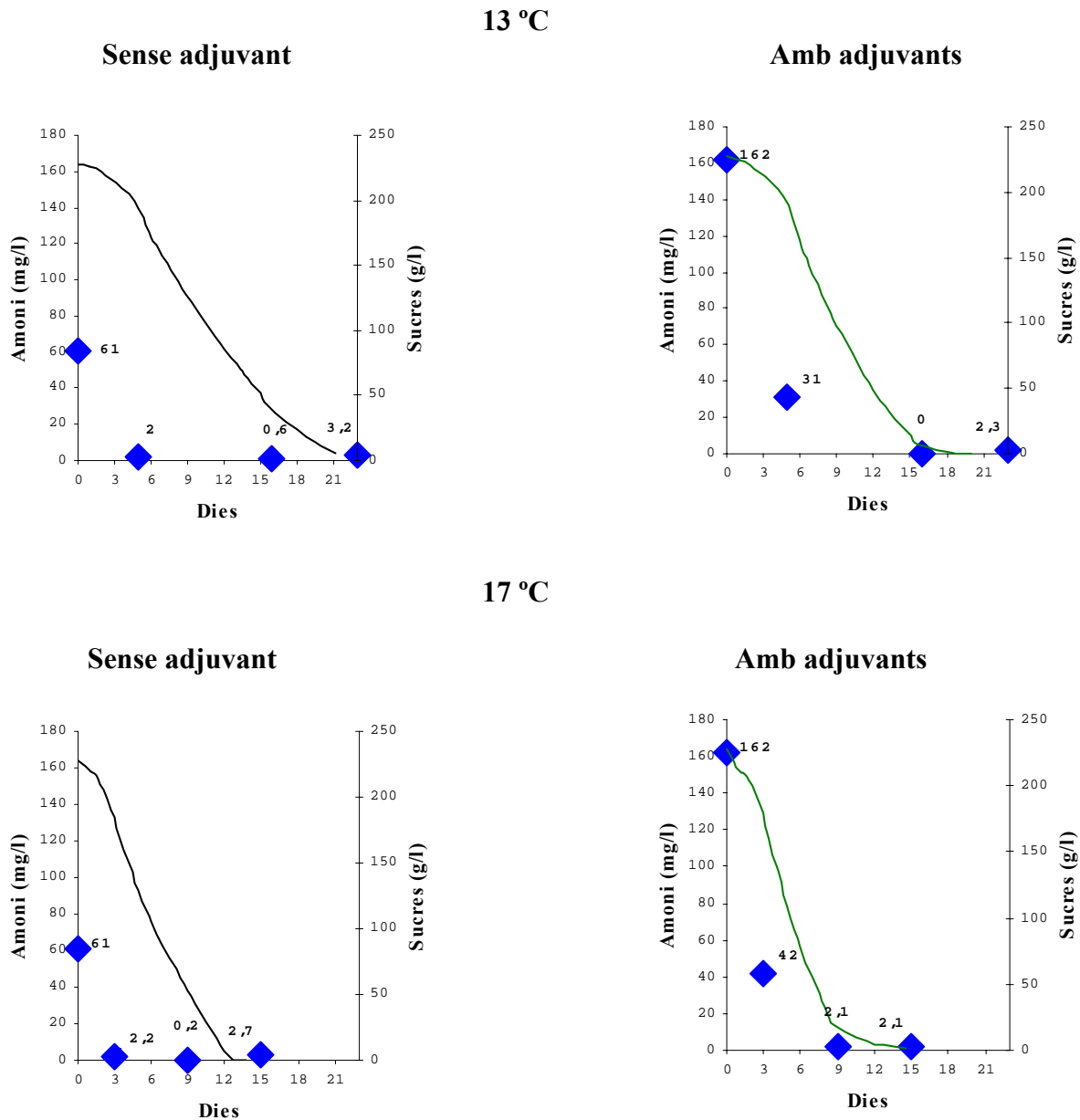
**Figura 23.** Evolució dels continguts en glucosa i fructosa a llarg de les fermentacions inoculades amb la soca AWRI-350. ■ Glucosa + fructosa ■ Glucosa ■ Fructosa. Valors representen mitges de tres fermentacions paral·leles. Adjuvants afegits: 0,2 g/l FDA i 0,2 g/l FDK.

#### 1.4 Consum d'amoni al llarg de la fermentació alcohòlica

Als primers dies de fermentació ja es produeix una desaparició important d'amoni del most (Figures 24 i 25). Cal remarcar que aquesta desaparició d'amoni deguda al consum per part dels llevats és dependent del contingut inicial d'amoni. Així doncs, per als mostos no suplementats es comprova que durant la fase de la latència fins l'inici de fase exponencial de la FAL (dia 3 i 5 per a les fermentacions a 17 °C i 13 °C, respectivament) pràcticament tot l'amoni desapareix del medi. En canvi, per a les fermentacions de mostos suplementats, hi ha un remanent important d'amoni just l'inici de la fase exponencial. La desaparició d'amoni fins aquest punt és similar a ambdues temperatures, 131 i 120 mg/l d'amoni per a 13 i 17 °C respectivament, per les fermentacions inoculades amb Enoferm M2 (Figura 25), i 105 i 104 mg/l d'amoni per a les fermentacions inoculades amb AWRI-350 (Figura 26). Això coincideix amb observacions d'altres autors que indiquen que augmentant la disponibilitat de nitrogen

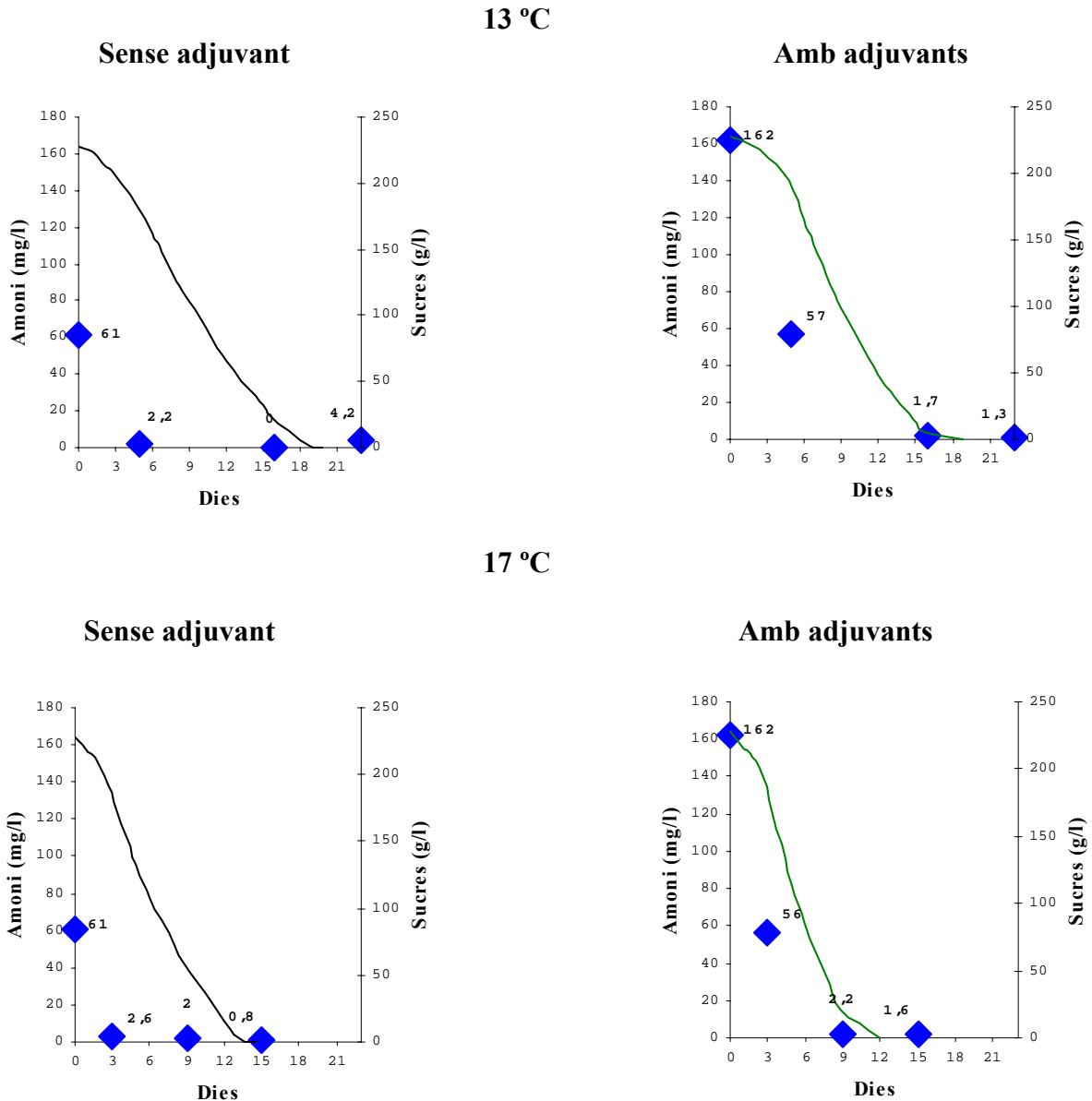
s'augmenta l'assimilació de nitrogen per part dels llevats (Jiranek i col., 1993). Aquest augment d'assimilació de nitrogen en forma d'amoni reverteix en biomassa de llevats que es veu incrementada per a les fermentacions amb adjuvants (dades no mostrades).

Al final de la fase exponencial el contingut d'amoni és ben bé nul, i s'incrementa uns pocs mg/l assolida la FAL, com apunten Charpentier i Feuillat (1993).



**Figura 24.** Representació de la quantitat d'amoni a llarg de les fermentacions inoculades amb Enoferm M2. ◆ Mitja de quantitats d'amoni de tres fermentacions paral·leles. — Cinètica fermentativa.

El consum d'amoni sembla ser dependent de la soca, de manera que s'observa un consum menor d'amoni a l'inici de la fase exponencial de la soca AWRI-350 respecte a la soca Enoferm M2.



**Figura 25.** Representació de la quantitat d'amoni a llarg de les fermentacions inoculades amb AWRI-350. ◆ Mitja de quantitats d'amoni de tres fermentacions paral·leles. — Cinètica fermentativa.

### 1.5 Continguts de glicerol i àcid acètic en els vins

No s'aprecien diferències en el contingut del glicerol dels vins resultants de les fermentacions inoculades amb la soca Enoferm M2 per l'efecte dels adjuvants i la temperatura (Taula 31). Sobre el contingut d'àcid acètic la temperatura no té efecte com factor individual. L'afegiment d'adjuvants permet obtenir vins amb continguts significativament menors. Ambdós factors conjuntament interactuen de manera que el

descens d'àcid acètic degut a l'afegiment d'adjuvants és més important pels vins obtinguts amb fermentacions a 17 °C que a 13 °C. Els adjuvants aportarien factors de creixement i altres elements nutritius que reduirien la producció d'àcid acètic del llevat inoculat (Ribéreau-Gayon i col., 1998), i augmentarien la imposició del llevat enfront a la resta de la microbiota productora d'àcid acètic. La major presència d'aquesta microbiota, en concret de llevats no-*Saccharomyces* (Figures 20 i 21), en fermentacions sense adjuvants explicarien en part les majors quantitats d'àcid acètic trobades en els vins resultants. Aquests fets es veurien accentuats a la temperatura de 17 °C.

**Taula 31.** Composició dels vins.

	<i>T</i>	Enoferm M2		AWRI-350	
		Sense adjuvants	Amb adjuvants (0,2 g/l FDA+0,2 g/l FDK)	Sense adjuvants	Amb adjuvants (0,2 g/l FDA+0,2 g/l FDK)
<b>Glicerol (g/l)</b>	<b>17°C</b>	2,6±0,1	2,6±0,1	2,5±0,1	3,6±0,8 <sup>a</sup>
	<b>13°C</b>	2,8±0,2	2,6±0,1	2,6±0,1	3,2±0,1 <sup>a</sup>
<b>Àcid acètic (mg/l)</b>	<b>17°C</b>	452±63	150±34 <sup>a</sup>	517±49	167±37 <sup>a</sup>
	<b>13°C</b>	397±59	206±49 <sup>a</sup>	510±15	296±49 <sup>t,a</sup>

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de tres fermentacions paral·leles.

**T**, temperatura de fermentació. Diferències significatives ( $p \leq 0.05$ ) pel factor temperatura (t) i factor adjuvant (a).

La soca AWRI-350 produeix més glicerol que la soca Enoferm M2 (Taula 31). A més, els continguts de glicerol dels vins provinents dels mostos suplementats amb adjuvants i inoculats amb aquesta soca són més elevats que aquells sense adjuvants, cosa que no es verifica per a la soca Enoferm M2. La temperatura no té efecte com factor individual per a aquest paràmetre però interactua amb el factor adjuvant de manera que els augments de glicerol tenen lloc a 17 °C.

Els vins produïts per AWRI-350 contenen més àcid acètic (Taula 31) que aquells produïts amb la soca Enoferm M2. Així mateix, per a aquesta soca els adjuvants nutritius fan disminuir les quantitats d'àcid acètic en el vins com també es mostra per a la soca Enoferm M2. La temperatura interactua amb el factor adjuvants en el mateix sentit que per la soca Enoferm M2 .

## 2 EFECTE DE L'ADDICIÓ DE DIFERENTS QUANTITATS DE FOSFAT DE DIAMONI SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA

S'avalua l'eficiència del fosfat de diamoni (FDA) a diferents dosis com un activador de la FAL. El FDA és utilitzat com a font barata de ND emprada habitualment a la indústria enològica.

A partir d'un most de Carinyena, mantingut congelat des de la campanya anterior (tardor 1997), originari de la zona de Capçanes (actualment D.O. Montsant) es van portar a terme microfermentacions de 700 ml a la temperatura de 13 °C, amb quantitats de fosfat de diamoni creixents afegits inicialment. Les característiques enològiques del most es reflecteixen a la Taula 32.

Les quantitats de fosfat de diamoni assajades foren 0 g/l, 0,2 g/l, 0,4 g/l, 1 g/l i 2 g/l. Cada addició es va assajar en dues rèpliques.

Abans d'inocular, s'esterilitzava el most amb dimetil-dicarbonat (Velcorín®, Fluka) amb una dosi de 2 ml per litre de most. Passat el temps de seguretat de 24 hores, s'inoculava amb un llevat comercial Enoferm M2 (Lallemand Inc, Montreal, Quebec, Canadà) amb una població inicial de  $2 \times 10^6$  cèl./ml.

**Taula 32.** Característiques del most.

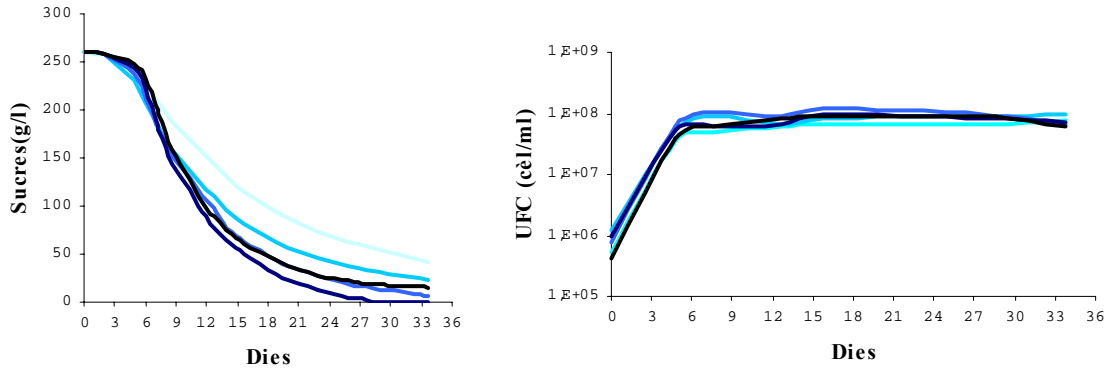
	<b>Most</b>
<b>Sucre (g/l)</b>	260
<b>Acidesa total (g àcid tartàric/ l)</b>	7,3
<b>pH</b>	3,39
<b>SO<sub>2</sub> total (mg/l)</b>	59
<b>Tractament pre-fermentatiu</b>	Macerat Sagnat 10g/Hl bentonita

Es va realitzar el seguiment de la FAL per pesada i de viables com s'indica als apartats 2.1 i 2.2.1 respectivament de l'annex de materials i mètodes.



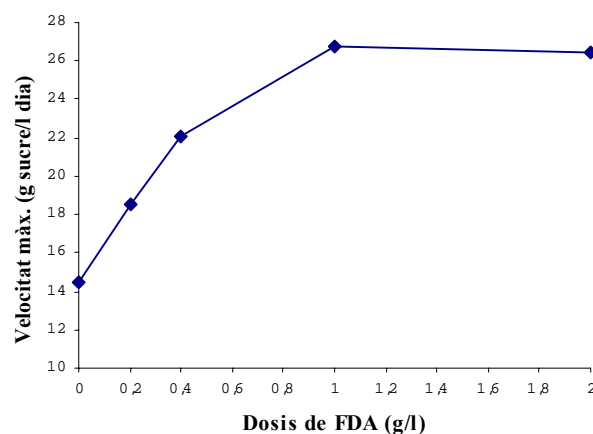
## 2.1 Comparació de paràmetres cinètics de la fermentació alcohòlica

Com s'observa a la Figura 26 i Taula 33 s'obté la major velocitat màxima amb addicions de FDA de 1 g/l.



**Figura 26.** Representacions de les cinètiques fermentatives i de creixement de viables per cada una de les concentracions de FDA afegides. — 0 g/l. — 0,2 g/l. — 0,4 g/l. — 1 g/l. — 2 g/l.

Si bé, l'eficiència relativa de l'addició (quotient entre l'increment de velocitat màxima i l'increment de quantitat d'addició), que representa el pendent en els diferents trams de dosi de FDA, disminueix a mesura que s'apropa a la dosi de 1 g/l tornant-se negatiu en el darrer tram (1- 2 g/l) (Figura 27). Així doncs, del tram 0 a 0,2 g/l de FDA es verifica una eficiència relativa de 20 g sucre/g FDA dia, de 18 g sucre/g FDA dia pel tram de 0,2 a 0,4 g/l, de menys de 8 g sucre/g FDA dia pel tram de 0,4 a 1 g/l, i de -0,4 g sucre/g FDA dia.



**Figura 27.** Relació entre la dosi de FDA i la velocitat màxima de fermentació desenvolupada. El pendent de cada tram representaria l'eficiència relativa de l'addició.

Aquests resultats indiquen que les addicions de FDA són imprescindibles per a l'acabament de les fermentacions d'aquest most, i que l'afegiment de FDA és més efectiu en relació a incrementar la velocitat màxima quan menor és el contingut en nitrogen disponible. Malgrat que afegiments superiors a 1 g/l poden ser contraproductius, com s'observa en les fermentacions amb addicions de 2 g/l. Aquestes fermentacions tenen un major temps de latència i menor velocitat màxima (Figura 26 i Taula 33) que les fermentacions amb afegiments de 1 g/l, la qual cosa indicaria un possible efecte nociu sobre l'activitat dels llevats a aquestes dosis de FDA.

**Taula 33.** Paràmetres cinètics de la fermentació.

	0 g/l	0,2 g/l	0,4 g/l	1 g/l	2 g/l
<b>Temps de latència (dies)</b>	3	3	3	3	4
<b>Velocitat màxima de fermentació (g sucre/l dia)</b>	14,5±0,1	18,5±0,0	22,1±0,3	26,8±0,4	26,4±0,0
<b>Temps total de fermentació (dies)</b>	>34	>34	>34	28	>34

El valor de la velocitat màxima representa la mitja ± desviació estàndard de dues fermentacions paral·leles.

### 3 INCIDÈNCIA DE L'ESPÈCIE DE LLEVAT *Candida stellata* SOBRE LA FERMENTACIÓ ALCOHÒLICA

Amb l'objectiu de valorar la incidència sobre la FAL dels llevats no-*Saccharomyces* i en concret de la espècie de llevat *C. stellata*, llevat no-*Saccharomyces* identificat en major freqüència en microfermentacions de most fresc de campanyes anteriors, es portaren a terme una sèrie de microfermentacions duplicades de 700 ml a la temperatura de 13 °C del most descrit a l'apartat B.2.1 i Taula 32.

S'assajaren varies condicions d'inoculació que es detallen a continuació. A partir del most suplementat amb 0,4 g/l de FDA i esterilitzat amb dimetil-dicarbonat (Velcorin®, Fluka) amb una dosi de 2 ml per litre de most es va inocular una sèrie només amb soca comercial Enoferm M2 (**Enoferm M2**), una altra sèrie amb *C. stellata* (**C. stellata**) i una altra sèrie a una proporció d'inòcul del 50 % de la soca comercial i de *C. stellata* (**EnoM2/C.s.**). Les poblacions d'inòcul foren de  $2 \times 10^6$  cèl./ml. Així mateix, es varen portar a terme dues sèries sense esterilitzar, una s'inoculava amb la soca comercial (**No**

**estèril/EnoM2)** i l'altre no s'inoculava (**No estèril/no inoculat**). Finalment, es va incloure una sèrie amb most sense addició de FDA, esterilitzat i inoculat amb soca comercial (**EnoM2 sense FDA**).

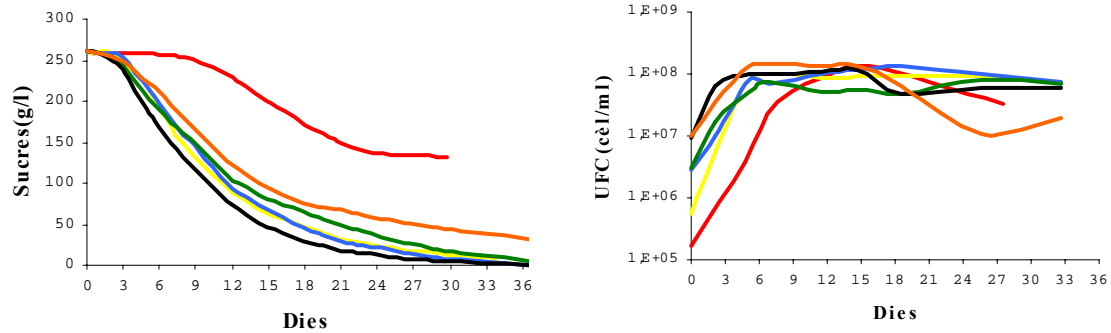
L'inòcul de *C. stellata* prové d'una colònia de plaques de recompte de viables de microfermentacions de most fresc, identificada com a aquesta espècie (veure annex I, apartat 2.2.3.1) i cultivada en 5 ml de medi YPD líquid (YPD sense agar, veure annex I, apartat 2.2.1) amb agitació a temperatura ambient.

Es va realitzar el seguiment de la FAL per pesada i de viables i la determinació de diferents paràmetres cinètics.

### **3.1 Efecte dels inòculs purs i mixtes sobre els paràmetres cinètics de la fermentació alcohòlica**

Les poblacions de viables (Figura 28) superen el valor de  $10^8$  cèl/ml en totes les sèries a excepció de les microvinificacions sense FDA. La menor quantitat de nitrogen disponible pels llevats hauria limitat el creixement en aquestes fermentacions.

Les fermentacions inoculades amb només *C. stellata* (Figura 28 i Taula 34) denoten la baixa capacitat fermentativa d'aquest llevat (Fleet, 1990) de manera que es produeix una aturada de fermentació a 132 g/l de sucre. En canvi, els inòculs mixtes de *S. cerevisiae* i *C. stellata* donen lloc a les fermentacions amb les velocitats màximes més elevades. Alguns autors indiquen que la mort i l'autòlisi de llevats no-*Saccharomyces* als primers estadis de la fermentació podrien aportar fons nitrogenades assimilables per als llevats *S. cerevisiae* (Fleet, 1990; Stuckey i col., 1991).



**Figura 28.** Representacions de les cinètiques fermentatives i de creixement de viables per cada una de les condicions d'inoculació. — Enoferm M2. — *Candida stellata*. — Enoferm M2/*Candida stellata*. — Enoferm M2 sense FDA. — Most no esterilitzat i inoculat amb Enoferm M2. — Most no esterilitzat i sense inocular.

La càrrega inicial de llevats en el most és important com s'aprecia en el recompte de viables pel most sense esterilitzar (Figura 28), encara que aquest most va romandre congelat des de varis mesos. La capacitat fermentativa d'aquesta flora nadiua és minsa i estaria constituïda per llevats no-*Saccharomyces* i soques de *S. cerevisiae* de baix poder fermentatiu. A diferència de les fermentacions inoculades amb cultiu mixte de soca comercial i *C. stellata*, no s'aprecia amb claredat un efecte positiu d'aquesta població nadiua sobre les fermentacions inoculades amb soca comercial.

**Taula 34.** Paràmetres cinètics de la fermentació.

	Enoferm M2	<i>C. stellata</i>	EnoM2/ <i>C.s</i>	EnoM2 sense FDA	No estèril/Eno M2	No estèril/no inoculat
<b>Temps de latència (dies)</b>	3	9	3	3	2	2
<b>Velocitat màxima de fermentació (g sucre/l dia)</b>	19,3±0,6	9,4±0,3	22,3±0,7	15,4±0,0	20,1±0,2	15,4±0,0
<b>Temps total de fermentació (dies)</b>	33	n.a (132 g/l)	34	37	33	>37

El valor de la velocitat màxima representa la mitja ± desviació estàndard de dues fermentacions paral·leles. n.a. fermentació no acabada. (concentració sucre).

## C) PRE-ADAPTACIÓ A LA TEMPERATURA DE FERMENTACIÓ ALCOHÒLICA DE LLEVATS VÍNICS

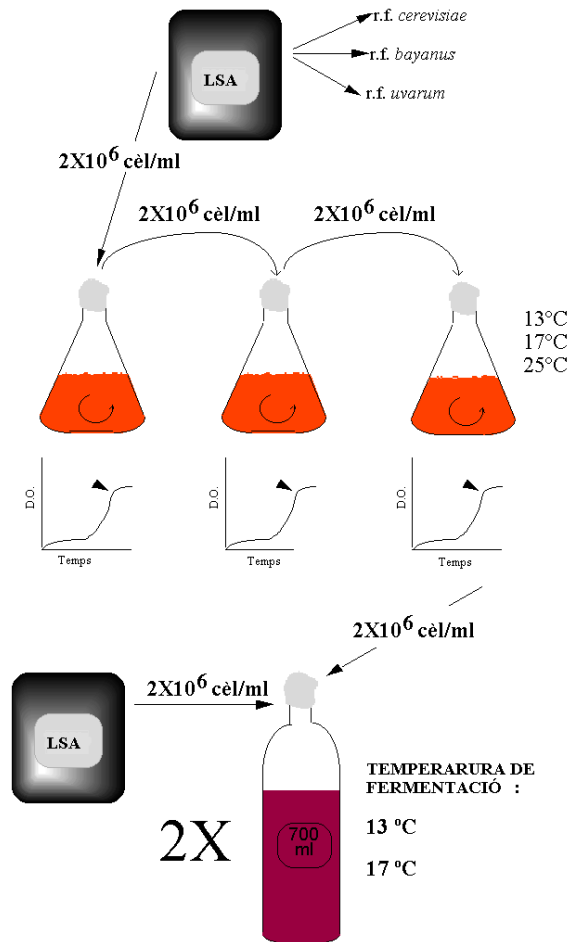
Les fermentacions a baixes temperatures representen pels inòculs de llevats comercials (LSA) un estrès addicional i per tant pot condicionar el desenvolupament correcte de la FAL. S'avalua l'efecte d'inocular al most a fermentar llevats comercials que han estat cultivats prèviament a la temperatura de fermentació.

Es va comparar les microvinificacions portades a 17 °C i 13 °C, i inoculades amb dues soques de llevats comercials, identificades com *S. cerevisiae* (veure annex III). Les denominacions comercials d'aquestes soques són Enoferm M2 i Fermichamp (Gist Brocades, Holanda), designades com a races fisiològiques (r. f.) *cerevisiae i bayanus* respectivament (Figura 20).

Per a cada temperatura i soca es van distribuir en tres grups de fermentacions segons la manera de preparar l'inòcul: 1) rehidratades; 2) rehidratades i subcultivades fins a 3 vegades a la temperatura de fermentació; i 3) rehidratades i subcultivades fins a 3 vegades a 25 °C (efecte peu de cuba). Aquestes microvinificacions es van comparar amb les portades a terme per una soca criotolerant (r.f. *uvarum*) que s'inoculava al most prèviament rehidratada (Figura 29).

Els subcultius es van realitzar en erlenmeyers de 250 ml que contenien YPD líquid (veure annex I, apartat 2.2.1) estèril en agitació, i portats a la temperatura de fermentació. El primer erlenmeyer s'inoculava amb el llevat rehidratat a una població de  $2 \times 10^6$  cèl/ml. Abans que el cultiu arribés a la fase estacionària (seguiments realitzats per mesura de terbolesa a 660 nm) es prenia un volum de cultiu per reinocular un altre erlenmeyer amb medi fresc amb una població de  $2 \times 10^6$  cèl/ml. Es repetia el procés una altra vegada, i una vegada assolit el creixement just abans la fase estacionària s'inoculava amb una població de llevats de  $2 \times 10^6$  cèl/ml 700 ml de most fresc de varietat Carinyena suplementat amb adjuvants nutritius, que es caracteritza a la Taula 35. Les diferents fermentacions es portaven a terme per duplicat.

Es va realitzar el seguiment de la fermentació a nivell de cinètica, creixement i dinàmica poblacional dels llevats, així com l'anàlisi d'amoni, aminoàcids totals i sucres de mostres més significatives a llarg de la FAL. Finalment es va determinar el grau alcohòlic, glicerol, àcid succínic, acetaldehid, alcohols superiors i èsters dels vins resultants.



**Figura 29.** Disseny experimental i procediment seguit per la pre-adaptació a la temperatura de fermentació. LSA: llevat sec actiu.

**Taula 35.** Característiques del most de Carinyena.

	<b>Most</b>
Sucre (g/l)	225
Acidesa total (g àcid tartàric/ l)	5,5
pH	3,35
SO <sub>2</sub> total (mg/l)	32
Nitrogen fàcilment assimilable (mg N/l)*	118 <sup>1</sup> 176 <sup>2</sup>
Tractament pre-fermentatiu	Macerat Sagnat 10g/Hl bentonita

\* Determinat pel mètode del formaldehid (veure annex I, apartat 4.5). 1 sense adjuvants. 2 amb 0,2 g/l FDA i 0,2 g/l de FDK.

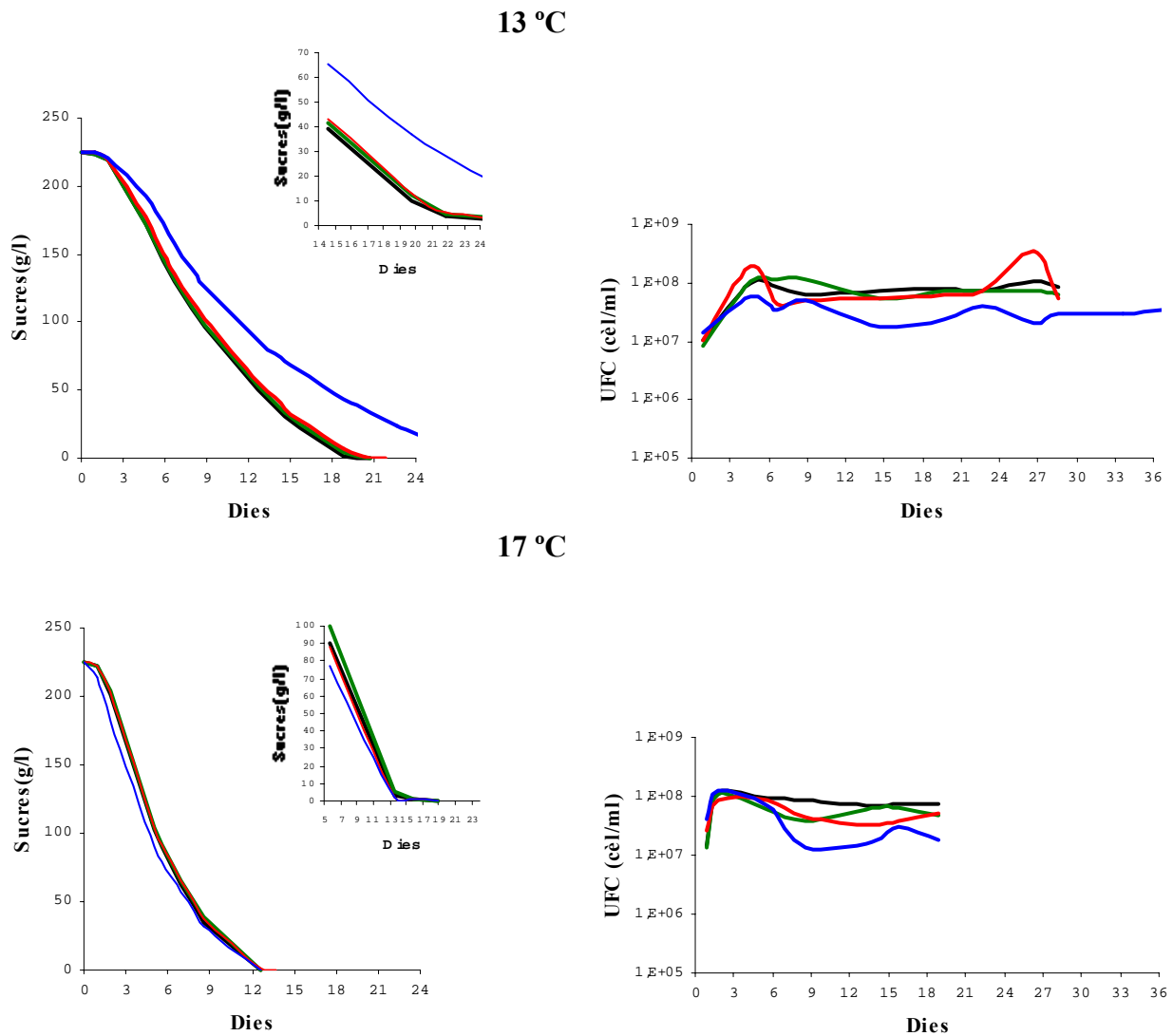
## 1 Efecte de la pre-adaptació a la temperatura de fermentació sobre els paràmetres cinètics

El desenvolupament de la FAL per la soca Enoferm M2 (Figura 30 i Taula 36) és molt similar pels tres tipus de preparació de l'inòcul, sense apreciar-se una millora en el desenvolupament i en els paràmetres cinètics de la pre-adaptació a la temperatura de fermentació. Cal remarcar la menor capacitat fermentativa de la soca de llevat criotolerant a 13 °C, de manera que l' acabament de la fermentació s'allarga. Per aquestes fermentacions les poblacions de llevats no arriben a 10<sup>8</sup> cèl·lules/ml, i per tant el manteniment de la velocitat màxima estaria limitat.

**Taula 36.** Paràmetres cinètics de la fermentació portada per Enoferm M2.

	<b>T</b>	<b>Pre-adaptació</b>	<b>No pre-adaptació</b>	<b>Efecte peu de cuba</b>	<b>Soca criotolerant</b>
<b>Temps de latència (dies)</b>	17°C	1	1	1	1
	13°C	2	2	2	2
<b>Velocitat màxima de fermentació (g sucre/l dia)</b>	17°C	30,4±1,1 <sup>a</sup>	30,6±0,2 <sup>a</sup>	30,0±0,1 <sup>a</sup>	29,0±0,2 <sup>a</sup>
	13°C	16,0±0,2 <sup>a</sup>	18,0±0,5 <sup>a</sup>	17,8±0,5 <sup>a</sup>	16,3±0,2 <sup>a</sup>
<b>Temps total de fermentació (dies)</b>	17°C	13	13	13	13
	13°C	19	19	20	31

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de dues fermentacions paral·leles. T, temperatura de fermentació. Grups estadísticament diferents segons preparació inòcul (a,b,c,d) (p ≤0.05).



**Figura 30.** Cinètiques fermentatives i creixement de poblacions de llevats de microvinificacions portades per la soca Enoferm M2 i el llevat criotolerant. Gràfic superior determinació de sucres per kit enzimàtic (veure annex I, apartat 3.5) dels darrers dies de fermentació. — Inòcul pre-adaptat a 13 °C. — Inòcul no pre-adaptat. — Inòcul crescut a 25 °C (efecte peu de cuba). — Llevat criotolerant.

Per la seva banda, la soca de llevat Fermichamp desenvolupa unes velocitats màximes més elevades que la soca Enoferm M2 (Figura 31 i Taula 37). A diferència de la soca Enoferm M2, s'aprecia un escurçament del temps total de fermentació degut a la pre-adaptació a ambdues temperatures de fermentació, però més remarcable a la temperatura inferior. Les velocitats màximes s'incrementen no significativament a 13 °C i són comparables a les desenvolupades en les fermentacions inoculades amb el llevat cultivat a 25 °C (efecte peu de cuba) a 17 °C.

Les baixes temperatures redueixen la fluïdesa de la membrana plasmàtica dels llevats limitant els canvis conformacionals de transportadors com els transportadors



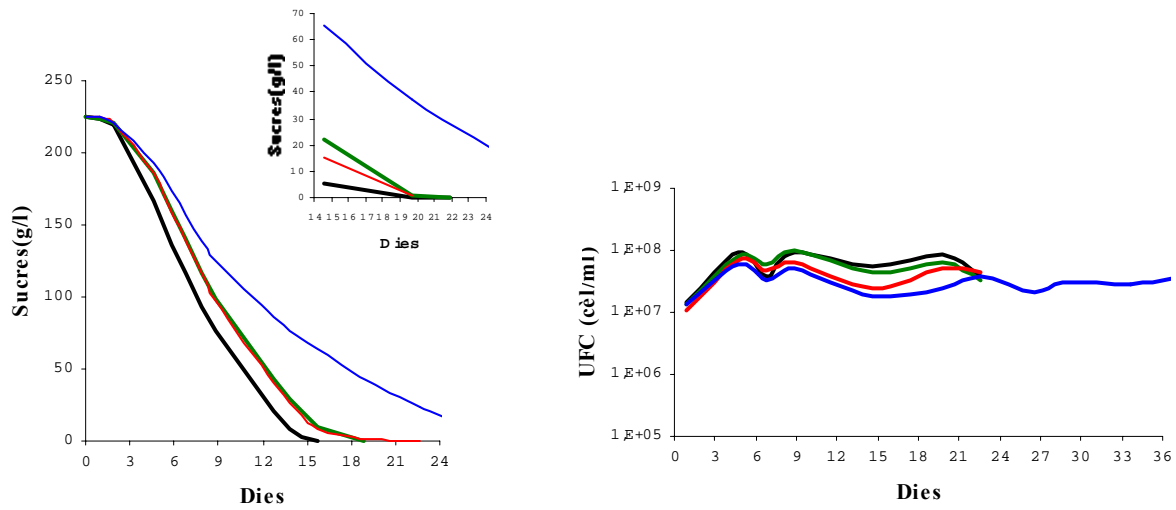
d'hexoses, amoni i aminoàcids, determinants pel correcte desenvolupament de la FAL (Bisson, 1999). Els llevats en aquesta situació canvien la composició lipídica de la membrana per tornar-la més fluïda, i per tant més funcional. Així, un d'aquests canvis és l'augment del grau d'insaturació dels àcids grassos de la membrana (Sinigaglia i col., 1993). Però la insaturació d'àcids grassos requereix oxigen el qual és limitat en condicions de vinificació. El subcultiu a baixes temperatures i en agitació permetria obtenir inòculs de llevats amb membranes enriquides en àcids grassos insaturats i conseqüentment millor adaptades a fermentacions a baixes temperatures.

**Taula 37.** Paràmetres cinètics de la fermentació portada per Fermichamp.

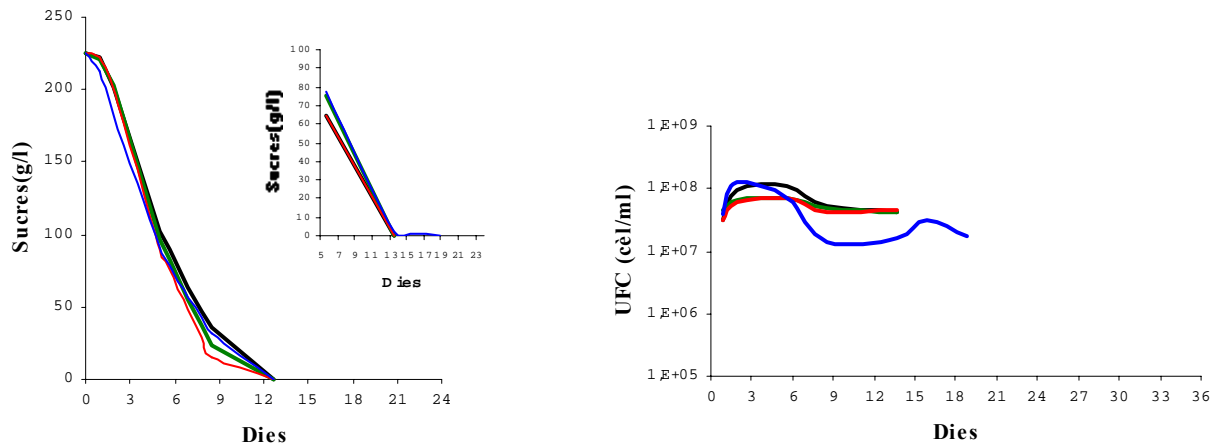
	T	Pre-adaptació	No pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Soca criotolerant
<b>Temps de latència (dies)</b>	17°C	1	1	1	1
	13°C	2	2	2	2
<b>Velocitat màxima de fermentació (g sucre/l dia)</b>	17°C	34,8±0,1 <sup>a</sup>	32,5±0,5 <sup>b</sup>	33,8±0,1 <sup>a/b</sup>	29,0±0,2 <sup>c</sup>
	13°C	21,6±0,8 <sup>a</sup>	20,7±0,5 <sup>a</sup>	21,1±0,1 <sup>a</sup>	16,3±0,2 <sup>b</sup>
<b>Temps total de fermentació (dies)</b>	17°C	11	13	13	13
	13°C	15	19	19	31

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de dues fermentacions paral·leles. T, temperatura de fermentació. Grups estadísticament diferents segons preparació inòcul (a,b,c,d) ( $p \leq 0.05$ ).

13 °C



17 °C



**Figura 31.** Cinètiques fermentatives i creixement de poblacions de llevats de microvinificacions portades per la soca Fermichamp i el llevat criotolerant. Gràfic superior determinació de sucres per kit enzimàtic (veure annex I, apartat 3.5) dels darrers dies de fermentació. — Inòcul pre-adaptat a 13 °C. — Inòcul no pre-adaptat. — Inòcul crescut a 25 °C (efecte peu de cuba). — Llevat criotolerant.

## 2 Dinàmica de poblacions de llevats

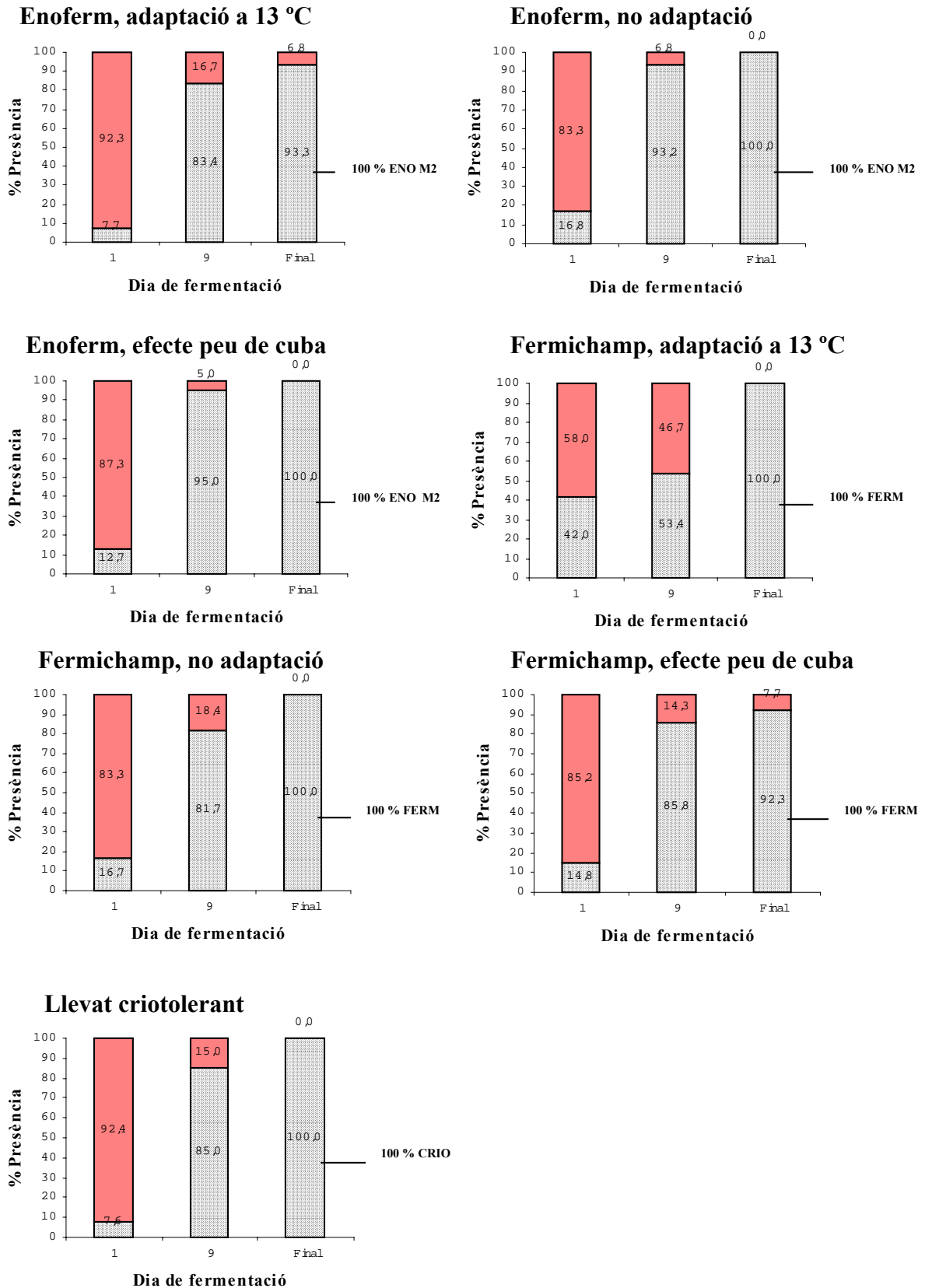
A partir de plaques d'enumeració de viables d'una mostra del most abans d'inocular es va analitzar 30 colònies de llevats no-*Saccharomyces*, mitjançant l'anàlisi de restricció de la regió genòmica que comprèn el gen 5,8S ARN<sub>r</sub> i zones no codificants ITS (veure annex I, apartat 2.2.3.1; annex II). Es varen identificar diferents espècies que coincidien amb els patrons d'amplificats i de digestions dels amplificats de soques de la Colección Española de Cultivos Tipo (Universitat de València) publicats per Esteve-Zarzoso i col., 1999. Les espècies identificades foren *H. uvarum*, *C. stellata*, *P. fermentans*, *C. incommunis* i *P. angophorae*, en ordre de presència. Altres patrons no tenen coincidència amb els publicats. Els llevats de les espècies *C. stellata* i *H. uvarum*

es poden desenvolupar bé en fermentacions portades a baixes temperatures (10 °C- 15 °C), pH elevats (3,5-4,0) i alta concentració de sucre (> 200 g/l), com indiquen Charoenchai i col., (1998). A excepció del pH, les dues altres condicions es compleixen per a les fermentacions assajades fins ara.

Com en fermentacions anteriors la presència de llevats no-*Saccharomyces* en el most domina sobre els llevats *Saccharomyces* (Figures 32 i 33). Aquests predominen cap a mitja fermentació i s'imposen quasi bé totalment al final de fermentació. En tots els casos la soca de llevat trobada al final de fermentació i identificada com *S. cerevisiae*, es tipifica com la soca inoculada.

No es constaten diferències remarcables entre les diferents formes de preparació de l'inòcul a ambdues temperatures.

Com en el most de Carinyena del 97, es repeteixen dos fets ja assenyalats com són: l'elevada càrrega de llevats no-*Saccharomyces* a l'inici amb la conseqüent dificultat d'imposició del llevat inoculat, i la presència de llevats no-*Saccharomyces* al final de fermentació.



**Figura 32.** Evolució de les poblacions de llevats al llarg de la FAL a 13 °C. *Saccharomyces cerevisiae*. No-*Saccharomyces*. Representen mitges de presència de 30 colònies escollides a l'atzar de plaques d'enumeració de població de dues fermentacions paral·leles. **ENO M2:** soca inoculada Enoferm M2. **FERM** soca inoculada Fermichamp. **CRIO:** soca inoculada criotolerant.

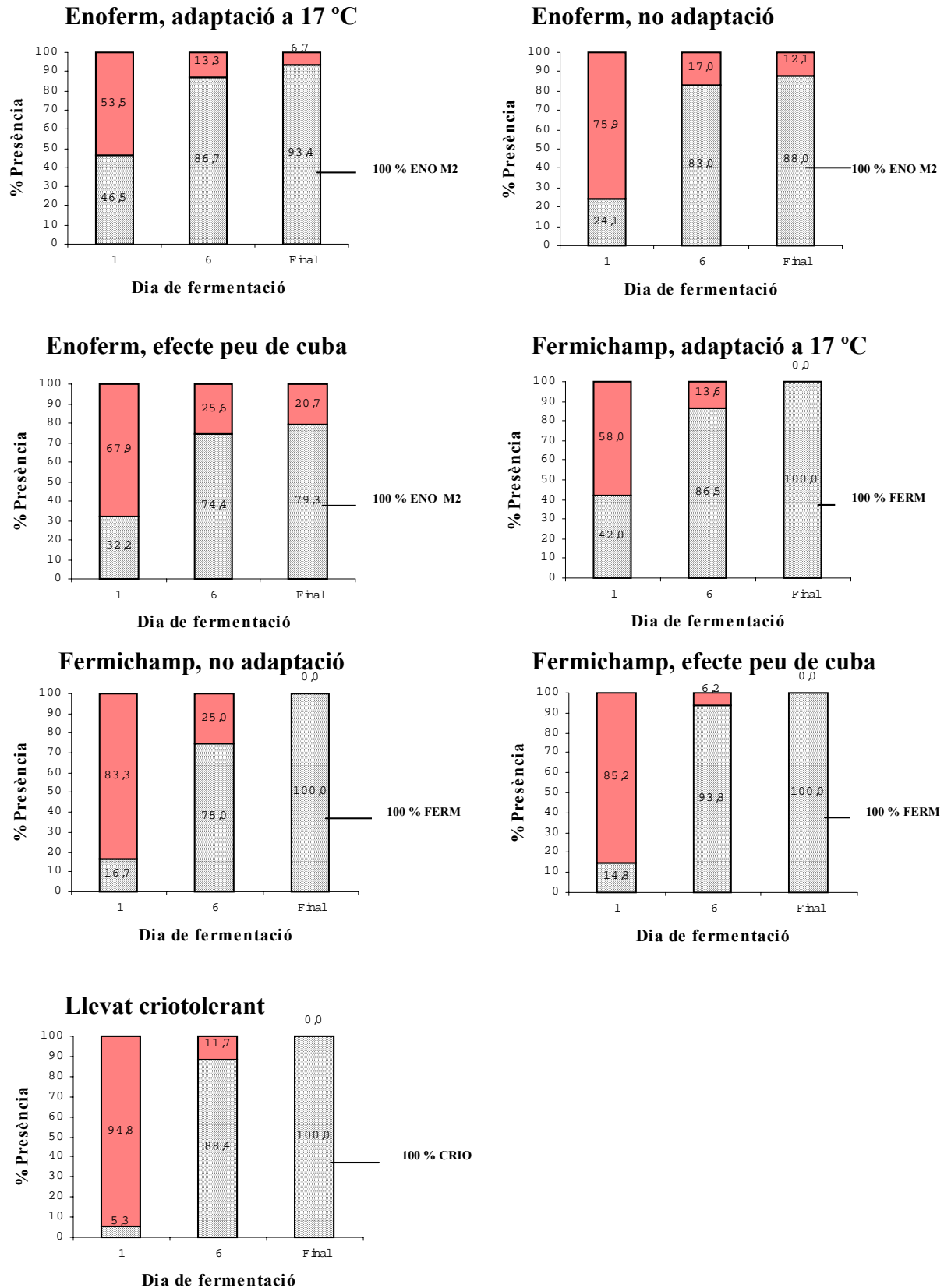


Figura 33. Evolució de les poblacions de llevats al llarg de la FAL a 17 °C.

▨ *Saccharomyces cerevisiae*. ■ No-*Saccharomyces*. Representen mitges de presència de 30 colònies escollides a l'atzar de plaques d'enumeració de població de dues fermentacions paral·leles. **ENO M2**: soca inoculada Enoferm M2. **FERM** soca inoculada Fermichamp. **CRIO**: soca inoculada criotolerant.

### 3 Evolució del contingut d'amoni i aminoàcids al llarg de la fermentació

L'amoni desapareix del medi ja en els primers dies com s'observa a la Taula 38 i 39. A la temperatura de 13 °C la velocitat de desaparició d'amoni per a les fermentacions inoculades amb Enoferm M2 no varien. En canvi, per a la soca Fermichamp el consum d'amoni és més ràpid per a l'inòcul pre-adaptat que per a les altres formes de preparació de l'inòcul. Per la seva banda les fermentacions inoculades amb la soca criotolerant mostren la menor velocitat de consum d'amoni que aniria lligada al menor vigor de les cinètiques fermentatives desenvolupades.

**Taula 38.** Contingut d'amoni (mg/l) al llarg de les fermentacions a 13 °C.

TEMPS	ENOFERM M2			FERMICHAMP			Soca criotolerant
	Pre-adaptació	No pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Pre-adaptació	No pre-adaptació	Efecte peu de cuba	
MOST	125	125	125	125	125	125	125
5	0,7±0,1	0,5±0,4	3,3±2,3	0,5±0,1	40±17	40±17	49±5
9	0,8±0,5	0,5±0,3	0,9±0,6	0,2±0,2	0,4±0,5	0,2±0,1	0,4±0,1
15	0,4±0,0	0,4±0,0	0,3±0,0	0,4±0,0	0,5±0,1	0,4±0,0	0,2±0,3
FINAL	0,4±0,1	0,5±0,0	0,5±0,0	0,7±0,1	0,5±0,2	6±0,1	0,9±0,3

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de dues fermentacions paral·leles.

No s'observen grans variacions de desaparició d'amoni entre les tres soques i les diferents maneres de preparar l'inòcul a la temperatura menys extrema de 17 °C. També s'observa una tendència a un petit augment d'amoni cap al final de la fermentació.

**Taula 39.** Contingut d'amoni (mg/l) al llarg de les fermentacions a 17 °C.

TEMPS	ENOFERM M2			FERMICHAMP			Soca criotolerant
	Pre-adaptació	No pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Pre-adaptació	No pre-adaptació	Efecte peu de cuba	
Most	125	125	125	125	125	125	125
2	21±0,2	22±0,1	21±0,3	21±0,2	22±0,2	20±1,5	19±3,3
6	0,7±0,0	0,6±0,3	0,8±0,1	0,7±0,1	0,9±0,1	0,5±0,2	0,9±0,0
14	0,7±0,2	0,4±0,0	0,8±0,2	1,1±0,5	0,7±0,0	0,4±0,2	0,5±0,1
19	1,1±0,0	1,5±0,9	1,3±0,0				1,4±0,5

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de dues fermentacions paral·leles.

En relació als continguts d'aminoàcids totals al llarg de la fermentació (Taula 40 i 41), segueixen un comportament similar als continguts d'amoni. Així, a 13 °C la desaparició d'aminoàcids és més ràpida per a les fermentacions inoculades amb la soca Fermichamp pre-adaptada, seguida per l'inòcul subcultivat a 25 °C. La velocitat de desaparició d'aminoàcids en les fermentacions inoculades amb la soca Fermichamp no pre-adaptada i amb l'inòcul de Enoferm M2, independentment de la preparació de l'inòcul, és similar. Per a les fermentacions inoculades amb la soca criotolerant es

verificaria una desaparició d'aminoàcids més lenta. Al dia 9 de fermentació totes les fermentacions contenen unes quantitats d'aminoàcids que estarien al voltant de 30 mg/l. Aquest remanent estaria constituït principalment per aminoàcids no assimilats pels llevats, majoritàriament en forma de prolina. No s'aprecien gaires diferències en el contingut fins al final de la fermentació.

**Taula 40.** Contingut d'aminoàcids totals (mg gly/l) al llarg de les fermentacions a 13 °C.

TEMPS	ENOFERM M2			FERMICHAMP			Soca criotolerant
	Pre-adaptació	No pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Pre-adaptació	No pre-adaptació	Efecte peu de cuba	
MOST	543	543	543	543	543	543	543
5	120±14	115±8,8	119±3,2	77±2,6	128±9,8	90±9,5	165±7,7
9	36±17	36±1,2	47±11	32±2,8	33±9,6	30±3,4	38±6,3
15	29±0,1	37±3,9	29±0,1	20±0,4	22±2,3	23±1,3	42±2,6
FINAL	35±1,3	37±1,7	37±6,2	34±11	33±9,2	22±0,2	39±8,5

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de dues fermentacions paral·leles. Mètode de determinació per la ninhidrina, expressat en quantitats de glicina (gly).

La desaparició d'aminoàcids està al voltant del 90 % al segon dia des de la inoculació de la soca Fermichamp pre-adaptada a la temperatura de 17 °C (Taula 27). També per a la soca Fermichamp es constata una major celeritat de desaparició d'aminoàcids per a les fermentacions inoculades amb els llevats pre-adaptats. Cal assenyalar que la soca criotolerant fa desaparèixer els aminoàcids del medi de manera comparable a la soca Fermichamp pre-adaptada. Es podria pensar que per a la soca criotolerant la temperatura de 17 °C és més idònia que la 13 °C en relació a les capacitats fermentatives. Com el cas de les fermentacions a 13 °C també la disminució màxima dels contingut d'aminoàcids situa el contingut remanent al voltant de 30 mg/l. S'observa cap al final de la fermentació un augment del contingut d'aminoàcids al medi. Bisson, 1991, indica que cap al final de la fermentació degut a la disfuncionalitat de les membranes del llevats es dona un alliberament d'aminoàcids. Els continguts d'aminoàcids al final de la fermentació sembla dependre de la soca que ha portat a terme la fermentació.

**Taula 41.** Contingut d'aminoàcids totals (mg gly/l) al llarg de les fermentacions a 17 °C.

TEMPS	ENOFERM M2			FERMICHAMP			Soca criotolerant
	Pre-adaptació	No pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Pre-adaptació	No pre-adaptació	Efecte peu de cuba	
MOST	543	543	543	543	543	543	543
2	148±9,0	226±29	173±44	40±4,0	223±16	132±41	53±24
6	32±7,0	43±2,0	38±1,4	30±4,2	26±1,3	35±5,0	30±0,7
14	42±11	39±7,8	46±2,0	41±7,2	48±2,7	54±2,8	52±2,8
19	61±4,2	51±5,6	69±10				78±4,0

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de dues fermentacions paral·leles. Mètode de determinació per la ninhidrina, expressat en quantitats de glicina (gly).

#### 4 Contingut d'etanol i productes secundaris en els vins

Les fermentacions portades a 17 °C rendeixen més etanol que a 13 °C per a les diferents fermentacions inoculades amb la soca Enoferm M2 (Taula 42). Aquest fet també s'observa per a les fermentacions inoculades amb la soca Fermichamp, encara que les diferències degudes a la temperatura no són en aquest cas estadísticament significatives. En relació a la preparació de l'inòcul, els vins procedents de fermentacions inoculades amb la soca no pre-adaptada produeix més etanol que la pre-adaptada i crescuda a 25 °C. En canvi, els vins de fermentacions inoculades amb la soca Fermichamp no mostren diferències segons la manera de preparar l'inòcul. La comparació d'ambdues soques segons els continguts d'etanol que produeixen indica que la soca Enoferm M2 és marcadament més alcohologènica que la soca Fermichamp.

Les quantitats de glicerol en els vins produïts a partir de la inoculació de la soca Enoferm M2 són més elevades a 13 °C que a 17 °C (Taula 42). Aquest fet difereix de les observacions de Castellari i col., 1995 els quals indiquen un augment del glicerol al passar de temperatures de fermentació subòptimes a òptimes més elevades, tant per a soques criotolerants com per a soques no-criotolerants. La manera de preparar l'inòcul també té una incidència significativa en el contingut de glicerol, ja que els vins procedents de fermentacions inoculades amb el llevat pre-adaptat contenen més glicerol. Aquestes observacions es repeteixen per a la soca Fermichamp (Taula 43), però sense significació estadística. La soca Enoferm M2 també produeix més glicerol que la soca Fermichamp. Cal indicar que els vins fruit de la inoculació de la soca criotolerant per a fermentacions a 17 °C contenen les quantitats de glicerol més elevades. Una de les



característiques enològiques d'aquestes soques és la producció més elevada de glicerol en relació a altres soques (Feuillat i col., 1996).

**Taula 42.** Composició dels vins produïts per les soques Enoferm M2 i criotolerant.

	<i>T</i>	Pre-adaptació	No Pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Soca criotolerant	<i>P</i>
<b>Etanol (% v/v)</b>	17°C	13,9±0,0	14,7±0,4	14,2±0,0	14,2±0,6	t/i/-
	13°C	13,8±0,1	14,2±0,0	13,8±0,4	13,2±0,0	
<b>Glicerol (g/l)</b>	17°C	9,1±0,3	8,8±0,2	9,1±1,2	12,9±0,3	t/i/◇
	13°C	10,8±2,0	10,1±1,0	7,9±2,0	8,5±0,2	
<b>Àcid succínic (g/l)</b>	17°C	1,4±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1	0,9±0,0	-i/-
	13°C	1,4±0,1	1,2±0,1	1,3±0,0	0,8±0,0	
<b>Àcid acètic (mg/l)</b>	17°C	1002±32	1188±38	1020±74	1685±5	t/i/-
	13°C	930±21	1026±64	939±77	1211±45	
<b>Acetaldehid (mg/l)</b>	17°C	13±2,2	16±2,7	28±9,8	19±1,1	-i/-
	13°C	13±1,6	12±0,3	16±0,4	22±0,6	

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de dos vins de fermentacions paral·leles. *T*, temperatura de fermentació. Anova (anàlisi de la variància) de dos factors (temperatura/preparació inòcul) sobre el contingut dels vins. -: diferències no significatives. t: efecte de la temperatura fermentació. i: efecte preparació inòcul ◇: diferència significativa dels dos factors conjuntament. Nivell de significació:  $p \leq 0,05$ . No es reflecteix l'anàlisi estadístic dels valors de la soca criotolerant amb la resta de soques.

Les quantitats d' àcid succínic en els vins (Taulas 42 i 43) no varien gaire degut a la temperatura de fermentació. Per a la soca inoculada Enoferm M2 es comprova una influència de la preparació de l'inòcul, de manera que s'obtenen vins amb continguts augmentats d' àcid succínic per al llevat pre-adaptat. La soca Enoferm M2 produeix més àcid succínic que la soca Fermichamp. Per una altra banda, les quantitats d'àcid succínic per les fermentacions inoculades amb la soca criotolerant són les més minses. Aquest fet no es correspon al descrit per Feuillat i col., 1997, que indiquen que les soques criotolerants augmenten les quantitats d'àcids orgànics.

La temperatura de 13 °C dóna vins amb continguts d'àcid acètic menors que a la temperatura de fermentació més elevada (Taulas 42 i 43) per a totes les soques assajades, encara que únicament per a les soques Enoferm M2 i criotolerant la

diferència és prou significativa. Els continguts d'àcid acètic més elevats corresponen als vins resultants de la inoculació de la soca criotolerant, caracteritzada per estudis amb most estèril com a llevats productors limitats d'àcid acètic (Castellari i col., 1994; Giudici i col., 1995; Feuilla i col., 1997). Les dificultats d'imposició de la soca criotolerant sobre els llevats no-*Saccharomyces* i altres soques de llevats *S. cerevisiae* endògenes al most en estudi, i consegüentment el desenvolupament d'aquestes farien augmentar els continguts d'àcid acètic.

En general els inòculs pre-crescuts ja sigui a la temperatura de fermentació ja sigui a 25 °C, donen lloc a vins amb continguts menors d'àcid acètic que el llevat únicament rehidratat.

**Taula 43.** Composició dels vins produïts per les soques Fermichamp i criotolerant.

	<i>T</i>	Pre-adaptació	No Pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Soca criotolerant	<i>P</i>
<b>Ethanol (% v/v)</b>	17°C	14,2±0,0	14,0±0,3	13,5±0,4	14,2±0,6	-/-/-
	13°C	13,8±0,0	13,4±0,6	13,9±0,4	13,2±0,0	
<b>Glicerol (g/l)</b>	17°C	8,9±0,2	9,7±0,8	6,7±0,2	12,9±0,3	-/-/-
	13°C	10,4±2,0	9,8±1,3	8,3±0,4	8,5±0,2	
<b>Àcid succínic (g/l)</b>	17°C	1,3±0,1	1,2±0,0	1,2±0,1	0,9±0,0	-/-/-
	13°C	1,2±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1	0,8±0,0	
<b>Àcid acètic (mg/l)</b>	17°C	678±28	911±9,9	702±34	1685±5	-/-/-
	13°C	340±56	948±33	758±41	1211±45	
<b>Acetaldèhid (mg/l)</b>	17°C	45±6,7	59±6,7	52±1,3	19±1,1	t/i/-
	13°C	15±2,4	32±5,5	23±0,3	22±0,6	

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de dos vins de fermentacions paral·leles. *T*, temperatura de fermentació. Anova (anàlisi de la variància) de dos factors (temperatura/preparació inòcul) sobre el contingut dels vins. -: diferències no significatives. t: efecte de la temperatura fermentació. i: efecte preparació inòcul ∅: diferència significativa dels dos factors conjuntament. Nivell de significació:  $p \leq 0,05$ . No es reflecteix l'anàlisi estadístic dels valors de la soca criotolerant amb la resta de soques.

Les fermentacions inoculades amb soques Enoferm M2 i criotolerant donen els vins amb els continguts d'acetaldèhid (Taula 42 i 43) més baixos. La temperatura de fermentació també té rellevància en el contingut d'acetaldèhid, i es verifiquen continguts menors a la temperatura més baixa. L'efecte temperatura té més incidència

per a la soca Fermichamp que per a la soca Enoferm M2. Així mateix, els inòculs pre-adaptats donen lloc a vins amb menor contingut d'acetaldèhid.

Els continguts dels diferents alcohols superiors analitzats (Taules 44 i 45), a excepció del 1-hexanol, varien per efecte de la temperatura, soca i modalitat de preparació de l'inòcul, amb interacció dels tres factors. Així, a 13 °C s'observen continguts augmentats de 1-propanol estadísticament significatius per a la soca Enoferm M2 i no estadísticament significatius per a la soca Fermichamp. En canvi, a la temperatura de fermentació més elevada de 17 °C, els vins contenen més 2-metil-propanol, 3-metil-1-butanol i 2-fenil etanol.

**Taula 44.** Alcohols superiors dels vins produïts per les soques Enoferm M2 i criotolerant.

mg/l	T	Pre-adaptació	No Pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Soca criotolerant	P
<b>1-Propanol</b>	17°C	62±1,4	51±0,0	66±7,8	61±0,7	t/i/-
	13°C	86±2,8	70±6,4	80±2,1	54±4,2	
<b>2-Metil-1-propanol</b>	17°C	55±4,2	38±0,0	66±2,1	73±3,3	t/i/◇
	13°C	54±2,1	43±2,1	46±3,5	33±4,2	
<b>3-metil-1-butanol</b>	17°C	377±37	164±0	374±22	313±07	-i/◇
	13°C	349±16	298±21	180±11	243±18	
<b>1-Hexanol</b>	17°C	1,13±0,08	1,13±0,08	1,30±0,10	1,27±0,14	-/-/-
	13°C	1,21±0,12	1,09±0,00	1,23±0,00	1,21±0,02	
<b>2-Fenil etanol</b>	17°C	106±8,2	87±2,8	109±10	59±0,1	t/-/-
	13°C	29±2,5	25±0,8	33±5,6	27±3,3	

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de dos vins de fermentacions paral·leles. T, temperatura de fermentació. Anova (anàlisi de la variància) de dos factors (temperatura/preparació inòcul) sobre el contingut dels vins. -: diferències no significatives. t: efecte de la temperatura fermentació. i: efecte preparació inòcul ◇: diferència significativa dels dos factors conjuntament. Nivell de significació:  $p \leq 0,05$ . No es reflecteix l'anàlisi estadístic dels valors de la soca criotolerant amb la resta de soques.

Per una altra banda, la incidència de la modalitat de preparació de l'inòcul en el contingut està relacionada amb la soca de llevat i la temperatura de fermentació. Es verifiquen augments de propanol per a l'inòcul pre-adaptat de la soca Enoferm M2, sense observar diferències per a la soca Fermichamp. El mateix comportament es

comprova pels continguts de 2-metil-propanol, sense que hi hagi diferències entre l'inòcul pre-adaptat a la temperatura de fermentació i l'inòcul crescut a 25 °C.

**Taula 45.** Alcohols superiors dels vins produïts per les soques Fermichamp i criotolerant.

mg/l	T	Pre-adaptació	No Pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Soca criotolerant	P
<b>1-Propanol</b>	17°C	42±6,4	47±13	42±5,6	61±0,7	t/-/-
	13°C	52±1,4	63±3,5	44±0,0	54±4,2	
<b>2-Metil-1-propanol</b>	17°C	53±3,5	64±14	53±6,4	73±3,3	t/-/-
	13°C	30±0	31±6,4	25±0,0	33±4,2	
<b>3-metil-1-butanol</b>	17°C	421±5,6	477±2	368±74	313±07	t/i/◇
	13°C	188±16	359±0,7	282±0,0	243±18	
<b>1-Hexanol</b>	17°C	1,16±0,07	1,07±0,20	1,21±0,07	1,27±0,14	-/-/-
	13°C	1,16±0,07	1,09±0,11	1,08±0,25	1,21±0,02	
<b>2-Fenil etanol</b>	17°C	106±7,8	38±0,0	66±2,1	59±0,1	t/i/◇
	13°C	67±4,6	51±0,7	49±14	27±3,3	

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de dos vins de fermentacions paral·leles. T, temperatura de fermentació. Anova (anàlisi de la variància) de dos factors (temperatura/preparació inòcul) sobre el contingut dels vins. -: diferències no significatives. t: efecte de la temperatura fermentació. i: efecte preparació inòcul ◇: diferència significativa dels dos factors conjuntament. Nivell de significació:  $p \leq 0,05$ . No es reflecteix l'anàlisi estadístic dels valors de la soca criotolerant amb la resta de soques.

Les quantitats d'alcohol isoamílic (3-metil-1-butanol) estan augmentades pels inòculs pre-adaptats de la soca Enoferm M2 i disminuïts per la soca Fermichamp.

El 2-fenil etanol, compost favorable pels vins per donar aromes de rosa millorant l'expressió aromàtica, té les concentracions incrementades en els vins produïts pel llevat pre-adaptat de la soca Fermichamp. Cal indicar, que la soca criotolerant descrita com a millorant en l'expressió aromàtica del vi (Feuillat i col., 1997) produeix menys 2-fenil etanol que les restants soques.

A les Taules 46 i 48 es dóna una relació d'altres compostos, denominats genèricament èsters, que intervenen en l'aroma del vi per a les fermentacions inoculades amb les soques Enoferm M2 i Fermichamp, respectivament, i es resumeixen en les Taules 47 i 49 agrupats en tres famílies de compostos. Aquestes són, àcids grassos,

èsters d'àcids grassos i acetats, en els quals s'inclouen l'acetat d'isoamil (banana), acetat 2-feniletíl (rosa) i succinat de dietíl (floral).

**Taula 46.** Àcids grassos, èsters d'àcids grassos i acetats d'alcohols superiors dels vins produïts per les soques Enoferm M2 i criotolerant.

mg/l	<i>T</i>	Pre-adaptació	No Pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Soca criotolerant
<b>Butirat d'etil</b>	17°C	0,25±0,02	0,50±0,32	0,24±0,00	0,18±0,00
	13°C	0,30±0,12	0,27±0,09	0,35±0,02	0,29±0,00
<b>Acetat d'isoamil</b>	17°C	1,19±0,19	0,69±0,56	1,00±0,09	0,27±0,01
	13°C	0,94±0,26	0,75±0,02	0,82±0,03	0,33±0,06
<b>Hexanoat d'etil</b>	17°C	0,54±0,03	0,83±0,05	0,57±0,04	0,31±0,01
	13°C	0,55±0,10	0,76±0,06	0,61±0,09	0,70±0,06
<b>Octanoat d'etil</b>	17°C	3,47±0,67	7,59±2,10	3,44±0,24	1,87±0,10
	13°C	3,09±1,73	4,34±0,16	5,72±0,64	6,74±0,69
<b>Decanoat d'etil</b>	17°C	0,15±0,08	0,46±0,34	0,20±0,00	0,11±0,01
	13°C	0,17±0,15	0,21±0,03	0,58±0,17	0,46±0,07
<b>Succinat de dietíl</b>	17°C	0,50±0,17	0,30±0,20	0,52±0,02	0,31±0,02
	13°C	0,32±0,05	0,34±0,01	0,08±0,10	0,13±0,03
<b>Acetat 2-fenil-etil</b>	17°C	0,20±0,00	0,21±0,05	0,20±0,01	0,07±0,00
	13°C	0,23±0,17	0,10±0,00	0,15±0,00	0,04±0,00
<b>Dodecanoat d'etil</b>	17°C	0,01±0,00	1,89±2,66	0,02±0,00	0,02±0,00
	13°C	0,02±0,01	0,03±0,00	0,04±0,00	0,02±0,00
<b>Àcid hexanoic</b>	17°C	2,38±0,28	2,10±1,54	2,60±0,18	1,48±0,01
	13°C	2,49±0,31	3,12±0,04	2,44±0,19	3,19±0,17
<b>Àcid octanoic</b>	17°C	3,22±0,2	2,72±1,07	3,91±0,08	1,78±0,22
	13°C	3,65±0,88	4,44±0,08	3,09±0,28	4,45±0,11
<b>Àcid decanoic</b>	17°C	0,60±0,16	2,28±1,79	1,39±0,04	0,57±0,09
	13°C	1,12±1,17	1,45±0,05	1,19±0,24	1,35±0,14
<b>Àcid dodecanoic</b>	17°C	0,04±0,03	0,03±0,01	0,14±0,00	0,07±0,01
	13°C	0,11±0,11	0,20±0,01	0,01±0,00	0,04±0,03

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de dos vins de fermentacions paral·leles. **T**, temperatura de fermentació.

**Taula 47.** Àcids grassos, èsters d'àcids grassos i acetats d'alcohols superiors dels vins produïts per les soques Enoferm M2 i criotolerant.

mg/l	T	Pre-adaptació	No Pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Soca criotolerant	P
Àcids grassos ( $\Sigma$ )	17°C	6,25±0,34	7,13±0,83	8,04±0,22	3,91±0,29	-/-
	13°C	7,37±1,85	9,20±0,10	7,10±0,55	9,03±0,38	
Èsters d'àcids grassos ( $\Sigma$ )	17°C	4,41±0,71	11,28±5,48	4,46±0,28	2,50±0,11	-/-
	13°C	4,13±2,12	5,61±0,16	4,01±4,65	8,21±0,82	
Acetats d'alcohols superiors ( $\Sigma$ )	17°C	1,89±0,03	1,19±0,72	1,72±0,07	0,66±0,00	-/-
	13°C	1,50±0,14	1,19±0,03	0,60±0,67	0,50±0,03	

Cada valor representa la mitja  $\pm$  desviació estàndard de dos vins de fermentacions paral·leles. T, temperatura de fermentació. Anova (anàlisi de la variància) de dos factors (temperatura/preparació inòcul) sobre el contingut dels vins. -: diferències no significatives. t: efecte de la temperatura fermentació. i: efecte preparació inòcul  $\diamond$ : diferència significativa dels dos factors conjuntament. Nivell de significació:  $p \leq 0,05$ . No es reflecteix l'anàlisi estadístic dels valors de la soca criotolerant amb la resta de soques.

L'anàlisi estadística de les diferents famílies de compostos (Taula 47 i 49) només revela diferències en relació al contingut d'àcid grassos entre les soques inoculades en les fermentacions (estadística no mostrada). Si bé, per a la soca Fermichamp, la temperatura i la modalitat de preparació de l'inòcul tenen efectes en els continguts d'aquests compostos a excepció dels àcids grassos, no se'n verifiquen en cap cas per a la soca Enoferm M2. Això, estaria en sintonia amb els treballs descrits per varis autors (Soles i col., 1982; Ribéreau-Gayon, 1998; Lema i García, 2000) que assenyalen la incidència de la soca sobre el contingut d'aquests compostos.

Així, per a les fermentacions inoculades amb la soca Fermichamp s'obtenen a 17 °C vins amb majors continguts d'acetats i menors continguts d'èsters d'àcids grassos respecta a la temperatura de 13 °C. Cal assenyalar, que Rapp i Versini, 1997, especifiquen que a temperatures més baixes són produïts i retinguts més èsters fruitats (acetats d'isoamil, acetat d'isobutil, butirat d'etil, acetat d'hexil), i que les concentracions octanoat d'etil i d'acetat 2-feniletíl s'incrementen amb l'augment de la temperatura. En relació a la modalitat de preparació dels inòculs, amb la soca pre-adaptada s'obtenen vins amb continguts més elevats d'èsters d'àcids grassos al comparar amb les altres modalitats. En canvi, els inòculs pre-cultivats a 25 °C rendeixen vins amb continguts d'àcids grassos i acetats més elevats, amb poca diferència amb els inòculs pre-adaptats.

**Taula 48.** Àcids grassos, èsters d'àcids grassos i acetats d'alcohols superiors dels vins produïts per les soques Fermichamp i criotolerant.

mg/l	<i>T</i>	Pre-adaptació	No Pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Soca criotolerant
<b>Butirat d'etil</b>	17°C	0,03±0,00	0,16±0,15	0,34±0,14	0,18±0,00
	13°C	0,24±0,01	0,18±0,16	0,18±0,19	0,29±0,00
<b>Acetat d'isoamil</b>	17°C	0,88±0,19	0,73±0,11	0,88±0,16	0,27±0,01
	13°C	0,75±0,04	0,59±0,02	1,00±0,11	0,33±0,06
<b>Hexanoat d'etil</b>	17°C	0,54±0,03	0,30±0,24	0,57±0,06	0,31±0,01
	13°C	0,63±0,07	0,50±0,12	0,64±0,15	0,70±0,06
<b>Octanoat d'etil</b>	17°C	2,05±0,27	2,17±0,51	3,23±0,39	1,87±0,10
	13°C	5,00±0,28	2,91±1,25	3,27±0,83	6,74±0,69
<b>Decanoat d'etil</b>	17°C	0,09±0,00	0,13±0,04	0,20±0,03	0,11±0,01
	13°C	0,25±0,07	0,18±0,08	0,17±0,04	0,46±0,07
<b>Succinat de dietil</b>	17°C	0,27±0,07	0,13±0,04	0,32±0,11	0,31±0,02
	13°C	0,22±0,01	0,18±0,03	0,18±0,06	0,13±0,03
<b>Acetat 2-fenil-etil</b>	17°C	0,34±0,02	0,30±0,01	0,24±0,20	0,07±0,00
	13°C	0,25±0,01	0,15±0,02	0,21±0,04	0,04±0,00
<b>Dodecanoat d'etil</b>	17°C	0,01±0,00	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,00
	13°C	0,01±0,00	0,02±0,01	0,01±0,00	0,02±0,00
<b>Àcid hexanoic</b>	17°C	2,45±0,17	1,96±0,07	2,63±0,32	1,48±0,01
	13°C	2,82±0,34	2,26±0,24	2,82±0,06	3,19±0,17
<b>Àcid octanoic</b>	17°C	3,65±0,80	2,71±0,10	3,32±0,12	1,78±0,22
	13°C	4,24±0,05	2,92±0,76	4,37±0,45	4,45±0,11
<b>Àcid decanoic</b>	17°C	0,05±0,00	0,05 ±0,02	0,84±0,25	0,57±0,09
	13°C	1,61±0,27	1,13±0,47	1,22±0,00	1,35±0,14
<b>Àcid dodecanoic</b>	17°C	0,07±0,00	0,07±0,08	0,51±0,54	0,07±0,01
	13°C	0,12±0,02	0,14±0,09	0,06±0,02	0,04±0,03

Cada valor representa la mitja ± desviació estàndard de dos vins de fermentacions paral·leles. **T**, temperatura de fermentació.

**Taula 49.** Àcids grassos, èsters d'àcids grassos i acetats d'alcohols superiors dels vins produïts per les soques Fermichamp i criotolerant.

mg/l	T	Pre-adaptació	No Pre-adaptació	Efecte peu de cuba	Soca criotolerant	P
Àcids grassos ( $\Sigma$ )	17°C	6,22±0,21	4,79±0,09	7,29±0,73	3,91±0,29	-i/-
	13°C	5,97±0,34	5,34±0,10	8,47±0,35	9,03±0,38	
Èsters d'àcids grassos ( $\Sigma$ )	17°C	2,72±0,03	2,78±0,93	4,35±0,33	2,50±0,11	t/i/◇
	13°C	7,50±0,07	2,63±0,16	4,27±0,70	8,21±0,82	
Acetats d'alcohols superiors ( $\Sigma$ )	17°C	1,50±0,17	1,16±0,10	1,44±0,07	0,66±0,00	t/i/-
	13°C	1,22±0,05	0,88±0,03	1,39±0,09	0,50±0,03	

Cada valor representa la mitja  $\pm$  desviació estàndard de dos vins de fermentacions paral·leles. T, temperatura de fermentació. Anova (anàlisi de la variància) de dos factors (temperatura/preparació inòcul) sobre el contingut dels vins. -: diferències no significatives. t: efecte de la temperatura fermentació. i: efecte preparació inòcul ◇: diferència significativa dels dos factors conjuntament. Nivell de significació:  $p \leq 0,05$ . No es reflecteix l'anàlisi estadístic dels valors de la soca criotolerant amb la resta de soques.

L'anàlisi per components principals (veure annex I) de les variables que representen gran part del component volàtil del vi (Taulas 44, 45, 46, 47, 48 i 49) ens confirmen de manera més global el que ja s'ha descrit gràcies a l'anàlisi de la variància (MANOVA). Es construeixen tres eixos factorials (X: 26 %, Y: 25 %, Z: 16 %) que representen el 66,4 % de la informació inicial, suficient per veure agrupacions de les diferents fermentacions degudes a la soca inoculada i a la temperatura de fermentació. A la Taula 50 s'indica les variables que contribueixen més a formar les tres components.

**Taula 50.** Variables que contribueixen més a la formació dels eixos.

Factor 1 (X)	Factor 2 (Y)	Factor 3 (Z)
Acetat d'isoamil (-0,76)	3-Metil-1-butanol (-0,72)	Propanol (0,82)
Succinat de dietil (-0,78)	Àcids grassos ( $\Sigma$ ) (0,82)	
	Èsters d'àcids grassos ( $\Sigma$ ) (0,84)	

(coeficients de regressió lineal respecte als eixos formats)





Les representacions de les diferents fermentacions sobre els eixos principals permet indicar que la temperatura té una incidència en els continguts d'acetat d'isoamil i de succinat d'etil, de manera que a 13 °C s'obtenen vins amb menys quantitats respecte a 17 °C. A aquesta darrera temperatura les quantitats dels esmentats compostos no són tant homogènies. Un efecte de la temperatura sobre el contingut de la totalitat d'àcids grassos, èsters d'àcids grassos i 3-metil-1-butanol també s'observa però de manera més lleugera. Per una altra banda el contingut de propanol estarien influenciats clarament per a la soca inoculada, obtenint amb la soca Enoferm M2 vins que contenen més propanol que amb la soca Fermichamp.

Vista la presència important a l'inici de fermentació de llevats no-*Saccharomyces* (Figures 32 i 33), es de preveure que tinguin una forta incidència en la composició de productes secundaris del vi, i en concret en la composició dels components volàtils representada principalment pels alcohols superiors i èsters. En aquest sentit, Soden i col. (2000), varien el perfil aromàtic dels vins de Chardonnay al co-fermentar els mostos amb una soca comercial de *S. cerevisiae* i amb una soca ben establerta de *C. stellata*.

## CONCLUSIONS



## CONCLUSIONS

1. Es verifiquen grans diferències respecte a la composició nitrogenada entre els mostos estudiats. La composició aminoacídica ens permet agrupar els mostos segons el seu origen. En tots els casos, el contingut en nitrogen disponible pels llevats supera àmpliament el valor mínim necessari per portar a terme la fermentació, a excepció del most de Carinyena que ho supera lleugerament.
2. Els adjuvants nutritius subministrats a les dosis habituals aporten al most nitrogen disponible principalment en forma d'amoni, i en menys mesura en forma d'aminoàcids. El Fermaid K (FDK) a part aporta factors de creixement i elements desintoxicants.
3. La temperatura marca de manera important el desenvolupament de la fermentació alcohòlica de forma que a la temperatura més alta (17 °C) s'incrementen les velocitats màximes i s'escorcen les durades de fermentació. Així mateix, a més baixa temperatura (13 °C) s'accentuen el problemes fermentatius que es presentaven a la temperatura més alta.
4. L'efecte dels adjuvants nutritius utilitzats sobre la fermentació alcohòlica depèn del tipus d'adjuvant, de la dosi aplicada, composició nitrogenada del most i el moment d'aplicació. Augmenten les velocitats màximes i disminueix en la durada fermentativa dels mostos amb quantitats moderades de nitrogen disponible, no tenen efecte sobre la fermentació amb mostos amb continguts elevats de nitrogen disponible, i no solucionen alentiments de fermentació. Aplicacions dels adjuvants en fermentacions molt avançades no tenen efectes sobre el desenvolupament de la fermentació. Són contraproductes dosis d'aplicacions d'adjuvant que representin més de 950 mg/l de nitrogen disponible pels llevats, és preferible no superar el 500 mg/l degut a que s'observa una reducció de l'activació de la fermentació alcohòlica a valors superiors.
5. S'ha trobat un paràmetre empíric que té en compte el contingut de sucre del most i el nitrogen disponible contingut en els aminoàcids neutres. Aquest paràmetre es

correlaciona linealment amb la velocitat màxima de fermentació per a tots els mostos assajats, tant els mostos sense suplementar amb adjuvants com els suplementats. Aquest paràmetre estimaria la fermentabilitat d'un most.

6. Es comprova un lleuger efecte sinèrgic dels adjuvants assajats, fosfat de diamoni (FDA) i Fermaid K (FDK) que només es verifica per a la soca Enoferm M2.
7. Els adjuvants permeten una millor imposició de la soca inoculada.
8. L'afegiment d'adjuvants dona lloc a vins amb menys quantitat d'àcid acètic i en general d'alcohols superiors.
9. Els llevats nadius, i en concret els no-*Saccharomyces*, tenen una incidència a l'inici de la fermentació alcohòlica. Competeixen amb la soca inoculada, i poden fer variar el consum diferencial de sucres, i en fermentacions alentides tenir una influència en la composició dels vins finals.
10. Es verifica una millora fermentativa en pre-cultivar els inòculs a la temperatura de fermentació. Aquest fet és dependent de la soca de llevat inoculada.
11. Hi ha una certa incidència en els continguts de productes secundaris pel fet de pre-adaptar l'inòcul a la temperatura de fermentació, dependent de la soca de llevat inoculada i temperatura de fermentació.
12. Es constanten certes característiques inherents del most de lavarietat Carinyena que dificulten el correcte desenvolupament de la fermentació alcohòlica, com són la càrrega inicial important de llevats nadius i el baix contingut de nitrogen disponible pels llevats. Els adjuvants afegits permeten una millor imposició de la soca de llevat comercial que ha portat l'acabament de la fermentació.

## ANNEX I





## ANNEX I. MATERIALS I MÈTODES

### 1 MOSTOS I CONDICIONS DE FERMENTACIÓ

#### 1.1 Microfermentadors

Les fermentacions es duen a terme en ampolles de vidre (Pyrex o Simax) 500 ml o en ampolles bordoleses (750 ml), prèviament netes. Cada ampolla porta una mosca magnètica que permetrà homogeneïtzar el líquid abans de prendre mostres, i un tap fet de cotó fluix. Tot el conjunt s'autoclava.

#### 1.2 Mostos

Els mostos frescos provenen de Miguel Torres, S.A. Els mostos de varietats blanques estan desfangats, i els de les varietats negres sagnats després d'una breu maceració amb les pel·lofes (no més de 24 hores), destinats a la producció de vins blancs i rosats respectivament.

#### 1.3 Ompliment dels microfermentadors

Les ampolles s'omplen amb most de manera que hagi la mínima cambra d'aire i no es mulli el tap. Això, representa uns 450 ml per a les ampolles de 500 ml i uns 700 ml per a les ampolles de vi. Segons l'experiment, s'omplen 3 o 2 ampolles per condició, amb el most corresponent.

#### 1.4 Preparació de l'inòcul de llevat i inoculació

Els llevats secs actius (LSA) comercials es rehidraten en 10 vegades el seu pes en aigua tèbia (30 °C-40 °C) sucrada (5 %) segons especifica la casa productora. Es remena suaument durant 30 minuts per evitar la formació de grumolls i maximitzar la viabilitat. Poc abans que passi la mitja hora, s'agafa una mostra del rehidratat, i es fa un recompte de cèl·lules en cambra de Neubauer. Coneixent el nombre de cèl·lules/ml es calcula el volum de rehidratat necessari per inocular els microfermentadors amb  $2 \times 10^6$  cèl·lules/ml en la majoria dels experiments.

#### 1.5 Presa de mostra

Durant la fermentació alcohòlica es prenen mostres. Una alíquota servirà per al seguiment de població, i la resta de la mostra es centrifuga a baixes revolucions per a poder descartar les cèl·lules. Es dispensen en tubs petits de plàstic de 1,5 ml (Eppendorf), i es conserven congelats a -20 °C, fins el moment de les anàlisis. Pels vins acabats, es centrifuguen a baixes revolucions, una part es dispensa per congelar-lo, i la resta s'utilitza immediatament per a anàlisis que requereixen volum gran de mostra, com la determinació grau alcohòlic.

## 2 SEGUIMENT FERMENTACIÓ

### 2.1 Seguiment de la cinètica fermentativa

La monitorització de la fermentació, es a dir el consum de sucres a llarg dels temps, es realitzà per pesades diàries (1 cop o 2 cops) dels fermentadors amb una granetari electrònic Fy-200 (A & D, Japó). La pèrdua de pes diària del fermentador representar el CO<sub>2</sub> format fruit de la fermentació de sucre. Amb la següent fórmula (Geneix, 1984), que té en compte un rendiment hipotètic, el valor de diòxid de carboni format es transforma en sucre (hexoses) fermentat. En cas de presa de mostra, es fa una pesada abans i després de la presa, i es desprecia el volum perdut en el mostreig.

$$-\Delta_{\text{sucres}}(\text{g/l}) = (P_t - P_{t+1}) \cdot \frac{100}{46 \cdot V_f}$$

$-\Delta_{\text{sucres}}(\text{g/l})$ : Consum de sucres.

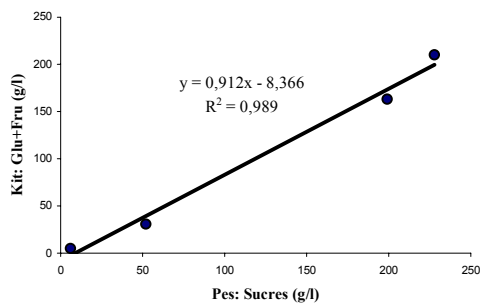
$P_t$ : Pes en temps t.

$P_{t+1}$ : Pes en un temps posterior t+1.

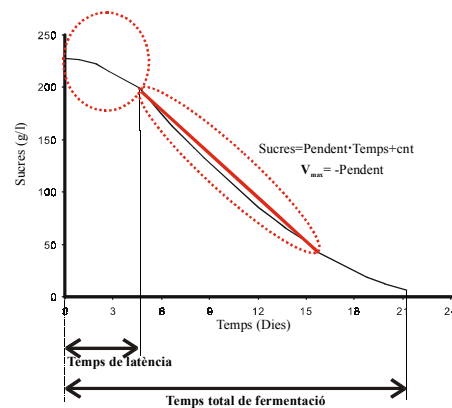
$V_f$ : Volum de most en litres.

Coneixent la quantitat de sucre inicial del most per mètodes que es descriuen més endavant, es confeccionen les corbes consum sucre respecte al temps. A partir d'aquestes corbes s'obtenen els valors de temps de latència, velocitat màxima, com el valor absolut del pendent de la part lineal de la corba, i temps total de fermentació. Es considerada acabada la fermentació quan les quantitats de sucres residuals són igual o menors a 2 g/l.

a)



b)



**Figura A1.** a) Correlació lineal de dos mètodes de determinació de sucres a llarg de la fermentació alcohòlica: mètode de pesada del fermentador i mètode de determinació de hexoses per kit enzimàtic (Boeringher Mannheim). b) Càlcul de paràmetres cinètics de la fermentació: Velocitat màxima ( $V_{\text{max}}$ ), temps de latència i durada de la fermentació alcohòlica.

## 2.2 Seguiment de poblacions de microorganismes

### 2.2.1 Recompte de viables

El creixement dels llevats durant la fermentació alcohòlica es porta a terme determinant el nombre de colònies crescudes (UFC, unitats formadores de colònies) en plaques de Petri que contenen **medi sòlid YPD**, amb la següent composició:

Glucosa:	20 g
Peptona (Difco):	20 g
Extracte de llevat (Difco):	10 g
Agar (tipus E, Biokar Diagnostics):	20 g
Aigua destil·lada:	1000 ml

La mescla s'autoclava, i es dispensa a les plaques a una temperatura convenient (uns 50 °C).

#### Procediment:

- 1) Sembrar la placa amb un inòcul (mostra diluïda adientment) de 100 µl.
- 2) Estendre per la superfície mitjançant una nansa de Digralski o perles de vidres prèviament esterilitzades.
- 3) Introduir les plaques en un incubador a 30 °C.
- 4) Contar les colònies de les plaques passat 48 hores, i confeccionar les gràfiques a escala logarítmica envers al dia de fermentació.

### 2.2.2 Aïllament de llevats *Saccharomyces* i no-*Saccharomyces*.

Les espècies de llevats *Saccharomyces* no poden créixer en un medi que contingui lisina com a única font de nitrogen, en canvi els altres llevats es desenvolupen.

El **medi lisina** es prepara de la següent manera:

- 1) Preparar una solució de lactat potàsic:
  - 18 ml d'àcid làctic al 85 %.
  - 14 g KOH.
- 2) D'aquesta solució agafar 4 ml i s'afegeixen a 1 litre d'aigua destil·lada.
- 3) Addicionar 66 g de pols de medi lisina (ADSA micro).
- 4) Escalfar la mescla fins dissoldre totalment el medi amb agitació per a evitar sobreescalfament.
- 5) Refredar fins a 50 °C en un bany i s'afegeix 1 ml d'àcid làctic al 10 % per ajustar el pH aproximadament a 5.0.
- 6) Distribuir en plaques.

#### Procediment:

- 1) Repicar amb un escuradents estèril una colònia de la placa de recompte de viable escollida a l'atzar en una placa amb medi YPD i una altra amb medi lisina.
- 2) Repetir l'operació fins a 30 colònies.
- 3) Introduir les plaques en un incubador a 30 °C.
- 4) Comprovar creixement de les plaques.

Els llevats *Saccharomyces* formen colònies només a les plaques de YPD, i en canvi les no-*Saccharomyces* en ambdues plaques.

### 2.2.3 Identificació i tipificació dels llevats

Els llevats no-*Saccharomyces* s'identifiquen només a nivell d'espècie, i els llevats *Saccharomyces* es tipifiquen fins a nivell de soca.

#### 2.2.3.1 Identificació a nivell d'espècie

El mètode consisteix en explotar la variabilitat d'una regió de la unitat repetida ADN<sub>r</sub> del genoma del llevat que inclou el gen que codifica per l'ARN<sub>r</sub> 5.8S i dos regions no codificants anomenades espaiadors transcrits interns (ITS1 i ITS2).

El primer pas del mètode és amplificar aquesta regió genòmica mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (White i col., 1990). La diferència de mida dels amplificats ja ens permet diferenciar i identificar espècies. El següent pas és la digestió dels amplificats amb endonucleases. Les mides dels amplificats i de les bandes de digestió resoltes electroforèticament es comparen amb aquelles obtingudes del llevat tipus de la CECT (Colección Española de Cultivos Tipos, Valencia, Espanya).

#### Procediment:

##### **PCR**

- 1) Collir les cèl·lules directament de una colònia de llevat fresc amb un escuradent estèril, i resuspendre en 50 µl de mescla de la reacció.
- 2) La mescla de la reacció de PCR conté 0,5 µM de l'encebador ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') i 0,5 µM de l'encebador ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), 10 µM deoxinucleòtids (dNTPS), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> i tampó 1 X. Tots els productes de la firma Ecogen.
- 3) Escalfar la suspensió 95 °C durant 15 minuts en un termociclador (Perkin-Elmer).
- 4) Passat aquest temps afegir a cada tub entre 0,5 i 1 unitats d'ADN Taq polimerasa (Ecogen).
- 5) Iniciar el programa de PCR amb les següents condicions: desnaturalització inicial a 95 °C durant 5 minuts/ 35 cicles de desnaturalització a 95 °C durant 0,5 minuts, hibridació a 52 °C durant 1 minut i extensió a 72 °C durant 1 minut/ extensió final a 72 °C durant 10 minuts.

##### **Digestions amb endonucleases**

- 1) Preparar la mescla de digestió (un tub per enzim) de volum total de 25 µl que conté 10 µl del producte de PCR (aproximadament entre 0,5 i 1,0 µg d'ADN), tampó 1 X corresponent a cada enzim i 5 unitats d'enzim (*CfoI*, *HaeIII* o *HinfI* (Boeringer Mannheim)).
- 2) Incubar els tubs un mínim de dues hores al bany a 37 °C.

##### **Resolució dels productes de PCR i de digestió**

###### **Preparació del gel d'agarosa**

- 1) Afegir la quantitat d'agarosa (multipropose, Boeringher Mannheim) pel percentatge estipulat (els productes de PCR i de les digestions es resolen en gels d'agarosa de 1% i 2%, respectivament) al tampó TBE (Tris base 89 mM, àcid bòric 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8), i escalfar al microones fins que s'observi una solució nítida.
- 2) Refredar fins a 50 °C, afegir una quantitat de bromur d'etidi (0,5 µg/ml), abocar al motlle del gel, i col·locar les pintes que conformaran els pous per les mostres.
- 3) Un cop sòlid, introduir el gel dins la cubeta d'electroforesi plena de tampó TBE.

###### **Càrrega**

Les mostres s'apliquen a les que prèviament s'hi ha addicionat **solució de carregar** (1 µl per 5 µl de mostra) per facilitar la càrrega de la mostra i el seguiment de l'electroforesi (solució 10 x: 0,25 % (p/v) blau de bromofenol, 1% (p/v) dodecilsulfat sòdic (SDS), 20 % (v/v) glicerol, 0,1 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8).

###### **Electroforesi**

L'electroforesi es porta a terme entre 50 i 100 volts durant un mínim de dues hores.

###### **Visualització**

Es visualitza el resultat en un transil·luminador de llum UV i es fotografia (Polaroid DS-34). Les mides de les bandes s'estimen per comparació amb un patró de grandària d'ADN (100 pb ladder, GIBCO-BRL).

### 2.2.3.2 Tipificació a nivell de soca

Per a la identificació de soques s'aprofita l'alt polimorfisme trobat en els perfils de restricció de l'ADN mitocondrial. La eficiència del mètode es basa en l'elecció d'enzims de restricció amb dianes molt freqüents al genoma, de manera que queda molt esmicolat després de la digestió, i no es requereix per tant una purificació de l'ADN mitocondrial. En canvi aquest enzims tenen poques dianes en una zona de l'ADN mitocondrial altament repetit, on s'explota la variabilitat (Querol i col., 1992).

El mètode es porta a terme amb una aïllament de l'ADN total del llevat, digestió amb nucleasa escollida i obtenció de perfils de bandes per electroforesi en gel d'agarosa a 0,8 %.

#### Procediment:

##### Extracció d'ADN

- 1) Es fa créixer les cèl·lules en 5 ml de medi YPD (mateixa composició que el sòlid però sense agar) durant 12 hores (o temps suficient per obtenir un bon creixement) a 26 °C
- 2) Centrifugar a 10 minuts a 3.000 rpm. Rebutjar el sobrenedant.
- 3) Resuspendre el pellet amb 5 ml d'aigua agitant amb vòrtex per netejar les cèl·lules.
- 4) Centrifugar durant 10 minuts a 3.000 rpm. Rebutjar el sobrenedant.
- 5) Afegir 500 µl de tampó 1 (0,9 M sorbitol, 0,1 M EDTA, pH=7,5). Es resuspèn el pellet i es traspasa a un tub Eppendorf.
- 6) Afegir 40 µl d'una solució de zymoliasa 60000 (1,5 mg en 1300 µl de tampó 1). Incubar la suspensió final a 37 °C durant una hora.
- 7) Centrifugar 5 minuts a 7000 rpm. Rebutgem el sobrenedant.
- 8) Resuspendre les cèl·lules en 500 µl de tampó 2 (50 mM Tris pH 7,4; 20 mM EDTA) amb pipeta.
- 9) Afegir 50 µl de dodecilsulfat sòdic (SDS) de 10 % i agitar els tubs amb els dits.
- 10) Afegir 200 µl d'acetat de potassi 5 M i incubar dins del gel durant 30 minuts com a mínim. Agitar vigorosament els tubs.
- 11) Centrifugar durant 20 minuts a 12000 rpm a 4 °C .
- 12) Transferir el sobrenedant a un altre tup Eppendorf i afegir 700 µl d'isopropanol i incubar a temperatura ambient durant 10 minuts.
- 13) Centrifugar 15 minuts a 10000 rpm.
- 14) Eliminar el sobrenedant i afegir 500 µl d'etanol 70 %.
- 15) Centrifugar 5 minuts a 10.000 rpm.
- 16) Eliminar el màxim possible d'etanol amb una micropipeta. Eixugar el pellet al buit (speedback) fins que es vegi transparent.
- 17) Resuspendre el pellet en 30 µl de TE (10 mM Tris pH 7,4; 1mM EDTA).
- 18) Afegir 2 µl ARNsa A (10 mg/l, Boeringher Mannheim) i incubar durant 30 minuts a 37 °C.

##### Quantificació d'ADN

Per valorar la quantitat i qualitat de l'ADN extret es fa una electroforesi d'una mostra en gel d'agarosa 0,8 % i es compara amb el marcador fag  $\lambda$  digerit amb *Hind*III (0,25 µg/µl, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA).

##### Digestions

Les digestions es realitzen habitualment amb *Hinf*I (Boeringher Mannheim) amb 10 µl d'ADN extret sobre un volum total de 20 µl. Cal indicar que els perfils de digestió amb *Alu*I i *Rsa*I (Boeringher Mannheim) es poden distingir l'espècies del grup I (*Saccharomyces sensu stricto*) (Guillamón i col., 1994).

##### Electroforesi

L'electroforesi de les digestions es porten a terme en gels d'agarosa de 0,8 % i s'aplica una corrent de 25 a 30 volts durant un mínim de 8 hores. El marcador consisteix en una barrejar al 50 % del marcador marker II i del marcador marker III, ambdós de la firma Roche Diagnostics Corporation.

## 3 ANALÍTIQUES BÀSIQUES EN MOSTOS I VINS

### 3.1 Grau probable

Indica el grau alcohòlic potencial d'un most si es transforma tot el sucre fermentable. El grau probable d'un most es mesura amb un refractòmetre, i s'expressa en forma de grau alcohòlic (% vol).

### 3.2 Acidesa total

L'acidesa es la suma dels àcids quan es porta a un pH=7 afegint una solució alcalina. La valoració es fa mitjançant valoració amb blau de bromotimol (solució de 4 g/l) com indicador de final reacció.

#### Procediment:

- 1) Diluir convenientment les mostres de mostos i vins rosats per disminuir la coloració.
- 2) Desgasificar els vins.
- 3) Afegir a 10 ml de mostra unes gotes d'indicador.
- 4) Afegir gota a gota una solució d'hidròxid de sodi 0,1 M mitjançant bureta mentre s'agita el got que conté la mostra, fins a viratge de color.

#### Càlcul:

El nombre de ml gastats de solució hidròxid de sodi 0.1 M per obtenir un viratge a verd blavós, es multiplica per 0,075 per obtenir l'acidesa expressada en g d'àcid tartàric per ml.

### 3.3 pH

El pH es mesura amb pHmetre micropH 2002 (Crison).

#### Procediment:

- 1) Calibrar el pHmetre amb solucions estandarditzades de pH 7 i 4.
- 2) Submergir l'elèctrode i el sensor de temperatura en el got que conté la mostra.
- 3) Efectuar la lectura de pH una vegada estabilitzada la mesura.

### 3.4 Determinació de sucres reductors

S'estimen les quantitats d'hexoses (glucosa i fructosa principalment) en el most i sucres residuals en mostres d'estadis finals de la fermentació alcohòlica per determina l'acabament de fermentació. El mètode es basa en la capacitat reductora d'una solució cúpric-alcalina per part de les hexoses deguts a que presenten grups carbonils en les seves molècules. S'utilitza el mètode modificat de Rebelein (García Barceló, 1990). Els reactius i bureta provenen de GAB (Moja-Olèrdola, Barcelona).

#### Procediment:

- 1) Mesurar exactament 10 ml de solució coure de manera exacta amb un pipeta de doble enràs. Vessar en un matrau de 250 ml.
- 2) Afegir 5 ml de solució alcalina.
- 3) Afegir 2 ml de mostra. Diluir 100 vegades per mostos i no diluir per mostres de final de fermentació.
- 4) Afegir pedra tosca per homogeneïtzar la ebullició.
- 5) Escalfar tapant el matrau amb un vidre de rellotge. Comptar 1 minut i mig exactament. Passat aquest temps treure el matrau i refredar-ho amb aigua corrent.
- 6) Afegir 10 ml de solució de iodur, 10 ml de solució de midó i 10 ml d'àcid sulfúric. La mescla agafa un color negre.
- 7) Valorar amb bureta de 30 ml que conté tiosulfat de sodi. Afegir aquesta solució fins a viratge de color de la mescla (de negre a blanc lletós).

#### Càlcul:

El volum de tiosulfat de sodi no gastat correspon als g de sucre reductor per l a la mostra.

### 3.5 Determinació de glucosa i fructosa

L'anàlisi es basa en reaccions enzimàtiques i es porta a terme mitjançant un robot analitzador V.P.I (Tecnología Difusión Ibérica, S.L, Gavà, Barcelona). Primer es valora la quantitat de glucosa més fructosa. Després es quantifica la glucosa de la mostra. La diferència entre la glucosa més fructosa i la glucosa es donen el valor de fructosa a la mostra.

En presència d'adenosina-5'-trifosfat i de l'enzim hexoquinasa, la glucosa i fructosa es fosforilen (glucosa-6-fosfat i fructosa-6-fosfat). Per mediació de la fosfoglucoisomerasa, la fructosa-6-fosfat es transforma glucosa-6-fosfat. Finalment, la glucosa-6-fosfat es oxidada per nicotinamida-adenin-dinucleotido-fosfat (NADP<sup>+</sup>) mitjançant la glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa. La quantitat de NADPH format durant la reacció es proporcional a la quantitat de glucosa i fructosa. Es determina la quantitat de NADPH per l'absorció a 340 nm.

25 ml del reactiu per determinació de glucosa més fructosa conté:

- 4 ml de R1 (tampó trietanolamina, pH, 7,6; aprox. 2,3 mg/ml de NADPH; aprox. 5,7 mg/ml; sulfat de magnesi; estabilitzadors). Kit D-glucosa/D-fructosa Boeringher Mannheim.
- 0,1 ml de R2 (200 unitats de hexoquinasa i 100 unitats de glucosa-6-fosfat-isomerasa). Kit D-glucosa/D-fructosa Boeringher Mannheim.
- 0,1 ml de R3 (490 unitats de fosfoglucoisomerasa). Kit D-glucosa/D-fructosa Boeringher Mannheim.
- 2,5 ml de solució 40 g/l de PVP (polivinilpirrolidona PM 40000, Prolabo).
- 18,5 ml d'aigua destil·lada.

25 ml del reactiu per determinació de glucosa conté:

- 4 ml de R1 (tampó trietanolamina, pH, 7,6; aprox. 2,3 mg/ml de NADPH; aprox. 5,7 mg/ml; sulfat de magnesi; estabilitzadors). Kit D-glucosa/D-fructosa Boeringher Mannheim.
- 0,1 ml de R2 (200 unitats de hexoquinasa i 100 unitats de glucosa-6-fosfat-isomerasa). Kit D-glucosa/D-fructosa Boeringher Mannheim.
- 2,5 ml de solució 40 g/l de PVP (polivinilpirrolidona PM 40000, Prolabo).
- 18,6 ml d'aigua destil·lada.

Patró de glucosa per determinació de glucosa més fructosa de 0, 1, 2, 3 i 4 g/l.

Patró de glucosa per determinació de glucosa de 0, 0,5 1, 1,5 i 2 g/l.

#### Procediment:

- 1) Introduir al robot analitzador el punts de la patró i les referències de la mostra.
- 2) Omplir el got corresponent amb el reactiu per determinació de glucosa més fructosa.
- 3) Carregar el tambor amb els punts de la patró per la determinació de glucosa més fructosa i les mostres adientment diluïdes.
- 4) Iniciar l'anàlisi activant el corresponent programa del robot.
- 5) Repetir el procés canviant el reactiu pel reactiu determinació de glucosa, així com la patró.

#### Càlcul:

L'aparell dona els valors directament. A la primera determinació presenta les quantitats de glucosa més fructosa a les mostres. A la segona determinació es donen els valors de glucosa que al restar-la a la quantitat de glucosa més fructosa es donen els valors de fructosa.

### 3.6 Determinació de SO<sub>2</sub> total

Es segueix en el mètode de Ripper, que es basa en la titulació del iode. El mètode és una mica imprecís, i s'estima un error pel SO<sub>2</sub> total de  $\pm 7$  mg/l (Zoecklein i col., 2001).

S'utilitza l'aparell Toning de la firma GAB (Moja-Olèrdola-Olèrdola, Barcelona) que detecta el viraje en mostres de mostos i vins rosats i negres.

Procediment:

- 1) Ficar la mosca magnètica dins del tub de vidre i omplir amb 25 ml de mostra transparent.
- 2) Afegir 10 ml d'àlcali (kit sulfurós GAB), agitar i deixar en repòs tapat amb tap goma durant 15 minuts.
- 3) Passat aquest temps afegir 5 ml d'àcid sulfúric 33 % (kit sulfurós GAB i de 1 a 2 ml d'indicador (solució midó 1%, kit sulfurós GAB).
- 4) Ficar el tub a l'aparell. Omplir la bureta amb líquid de valoració (iodat potàssic, N/128, kit sulfurós GAB).
- 5) Engegar l'aparell i començar a afegir líquid de valoració una vegada sentit la senyal acústica d'inici.
- 6) Acabar de valorar quan l'aparell ho indiqui per senyal acústica.

Càlcul:

mg SO<sub>2</sub> total/l = 10 x volum gastat en valoració.

### 3.7 Grau alcohòlic per espectrofotometria del infrarroig proper

Es basa en el mètode posat a punt per Dumolin i col., 1987. S'utilitza l'analitzador InfraAlyzer 400 (Technicon, Dublin, Irlanda).

Procediment:

- 1) Calibrar l'aparell amb vins estàndards.
- 2) Filtrar les mostres amb filtres de 0,45 µm (Millepore).
- 3) Eliminar bombolles d'aire de la cèl·lula passant mostra.
- 4) Activar l'anàlisi.
- 5) Llegir el valor en percentatge d'alcohol.

### 3.8 Grau alcohòlic per ebullimetria

Es basa en la disminució del punt d'ebullició que experimenten les solucions hidroalcohòliques a mesura que augmenta el percentatge d'alcohol (lleis de Raoult). S'utilitza l'ebullímetre de la firma GAB (Moja-Olèrdola, Barcelona).

Procediment:

- 1) Engegar la toma d'aigua corrent pel refrigerador.
- 2) Omplir amb aigua destil·lada el recipient de l'aparell i engegar l'escalfador.
- 3) Prendre nota de la temperatura d'ebullició.
- 4) Passar un volum de mostra de vi pel recipient i omplir el recipient amb mostra fins la ratlla indicativa (uns 50 ml).
- 5) Repetir el procés realitzat amb l'aigua destil·lada. Anotar la temperatura, quan aquesta s'estabilitza.
- 6) Ajustar regleta amb la temperatura d'ebullició de l'aigua, i interpolar grau alcohòlic amb temperatura d'ebullició del vi.



## 4 ANALÍTQUES DE COMPOSTOS NITROGENATS

### 4.1 Determinació d'amoni

Per a la determinació d'amoni en mostos i vins s'utilitza un mètode enzimàtic. En presència de l'enzim glutamat-deshidrogenasa i de nicotamina-adenina dinucleòtid reduït (NADH), l'amoni reacciona amb 2-cetoglutarat a L-glutamat, i NADH s'oxida. La quantitat de NADH oxidat ( $\text{NAD}^+$ ) és proporcional a la quantitat d'amoni. NADH es determina per l'absorbància de llum de 365 nm mitjançant un espectrofotòmetre. Per realitzar els anàlisis s'utilitza kit enzimàtic per determinació d'amoni de la firma Boehringer Mannheim.

#### Procediment:

##### **Tractament de la mostra**

- 1) Afegir de 50 a 70 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 1 ml de mostra continguda en un tub Eppendorf.
- 2) Agitar durant 1 minut amb un vortex.
- 3) Centrifugar a 12000 rpm durant 15 minuts. Això permet decolorar la mostra.
- 4) Diluir 10 vegades els mostos i utilitzar directament els vins.

##### **Procediment del kit**

- 1) Pipetejar dins de cubetes (poliestiré cristal·lí, Soria Grenier, S.A., Valdemoro, Madrid) 0,5 ml de mescla de reacció (conté per ml: tampó trietanolamina a pH aprox. de 8,0; 3,7 mg 2-cetoglutarat; 0,27 mg de NADH; estabilitzadors) tant per blanc com per les diferents mostres.
- 2) Afegir a les cubetes 0,050 ml de mostra corresponent.
- 3) Completar fins un volum de 1,5 ml amb aigua bidistil·lada (MilliQ, Millipore).
- 4) Barrejar per inversió de la cubeta tapant l'obertura amb Parafilm<sup>®</sup> (American Can Company, Greenwich, Ct.,USA). Després de 5 minuts aproximadament a temperatura ambient fer una lectura d'absorbància al espectrofotòmetre (lectura  $A_1$ ).
- 5) Iniciar reacció afegint 0,010 ml solució enzimàtica (glutamat-deshidrogenasa amb 833 U/ml).
- 6) Barrejar per inversió de la cubeta tapant l'obertura amb Parafilm<sup>®</sup> (American Can Company, Greenwich, Ct.,USA). Després de l'acabament de la reacció (aproximadament 20 minuts) llegir les absorbàncies de les solucions (lectura  $A_2$ ).

#### Càlcul:

Es calculen les diferències de lectura ( $A_1 - A_2$ ) tant de la mostra com del blanc. Es resta la diferència del blanc a la diferència de la mostra, i a partir d'aquesta diferència ( $\Delta A$ ) i tenint en compte el coeficient d'extinció del NADH a 365 nm, els volums, el camí òptic, el pes molecular de l'amoni i el factor de dilució de la mostra (F), es calcula la concentració d'amoni a la mostra a partir d'aquesta fórmula:

$$C \text{ (g/l)} = 0,151 \cdot \Delta A \cdot F$$

## 4.2 Determinació d'aminoàcids totals

Una molècula de ninhidrina reacciona amb el grup amino del  $\alpha$ -aminoàcids, l'oxida i allibera amoni, el qual es condensa amb la ninhidrina reduïda (hidridantina) i amb una molècula de ninhidrina per produir un producte violaci (porpra de Ruhemman). Aquest producte té un màxim d'absorció a 570 nm. Com la ninhidrina també és reactiva amb l'amoni, es realitza, a part de la recta patró de glicina, una recta patró de concentracions conegudes d'amoni, de manera que es pugui extrapolar l'absorbància a 570 nm deguda a l'amoni present a la mostra.

### Procediment:

#### **Tractament de la mostra**

Diluir la mostra adientment amb aigua MilliQ (Millipore); habitualment 1:4 per mostos i 1:2 per vins.

#### **Assaig**

- 1) Preparar solució de reacció: mesclar en una proporció 1:1 solució de clorur d'estany [0,08 g de clorur d'estany en 25 ml de tampó citrat (14,7 g/l d'àcid cítric; 38,2 g/l citrat de sodi; pH 5,0.)] i solució de ninhidrina (1 g de ninhidrina en 25 ml glicol etilen monometil èter). Tots els reactius de la firma Panreac.
- 2) Preparar rectes patrons: patró de glicina (mg/l): 0; 75; 150; 300; 450; 600; i patró d'amoni (mg/l): 0; 7,7; 15,4; 23,1.
- 3) A 200  $\mu$ l de mostra o patró continguts en un tub Eppendorf, afegir 800  $\mu$ l de solució de reacció.
- 4) Ficar els tubs Eppendorf, foradats amb una agulla, en bany Maria a 100 °C durant 20 minuts.
- 5) Refredar i traspasar la mescla de reacció a una cubeta.
- 6) Afegir 1 ml de propanol. Llegir a 570 nm al espectrofotòmetre.

### Càlcul:

Es calcula l'absorbància de la mostra que correspon a quantitat d'amoni que conté (determinada amb el mètode 4.1) a partir de la recta patró d'amoni. Aquesta absorbància es resta a l'absorbància obtinguda amb la reacció de ninhidrina. S'extrapola aquesta absorbància a la recta patró de glicina per obtenir quantitat d'aminoàcids total en mg de glicina per litre.

## 4.3 Determinació d'aminoàcids individuals

La determinació i quantificació d'aminoàcids en mostos i vins es realitza per cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) mitjançant l'aparell Asted™ System (Gilson Medical Electronics, Inc., Middleton, WI 53582, USA). L'aparell permet realitzar operacions precolumna (reaccions de derivatització i diàlisi) de manera automatitzada i incorpora dos detectors de fluorescència instal·lats en sèrie. El mètode cromatogràfic segueix un sistema de gradient ternari per a resolució dels aminoàcids per fase revers (Tumell i Cooper, 1982).

### Procediment:

#### **Tractament previ de la mostra**

- 1) Diluir most 1:2 amb aigua bidestil·lada (Millipore). Vins no diluir.
- 2) Filtrar mostres amb filtres 0,22  $\mu$ m (Millipore).

#### **Tractament de la mostra amb reactius**

- 1) Preparar quatre solucions de reactius que el sistema mescla de forma automàtica amb la mostra. Tots reactius de Sigma Chemicals Company. **Reactiu A** (patrons interns): 0,4 ml de solució mare [10 mM Homocisteïna (HCIS); 10 mM Homoserina (HSER); 10 mM Norvalina (NVAL); 50 mM Tioprolina (TPRO)]; 48  $\mu$ l de mercaptoetanol (converteix la cistina en cisteïna); 200 mg de tetrafenilborat sòdic (elimina interferències d'impureses); enrasar amb tampó borat (100 mM, pH 9,5) fins a 10 ml. **Reactiu B**: 3,5 g d'àcid iodoacètic en 50 ml tampó borat (100 mM, pH 9,5) (alquila la cisteïna i la converteix en s-carboxy-metil-cisteïna, més reactiva a l'OPA que la cisteïna); ajustar el pH a 9,5 amb NaOH 4M. **Reactiu C (o-ftaldèhid/  $\beta$ -mercaptoetanol, OPA/MCE)**: 125 mg OPA (reacciona amb les amines primàries (aminoàcids) per donar un fluoròfor detectable); 2,5 ml metanol; enrasar a 25 ml amb tampó borat (100 mM, pH 9,5); afegir 250  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol (actua com a activador). **Reactiu D (9-fluorenil-metil cloroformat, FMOC)**: 130 mg FMOC (reacciona amb les amines secundàries (iminoàcids, prolina, hidroxiprolina i tioprolina); 10 ml acetona.
- 2) Situar correctament les ampolletes de reactius a la safata de l'aparell.

**Condicions d'injecció i diàlisi**

Volum d'injecció: 100 µl

Tipus de dialitzador: PCTFE(Kel F), 100 µl.

Tipus de membrana de diàlisi: 15 kD de tall molecular.

Solvent de diàlisi: aigua amb 0,05 % d'azida sòdica.

**Columna**

150 x 4,6 mm; diàmetre intern, 5 µm; Spherisorb ODS2.

**Solvents i gradients**

Tots els solvents es desgasifiquen en bany d'ultrasons abans l'ús.

1) Preparar un litre dels següents solvents. Tots reactius de Sigma Chemicals Company. **Solvent A:** 150 ml de fosfat de sodi (250 mM); 200 ml d'àcid propiònic (250 mM); ajustar el pH a 6,6 amb NaOH 4 M; afegir, 70 ml d'acetonitril, 30 ml dimetil sulfòxid i 550 ml d'aigua bidestil·lada (Milli-Q, Millepore). **Solvent B:** 400 ml d'acetonitril; 330 ml metanol; 70 ml dimetil sulfòxid; 20 ml d'aigua bidestil·lada (Milli-Q, Millepore). **Solvent C:** 250 ml de fosfat de sodi (250 mM); 200 ml d'àcid propiònic (250 mM); ajustar el pH a 5,5 amb àcid propiònic concentrat; afegir, 70 ml d'acetonitril, 30 ml de dimetil sulfòxid, 450 ml d'aigua bidestil·lada (Milli-Q, Millepore).

2) Desgasificar els solvents en bany d'ultrasons abans l'ús.

**Taula A1.** Gradient del mètode a temperatura ambient (21 – 25 °C)

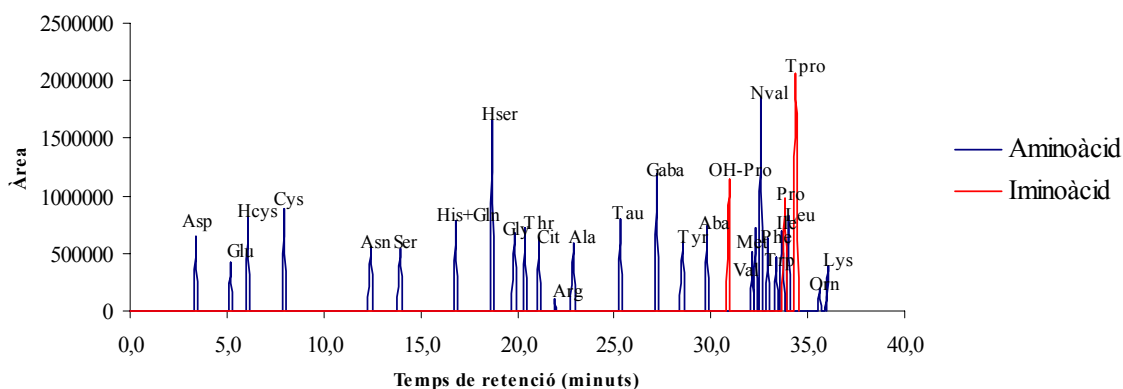
TEMPS, minuts	%A	%B	%C
0,00	100,00	0,00	0,00
5,00	95,00	5,00	0,00
8,00	0,00	5,00	95,00
10,00	0,00	5,00	95,00
10,20	95,00	5,00	0,00
24,00	80,00	20,00	0,00
32,00	55,00	45,00	0,00
35,00	100,00	0,00	0,00
38,00	100,00	0,00	0,00
40,00	100,00	0,00	0,00
40,00	Fi del procés		

**Fluxe de solvents**

2,5 ml/minut.

**Excitació i detecció dels OPA/MCE-derivats i FMOC-derivats****Taula A2.**

	λ excitació (nm)	λ emissió (nm)
<b>OPA/MCE DERIVATS</b>	230	440
<b>FMOC DERIVATS</b>	265	315

**Temps de retenció**

**Figura A2.** Aminograma d'un patró de 50 mg/l dels aminoàcids i iminoàcids analitzats. Patrons interns : homocisteïna (Hcys), homoserina (Hser), norvalina (Nval) i tioprolina (Tpro). Asp: aspàrtic. Glu: glutàmic. Cys: cisteïna. Asn: asparagina. Ser: serina. His+Gln: histidina+glutamina. Gly: glicina. Thr: treonina. Cit: citrulina. Arg: arginina. Ala: alanina. Tau: taurina. Gaba: àcid γ-aminobutíric. Tyr: tirosina. Aba: àcid α-aminobutíric. OH-Pro: hidroxiprolina. Val: valina. Met: metionina. Trp: triptofan. Phe: fenilalanina. Ile: isoleucina. Pro: prolina. Leu: leucina. Orn: ornitina. Lys: lisina.

Càlcul:

Cada 5 mostres es passa un solució patró de 10 o 50 mg/l per cada aminoàcid. La identificació dels pics es realitza comparant l'aminograma de la solució patró. Per quantificar el pic d'un aminoàcid de la mostra s'utilitza la següent fórmula:

$$[AA] = \frac{\text{Àrea pic AA mostra}}{\text{Àrea pic PI mostra}} \cdot \frac{\text{Àrea pic PI patró}}{\text{Àrea pic AA patró}} \cdot [AA \text{ patró}]$$

AA: aminoàcid identificat.

[AA]: concentració aminoàcid identificat.

PI: patró intern.

[AA patró]: 10 o 50 mg/l.

#### 4.4 Determinació de proteïna

Per quantificar proteïna s'utilitza el mètode de microassaig de Bio-Rad, vàlid per concentracions de proteïna compreses entre 1,25 i 25 µg/ml. L'assaig es basa en el mètode de Bradford, 1976, el qual es mesura la formació d'un complex proteïna-colorant (Blue de Coomassie G) mesurat espectrofotomèticament a 595 nm.

Procediment:**Tractament mostra**

Diluir els mostos i vins blancs 1:10 i fins una dilució 1:100 per mostos i vins rosats.

**Patró**

Preparació d'un patró de concentració (0; 2,5; 5; 12,5; 25 µg/ml) a partir d'una solució d'albumina sèrica bovina (Sigma) de 1 mg/ml.

**Assaig**

- 1) A 0,8 ml de mostra o convenientment diluïda o de solució de la patró afegir 0,2 ml de reactiu Bio-Rad.
- 2) Agitar amb vòrtex i després de 15 minuts realitzar lectura al espectrofotòmetre a 595 nm.

Càlcul:

Fer la recta patró i calcular la concentració de les mostres a partir de la recta.

#### 4.5 Nitrogen fàcilment assimilable (nitrogen disponible) per als llevats (Valoració amb formaldehid)

Permet conèixer la quantitat de nitrogen disponible per als llevats. Es basa en el mètode de Sørensen o valoració amb formaldehid. El formaldehid bloqueja el grup amino dels aminoàcids i així mateix l'amoni. El derivat metilènic format conté un grup carboxil dels aminoàcids (l'àcid corresponent a l'amoni) i no grup bàsic. Aquest fet fa que la funció àcida dissociada pugui ser valorada amb una solució d'hidròxid de sodi. La prolina no es valora, aminoàcid present en grans quantitat en el most, però no metabolitzable en condicions de vinificació.

Procediment:

- 1) Afegir a 50 ml de most o vi 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Permet d'eliminar l'interferència del SO<sub>2</sub>.
- 2) Mesurar el pH amb pHmetre micropH 2002 (Crison), i portar a pH 8-8,1 afegint amb una bureta NaOH 0,25 M.
- 3) Una vegada arribat el pH a 8-8,1 afegir 20 ml de formaldehid de pH 8.
- 4) Esperar a que s'estabilitzi el pH, i valorar amb NaOH per portar la solució a pH 8-8,1.

Càlcul:

El volum (ml) de NaOH 0,25 M gastats per valorar X 5 = Índex de formol. Índex de formol X 14 = mg N/l.

#### 4.6 Estimació del nitrogen fàcilment assimilable (nitrogen disponible) per als llevats (ND)

Estimació de la quantitat de nitrogen disponible pels llevats de la mostra.

Procediment:

- 1) Es converteix les quantitats d'aminoàcids i amoni en nitrogen, multiplicant la quantitat de cada de l'espècies moleculars pel tant per u del nitrogen que contenen.

**Taula A3.**

Asp	Glu	Cys	Asn	Ser	His	Gln	Gly	Thr	Cit	Arg
0,15	0,095	0,116	0,212	0,133	0,271	0,192	0,186	0,118	0,24	0,322
Ala	Tau	Aba	Tyr	Gaba	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu
0,157	0,112	0,136	0,077	0,136	0,12	0,094	0,137	0,085	0,107	0,107
			Orn	Lys	NH <sub>4</sub>					
			0,212	0,192	0,778					

- 2) Es suma el nitrogen que representa els aminoàcids a excepció de la prolina i la hidroxiprolina, i el nitrogen en forma d'amoni.

## 5. ANALÍTIQUES DE COMPOSTOS SECUNDARIS

### 5.1 Determinació d'alcohols superiors

La tècnica descrita a continuació permet quantificar alcohols superiors i amb menys precisió metanol, acetat d'etil, acetaldehid i àcid acètic. S'utilitza cromatografia gasosa per determinar aquest components en el vi. El cromatògraf de gas, Hewlett-Packard 58900 II acoblat a un espectròmetre de masses HP 5972, està previst de mostrador.

#### Procediment

##### Tractament de la mostra

- 1) Filtrar el vi amb filtres 0,45 µm (Millepore).
- 2) Afegir 50 µl de solució patró intern ( 100 mg/l de 4-metil-2-pentanol) a 5 ml de vi filtrat.

##### Solució patró

- 1) Preparar una solució hidroalcohòlica de 12 % d'etanol, amb 2000 mg/l de cada alcohol superior.
- 2) Ajustar el pH a 3,5 amb àcid tartàric.

##### Injecció

Tipus "split" de 0,1 µl.

##### Columna

Capil·lar CP wax 57cb (50 m x 0,25 mm, diàmetre intern, 0,2 µm).

##### Condicions de temperatura

5 minuts a temperatura inicial

3 °C/minut fins a 200 °C.

200 °C durant 20 minuts.

##### Temperatura injector

220 °C.

##### Temperatura detector

280 °C.

##### Gas conductor

Heli.

##### Temps de retenció

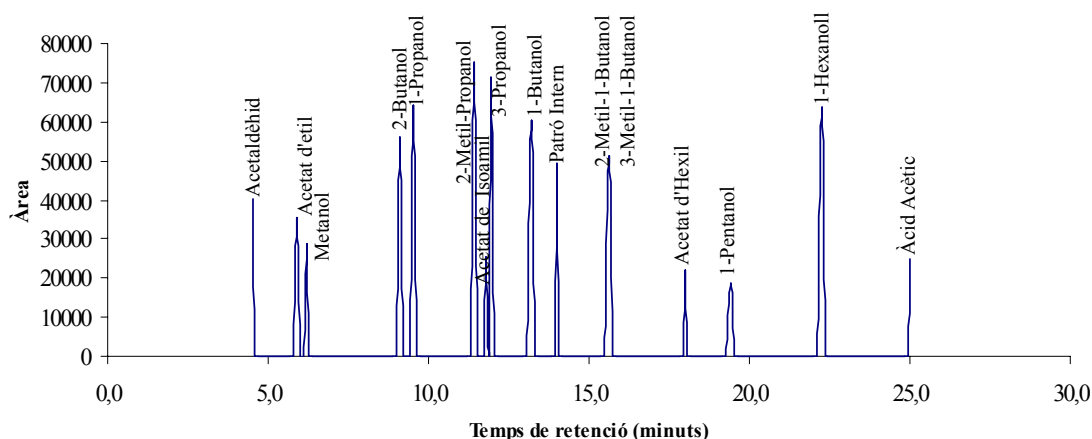


Figura A3. Cromatograma d'un patró.

#### Càlcul:

Per quantificar el pic d'un compost de la mostra s'utilitza la següent fórmula:

$$[ C ] = \frac{\text{Àrea pic C mostra}}{\text{Àrea pic PI mostra}} \cdot \frac{\text{Àrea pic PI patró}}{\text{Àrea pic C patró}} \cdot [ C \text{ patró}]$$

C: compost identificat. [C]: concentració en mg/l del compost identificat. PI: patró intern. [C patró]: 2000 mg/l.

## 5.2 Àcids grassos, esters etílics d'àcids grassos i acetats d'alcohols superiors

L'anàlisi d'aquests compostos es porta a terme mitjançant cromatografia gasosa. El cromatògraf, Hwlett-Packard 4890A, està connectat a un integrador 3393A també de Hwlett-Packard, equipat d'un detector de flama ionitzada (Agilent).

### Procediment:

#### Tractament de la mostra i solució patró

Es requereix una extracció d'aquests compostos abans d'injectar al cromatògraf. Es tracta d'igual manera la mostra que la solució patró (solució hidroalcohòlica de pH 3,5 amb 12 d'etanol, 4 g/l d'àcid tartàric i quantitats determinades dels compostos a analitzar).

- 1) Afegir 100 µl de solució de patró intern (0,92 mg/l de 1-nonanol; 3,22 mg/l d'àcid heptanoic; 2,90 mg/l d'àcid heptadecanoic) a 50 ml de vi o de solució patró.
- 2) A més, afegir 500 µl d'àcid fosfòric 33 % i 4 ml d'hexà/èter etílic (1:1) (SDS, Peypin, França).
- 3) Agitar amb una mosca magnètica durant 5 minuts a temperatura ambient.
- 4) Separar la fase orgànica de la fase aquosa. Guardar la fase orgànica.
- 5) Afegir a la fase aquosa 2 ml d'hexà/èter etílic (1:1) (SDS, Peypin, França). Agitar 5 minuts.
- 6) Tornar a separar la fase orgànica i afegir-la a l'altra.
- 7) Repetir el procés una tercer vegada. Afegir la fase orgànica amb les altres.
- 8) Si la fase orgànica està emulsionada, centrifugar a baixes velocitats durant 5 minuts.

#### Condicions d'injecció

Volum d'injecció: 2 µl de la fase orgànica.

#### Columna

FFAP-HP (30 m x 0,25 mm, diàmetre intern 0,25 µm) (Agilent).

#### Condicions de temperatura

Passar de 50 °C a 240 °C a 4 °C per minut.

Mantindre a 240 °C durant 15 minuts.

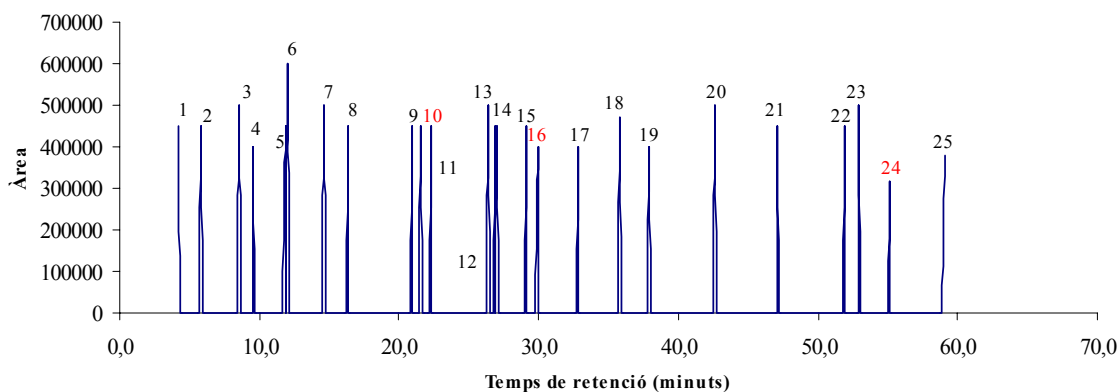
#### Temperatura del injector i detector

240 °C.

#### Gas conductor

Heli a 1ml/minut.

#### Temps de retenció:



**Figura A4.** Cromatograma d'un patró. 1: butirat d'etil; 2: acetat d'isoamil; 3: hexanoat d'etil; 4: acetat d'hexil; 5: lactat d'etil; 6: 1-hexanol; 7: octanoat d'etil; 8: 2-etil-1-hexanol; 9: decanoat d'etil; 10: 1-nonanol; 11: succinat d'etil; 12: acetat de 2-feniletíl; 13: dodecanoat d'etil; 14: àcid hexanoic; 15: 2-fenil etanol; 16: heptanoic; 17: àcid octanoic; 18: 4-etil fenol; 19: àcid decanoic; 20: àcid dodecanoic; 21: àcid tetradecanoic; 22: àcid hexadecanoic; 23: àcid hexadecenoic; 24: àcid heptadecanoic; 25: àcid octadecanoic (àcid esteàric).

Càlcul:

Per quantificar el pic d'un compost de la mostra s'utilitza la següent fórmula:

$$[C] = \frac{\text{Àrea pic C mostra}}{\text{Àrea pic PI mostra}} \cdot \frac{\text{Àrea pic PI patró}}{\text{Àrea pic C patró}} \cdot [C \text{ patró}]$$

C: compost identificat. [C]: concentració en mg/l del compost identificat. PI: patró intern. [C patró]: concentració de patró.

Utilitzar l'àrea del 1-nonanol (10) per calcular concentracions d'èsters d'àcids grassos, 2-fenil etanol, acetat d'alcohols superiors, lactat d'etil. Heptanoic (16) per àcids grassos de 4 carbonis a 14. Heptadecanoic (24) àcids grassos de més de 14 carbonis.

### 5.3 Determinació de glicerol

Per a la determinació de glicerol en vins s'utilitza un mètode enzimàtic. En presència de l'enzim gliceroquinasa i d'adenosina-5'-trifosfat (ATP), el glicerol es fosforila. La adenosina-5'-difosfat (ADP) formada i fosfoenolpiruvat (PEP) reaccionen mitjançant l'enzim piruvat quinasa per donar piruvat i ATP. El piruvat es seguidament reduït a lactat per oxidació de nicotinamida-adenina dinucleòtid (NADH) per mediació de l'enzim L-lactat deshidrogenasa. La quantitat de NADH oxidat ( $\text{NAD}^+$ ) és proporcional a la quantitat de glicerol. La disminució de NADH es determina per l'absorbància de llum de 365 nm mitjançant un espectrofotòmetre. Per realitzar les anàlisis s'utilitza kit enzimàtic per determinació de glicerol de la firma Boehringer Mannheim.

#### Procediment:

##### **Tractament de la mostra**

Diluir 10 vegades els vins.

##### **Procediment del kit**

- 1) Pipetejar dins de cubetes (poliestiré cristal·lí, Soria Grenier, S.A., Valdemoro, Madrid) 0,5 ml de la mescla de reacció (conté per ml: tampó glicilglicina a pH aprox. de 7,4; 0,7 mg NADH; 11 mg d'ATP; 1 mg PEP-CHA; sulfat de magnesi; estabilitzadors) tant per blanc com per les diferents mostres.
- 2) Afegir a les cubetes 0,050 ml de mostra corresponent.
- 3) Afegir 1,0 ml d'aigua bidistil·lada (MilliQ, Millipore) a la cubeta del blanc i 0,950 ml a les cubetes de mostres.
- 4) Afegir 0,005 ml de la solució enzimàtica 1 (piruvat quinasa amb 600 U/ml i L-lactat-deshidrogenasa amb 550 U/ml).
- 5) Barrejar per inversió de la cubeta tapant l'obertura amb Parafilm<sup>®</sup> (American Can Company, Greenwich, Ct.,USA). Després de 5 minuts aproximadament a temperatura ambient fer una lectura d'absorbància al espectrofotòmetre (lectura  $A_1$ ).
- 7) Iniciar reacció afegint 0,005 ml solució enzimàtica 2 (gliceroquinasa amb 85 U/ml).
- 8) Barrejar per inversió de la cubeta tapant l'obertura amb Parafilm<sup>®</sup> (American Can Company, Greenwich, Ct.,USA). Després de l'acabament de la reacció (aproximadament 15 minuts) llegir les absorbàncies de les solucions (lectura  $A_2$ ).

#### Càlcul:

Es calculen les diferències de lectura ( $A_1 - A_2$ ) tant de la mostra com del blanc. Es resta la diferència del blanc a la diferència de la mostra, i a partir d'aquesta diferència ( $\Delta A$ ) i tenint en compte el coeficient d'extinció del NADH a 365 nm, els volums, el camí òptic, el pes molecular del glicerol i el factor de dilució de la mostra (F), es calcula la concentració de glicerol a la mostra a partir d'aquesta fórmula:

$$C \text{ (g/l)} = 0,818 \cdot \Delta A \cdot F$$



## 5.4 Determinació d'àcid succínic

Per a la determinació d'àcid succínic en vins s'utilitza un mètode enzimàtic. En presència de l'enzim succinil-CoA-sintetasa (succinat-tioquinasa), d'inosina-5'-trifosfat (ITP), i coenzim A (CoA), l'àcid succínic es converteix en succinil-CoA amb formació de inosina-5'-difosfat (IDP) i fosfat inorgànic. IDP reacciona amb fosfoenolpiruvat (PEP) reaccionen mitjançant l'enzim piruvat-quinasa per donar piruvat i ITP. El piruvat es seguidament reduït a lactat per oxidació de nicotinamida-adenina dinucleòtid (NADH) per mediació de l'enzim L-lactat-deshidrogenasa. La quantitat de NADH oxidat (NAD<sup>+</sup>) és proporcional a la quantitat d'àcid succínic. La disminució de NADH es determina per l'absorbància de llum de 365 nm mitjançant un espectrofotòmetre. Per realitzar les anàlisis s'utilitza kit enzimàtic per determinació d'àcid succínic de la firma Boehringer Mannheim.

### Procediment:

#### **Tractament de la mostra**

Diluir 10 vegades els vins.

#### **Procediment del kit**

- 1) Pipetejar dins de cubetes (poliestiré cristal·lí, Soria Grenier, S.A., Valdemoro, Madrid) 0,5 ml de la mescla de reacció (conté per ml: tampó glicilglicina a pH aprox. de 8,4; 0,06 mg CoA; 0,05 mg d'ITP; 0,05 mg PEP-CHA; estabilitzadors) escalfada a 37 °C tant per blanc com per a les diferents mostres.
- 2) Afegir 0,025 ml de la solució enzimàtica 1 (Piruvat-quinasa amb 500 U/ml i L-Lactat-deshidrogenasa amb 460 U/ml).
- 3) Afegir a les cubetes 0,050 ml de mostra corresponent.
- 4) Afegir 1,0 ml d'aigua bidistil·lada (MilliQ, Millipore) a la cubeta del blanc i 0,950 ml a les cubetes de mostres.
- 5) Barrejar per inversió de la cubeta tapant l'obertura amb Parafilm<sup>®</sup> (American Can Company, Greenwich, Ct.,USA). Després de 5 minuts aproximadament a 37 °C fer una lectura d'absorbància al espectrofotòmetre (lectura A<sub>1</sub>).
- 6) Iniciar reacció afegint 0,005 ml solució enzimàtica 2 (Succinil-CoA sintetasa amb 48 U/ml).
- 7) Barrejar per inversió de la cubeta tapant l'obertura amb Parafilm<sup>®</sup> (American Can Company, Greenwich, Ct.,USA). Després de l'acabament de la reacció (aproximadament 20 minuts a 37 °C) llegir les absorbàncies de les solucions (lectura A<sub>2</sub>).

#### Càlcul:

Es calculen les diferències de lectura (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) tant de la mostra com del blanc. Es resta la diferència del blanc a la diferència de la mostra, i a partir d'aquesta diferència (ΔA) i tenint en compte el coeficient d'extinció del NADH a 365 nm, els volums, el camí òptic, el pes molecular d'àcid succínic i el factor de dilució de la mostra (F), es calcula la concentració de l'àcid succínic a la mostra a partir d'aquesta fórmula:

$$C \text{ (g/l)} = 1,066 \cdot \Delta A \cdot F$$

## 5.5 Acetaldèhid

Per a la determinació d'acetaldèhid en vins s'utilitza un mètode enzimàtic. L'acetaldèhid s'oxida de manera quantitativa en presència d'aldèhid deshidrogenasa per la nicotinamida-adenina dinucleòtid (NAD<sup>+</sup>). NADH format es determina per l'absorbància de llum de 365 nm mitjançant un espectrofotòmetre. Per realitzar les anàlisis s'utilitza kit enzimàtic per determinació d'acetaldèhid de la firma Boehringer Mannheim.

### Procediment:

#### **Tractament de la mostra**

Diluir 10 vegades els vins.

#### **Procediment del kit**

- 1) Pipetejar dins de cubetes (poliestiré cristal·lí, Soria Grenier, S.A., Valdemoro, Madrid) 1,5 ml de la mescla de reacció (conté per ml també difosfat de potassi a pH aprox. de 9,5; 0,3 mg de NAD<sup>+</sup>; estabilitzadors) tant per blanc com per les diferents mostres.
- 2) Afegir a les cubetes 0,100 ml de mostra corresponent.
- 3) Afegir 0,100 ml d'aigua bidistil·lada (MilliQ, Millipore) a la cubeta del blanc.
- 4) Barrejar per inversió de la cubeta tapant l'obertura amb Parafilm<sup>®</sup> (American Can Company, Greenwich, Ct.,USA). Després de 3 minuts aproximadament fer una lectura d'absorbància al espectrofotòmetre (lectura A<sub>1</sub>).
- 5) Iniciar reacció afegint 0,025 ml solució enzimàtica (Aldèhid-deshidrogenasa amb 6,7 U/ml).
- 6) Barrejar per inversió de la cubeta tapant l'obertura amb Parafilm<sup>®</sup> (American Can Company, Greenwich, Ct.,USA). Després de l'acabament de la reacció (aproximadament 3 a 5 minuts a temperatura ambient) llegir les absorbàncies de les solucions (lectura A<sub>2</sub>).

### Càlcul:

Es calculen les diferències de lectura (A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) tant de la mostra com del blanc. Es resta la diferència del blanc a la diferència de la mostra, i a partir d'aquesta diferència ( $\Delta A$ ) i tenint en compte el coeficient d'extinció del NADH a 365 nm, els volums, el camí òptic, el pes molecular de l'acetaldèhid i el factor de dilució de la mostra (F), es calcula la concentració d'acetaldèhid a la mostra a partir d'aquesta fórmula:

$$C \text{ (g/l)} = 0,211 \cdot \Delta A \cdot F$$

## 5.6 Àcid acètic

L'àcid acètic es transforma en presència de l'enzim acetil-CoA-sintetasa, adenosina-5'-trifosfat (ATP), coenzim A (CoA) a acetil-CoA. L'acetil-CoA reacciona amb oxaloacetat per donar citrat mitjançant l'enzim citrat sintasa. L'oxaloacetat necessari per que es doni la reacció anterior prové de l'oxidació de L-malat en presència de nicotinamida-adenina dinucleòtid ( $\text{NAD}^+$ ) i l'enzim L-malat deshidrogenasa. La quantitat de NADH ( $\text{NAD}^+$  reduït) és proporcional (no lineal) a la quantitat d'àcid acètic. NADH es determina per l'absorbància de llum de 365 nm mitjançant un espectrofotòmetre. Per realitzar les anàlisis s'utilitza kit enzimàtic per determinació d'àcid acètic de la firma Boehringer Mannheim.

### Procediment:

#### **Tractament de la mostra**

Diluir 10 vegades els vins.

#### **Procediment del kit**

- 1) Pipetejar dins de cubetes (poliestirè cristal·lí, Soria Grenier, S.A., Valdemoro, Madrid) 0,5 ml de la mescla de reacció 1 (conté per ml tampó trietanolamina a pH aprox. de 8,4; 4,2 mg d'àcid L-màlic; 2,1 mg clorur de magnesi; estabilitzadors) tant per blanc com per les diferents mostres.
- 2) Afegir a les cubetes 0,100 ml de mescla de reacció 2 (conté per ml 25 mg d'ATP; 2,6 mg CoA; 12,3 mg NAD; estabilitzador).
- 3) Afegir a les cubetes 0,050 ml de mostra corresponent.
- 4) Afegir 1,0 ml d'aigua bidistil·lada (MilliQ, Millipore) a la cubeta del blanc i 0,950 ml a les cubetes de mostres.
- 5) Barrejar per inversió de la cubeta tapant l'obertura amb Parafilm<sup>®</sup> (American Can Company, Greenwich, Ct.,USA). Després de 3 minuts aproximadament fer una lectura d'absorbància al espectrofotòmetre (lectura  $A_0$ ).
- 6) Afegir 0,005 ml solució enzimàtica 1 (L-malat-deshidrogenasa 2750 U/ml; citrat-sintasa amb 675 U/ml).
- 7) Barrejar per inversió de la cubeta tapant l'obertura amb Parafilm<sup>®</sup> (American Can Company, Greenwich, Ct.,USA). Després de l'acabament de la reacció (aproximadament 3 minuts a temperatura ambient) llegir les absorbàncies de les solucions (lectura  $A_1$ ).
- 8) Iniciar reacció afegint 0,010 ml de solució enzimàtica 2 (Acetil-CoA-sintetasa amb 20 U/ml).
- 9) Barrejar per inversió de la cubeta tapant l'obertura amb Parafilm<sup>®</sup> (American Can Company, Greenwich, Ct.,USA). Després 10 a 15 minuts llegir les absorbàncies de les solucions (lectura  $A_2$ ).

### Càlcul:

Es calculen les diferències de lectura ( $A_1 - A_0$ ) i ( $A_2 - A_0$ ) tant de la mostra com del blanc.

Es calcula  $\Delta A$  amb la següent fórmula:

$$\Delta A_{\text{àcid acètic}} = \left[ (A_2 - A_0)_{\text{mostra}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{mostra}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{mostra}}} \right] - \left[ (A_2 - A_0)_{\text{blanc}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{blanc}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{blanc}}} \right]$$

Amb el valor de  $\Delta A$  i tenint en compte el coeficient d'extinció del NADH a 365 nm, els volums, el camí òptic, el pes molecular de l'àcid acètic i el factor de dilució de la mostra (F), es calcula la concentració de l'àcid acètic a la mostra a partir d'aquesta fórmula:

$$C \text{ (g/l)} = 0,571 \cdot \Delta A \cdot F$$

## 6. TRACTAMENT DE DADES. ESTADÍSTICA.

### 6.1 Anàlisi de la variància (ANOVA)

Es realitza l'anàlisi de la variància (ANOVA) per determinar diferències estadístiques ( $P \leq 0,05$ ) de les dades per als diferents factors (multivariant, MANOVA), i determina la incidència d'aquests i possibles interaccions entre ells. Aquest anàlisi es porta a terme mitjançant el programa informàtic Statistica for Windows 4, 2 (Statsoft, Inc., 1993).

### 6.2 Anàlisi d'agrupament jeràrquic ascendent ("clusters")

Aplicat a diferents mostos segons la composició aminoacídica, consisteix en crear una matriu de distàncies euclidianes (geomètriques) per a les concentracions dels diferents aminoàcids entre les varietats de most. La fórmula aplicada és la següent:

$$\text{Distància}(x,y) = \left\{ \sum_i (x-y)_i^2 \right\}^{1/2}$$

La regla aplicada per a realitzar els diferents grups és la següent: la distància entre dos grups es determina per la distància dels objectes més propers pels diferents grups (regla dels veïns més propers o unions simples), segons Hartigan (1975).

La distàncies entre els grups es representen en un diagrama d'arbre.

Tot el tractament es realitza mitjançant el programa informàtic Statistica for Windows 4, 2 (Statsoft, Inc., 1993).

### 6.3 Anàlisi de factors. Anàlisi de components principals

Aquest anàlisi ens permet reduir el nombre de variables, al reunir en uns poc factors variables correlacionades. L'anàlisi es porta a terme mitjançant el programa informàtic Statistica for Windows 4, 2 (Statsoft, Inc., 1993).

## ANNEX II



## ANNEX II. TAULES D'AMINOÀCIDS DELS MOSTOS DE LA CAMPANYA 1996

**Taula A4.** Aminoàcids dels mostos (mg/l)

		Chardonnay	Garnatxa blanca	Riesling	Carinyena	Pinot Noir
<i>BÀSICS</i>	<b>His</b>	n.d.	n.d.	n.d.	21	40
	<b>Arg</b>	437	354	514	244	1203
	<b>Lys</b>	0,8	1,7	1,6	4,0	3,1
PROTEICS <i>NEUTRES</i>	<b>Ala</b>	183	30	72	61	233
	<b>Val</b>	16	4,1	26	10	35
	<b>Leu</b>	12	5,9	28	8,3	37
	<b>Ile</b>	9,1	2,2	19	6,5	23
	<b>Pro</b>	176	25	18	14	26
	<b>Phe</b>	15	7,5	17	4,3	17
	<b>Trp</b>	11	5,5	19	5,3	10
	<b>Met</b>	22	1,2	5,8	2,3	13
	<b>Gly</b>	11	2,1	6,3	5,5	10
	<b>Asn</b>	n.d.	5,8	5,3	1,7	12
	<b>Gln</b>	369	114	264	67	n.d.
	<b>Ser</b>	99	16	58	28	82
	<b>Thr</b>	83	20	57	22	115
	<b>Tyr</b>	22	12	11	5,5	15
	<i>ÀCIDS</i>	<b>Asp</b>	20	13	15	6,4
<b>Glu</b>		45	40	35	15	112
NO PROTEICS	<b>Orn</b>	2,0	2,6	1,5	1,7	13
	<b>Cit</b>	7,9	5,4	12	1,6	30
	<b>Gaba<sup>1</sup></b>	79	29	144	113	160
	<b>Aba<sup>2</sup></b>	2,5	1,5	n.d.	0,1	1,3
	<b>Tau</b>	2,2	1,6	0,1	n.d.	0,6
<b>TOTAL</b>		1625	700	1330	648	2210

<sup>1</sup>àcid  $\gamma$ -aminobutíric. <sup>2</sup>àcid  $\alpha$ -aminobutíric. n.d.: no detectat.

**Taula A5.** Aminoàcids dels mostos suplementats (mg/l).

		<b>Chardonnay</b> (0,2 g/l FDA)	<b>Garnatxa</b> <b>blanca</b> (2 g/l FDA+3 g/l FDK)	<b>Riesling</b> <sup>3</sup> (0,2 g/l FDA+ 0,13 g/l FDK)	<b>Carinyena</b> (0,2 g/l FDA+0,2 g/l FDK)	<b>Pinot Noir</b> (0,2 g/l FDA+0,2 g/l FDK)
	<b>His</b>	n.d.	n.d.	11/2,7	21	55
	<b>Arg</b>	467	398	32/293	228	1352
<i>BÀSICS</i>	<b>Lys</b>	1,5	n.d.	5,2/5,6	1,7	1,6
	<b>Ala</b>	194	41	5,7/6,7	58	253
	<b>Val</b>	16	6,0	0,6/0,4	10	37
	<b>Leu</b>	12	8,5	0,4/1,4	8,0	40
	<b>Ile</b>	9,5	3,3	n.d./n.d.	6,2	24
	<b>Pro</b>	181	25	10/12	23	23
	<b>Phe</b>	15	9,5	n.d/0,1	4,2	17
	<b>Trp</b>	11	7,9	n.d./n.d.	5,1	11
	<b>Met</b>	23	1,9	1,3/1,3	1,8	17
PROTEICS	<b>Gly</b>	11,5	4,9	1,1/5,5	5,1	12
	<b>Asn</b>	n.d.	8,1	20/15	1,5	13
	<b>Gln</b>	392	132	83/64	67	n.d.
	<b>Ser</b>	103	20	1,6/0,6	26	89
	<b>Thr</b>	85	23	0,8/1,3	21	124
	<b>Tyr</b>	23	15	0,6/1,1	4,9	15
	<b>Asp</b>	21	14	2,2/1,4	6,0	21
<i>ÀCIDS</i>	<b>Glu</b>	47	51	14/12	14	117
	<b>Orn</b>	2,2	4,5	6,1/7,8	2,7	17
NO	<b>Cit</b>	8,2	7,3	n.d./17	2,0	33
PROTEICS	<b>Gaba</b> <sup>1</sup>	85	49	165/141	103	177
	<b>Aba</b> <sup>2</sup>	2,4	0,8	1,3/1,5	0,1	1,2
	<b>Tau</b>	2,1	1,9	4,6/4,7	n.d.	0,1
	<b>TOTAL</b>	1712	833	367/596	620	2450

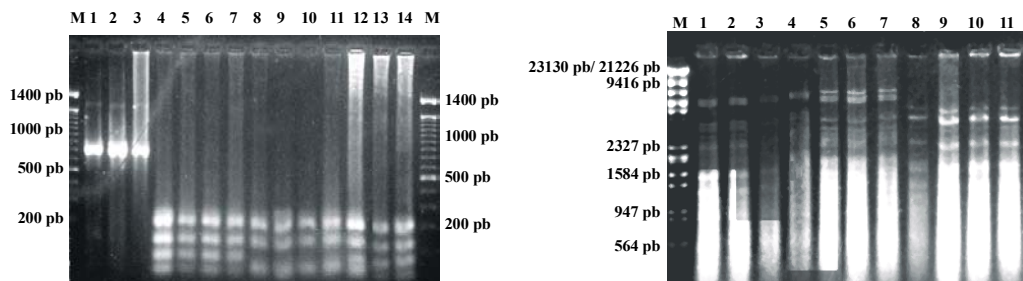
<sup>1</sup>àcid  $\gamma$ -aminobutíric. <sup>2</sup>àcid  $\alpha$ -aminobutíric. <sup>3</sup>Correspon a les determinacions mitjanes dels mostos-vins suplementats al sisè dia des de la inoculació per les fermentacions a 17 °C i a 13 °C (17 °C/13 °C). n.d.: no detectat.



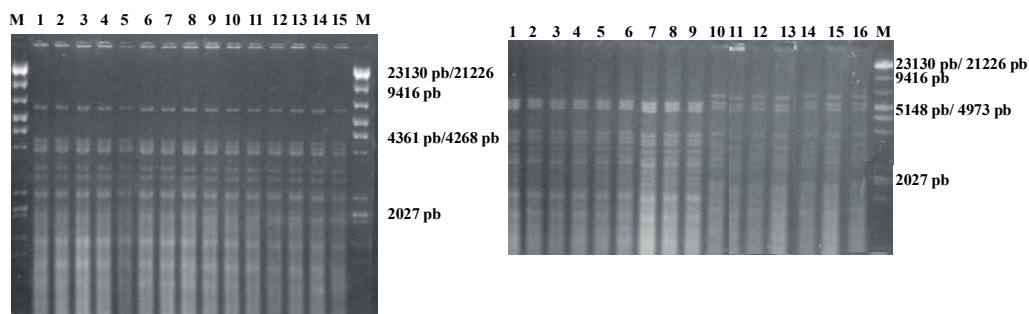
## ANNEX III



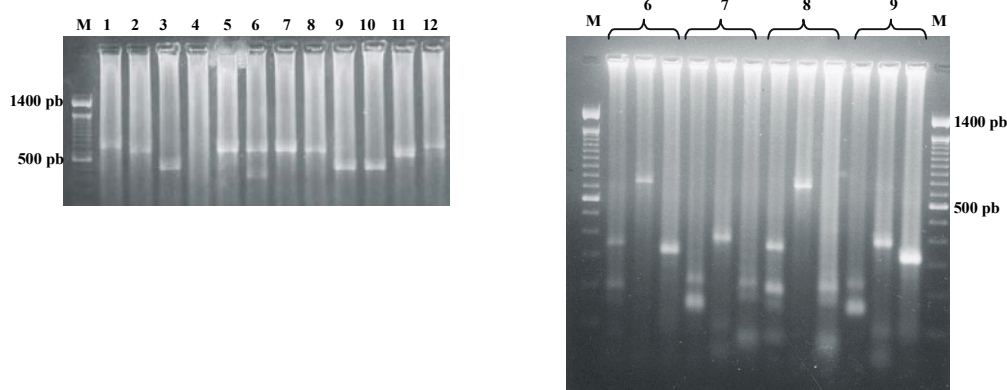
## ANNEX III. IDENTIFICACIÓ I TIPIFICACIÓ DE SOQUES DE LLEVATS COMERCIALS. IDENTIFICACIÓ DE LLEVATS NADIUS



**Figura A5.** **Esquerra:** fotografia gel d'electroforesi d'amplificats per PCR (1,2,3) mitjançant encebadors ITS1 i ITS4, i digestions amb enzim de restricció *Hae*III d'amplificats (4-14). M: marcador Ladder (100 pb, GIBCO-BRL). 1, 4-7: Enoferm M2. 2, 8-10: Fermichamp. 3, 11-14: Soca criotolerant. Tots corresponen als perfils de *Saccharomyces cerevisiae*. **Dreta:** RFLP mitocondrial amb enzims de restricció, *Hinf*I. M: marcador de grandària d'ADN (MarkerII+Marker III, Roche Diagnostics Corporation). 1-4: Enoferm M2. 5-7: Fermichamp. 8-11: soca criotolerant.



**Figura A6.** **Esquerra:** Perfils de la soca comercial AWRI-350. M: marcador de grandària d'ADN (MarkerII+Marker III, Boehringer Mannheim). 1-6: colònies de LSA rehidrades. 7-15 colònies aïllades de mostres a final de fermentació. **Dreta:** Perfil de colònies aïllades a final de fermentació, que corresponen a les soques inoculades. 1-9: Enoferm M2. 10-16: Fermichamp.



**Figura A7.** **Esquerra:** Amplificats per PCR mitjançant encebadors ITS1 i ITS4 a partir de colònies de llevats aïllades del most de Carinyena 98. **Dreta:** Digestions dels amplificats 6, 7, 8, i 9 amb els següents enzims de restricció: *Hinf*I, *Hae*III i *Cfo*I. La grandària dels amplificats i les bandes resultant de les digestions es comparen a les obtingudes amb la col·lecció de llevats tipus de la CECT (Colecció Espanyola de Cultivos Tipos, València, Espanya). Així, les colònies 6 i 8 corresponen a *Hanseniospora uvarum*, colònia 9 a *Candida stellata*, i 7 no es pot identificar.



## BIBLIOGRAFIA



## BIBLIOGRAFIA

- Aerny, J. 1996.** Composés azotés des moûts et des vins. *Revue Suisse de Vitic.Arboric.Hortic.* 28(3): 161-165.
- Allen, M. S. i Auld, P. W. 1988.** Stuck chardonnay ferments: experience in the Hunter and Mudgee regions. *Aust. Grapegrower Winemaker* 292: 9-11.
- Ancin C., Ayestaran B., Garrido J. 1996.** Clarification by vacuum filtration of Grenache must. Utilitation of free amino acids During fermentation and bottle-aging of wine.*Am. J. Enol. Vitic.* 47(3):313-322.
- Anderson, J. J., Dagley, S. 1981.** Catabolism of tryptophan, anthranilate and 2,3-dihydroxybenzoate in *Trichosporon cutancum*. *J. Bacteriol.* 146: 291.
- Angelo, J., Siebert, K. J. 1987.** A new medium for the detection of wild strains in brewing culture yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 45: 135-140.
- Argiriou, T., Kaliafas, A., Psarianos, K., Kanellaki, M., Voliotis, S. i Koutinas, A. A. 1996.** Psychrotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains after an adaptation treatment for low temperature wine making. *Process Biochemistry.* 31(7): 639-643.
- Ayestaran, B.M., Ancin, M.C., García, A. M., González, A., Garrido, J. J. 1995.** Influence of pre fermentation clarification on nitrogenous contents of musts and wines. *J. Agri. Food Chem.* 43: 476-482.
- Äyräpää, T. 1971.** Biosynthetic formation of higher alcohols by yeasts. Dependance on the nitrogenous nutrient level of the medium. *J. Inst. Brew.* 77: 266-275.
- Bachmann, O. 1994.** Peroxidase isoenzyme patterns in Vitaceae. *Vitis.* 33: 151-153.
- Ballarin-Denti, A., den Hollander, J. A., Sanders, D., Slayman, C. W., Slayman, C. L. 1984.** Kinetics and pH-dependence of glycine-proton symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 778: 1-16.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. i Yarrow, D. 1990.** *Yeasts: Characteristics and Identification.* 2<sup>a</sup> edició. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bauer, F. F. i Pretorius, I. S. 2000.** Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21. Número especial.

**Becker, J. M., Naider, F. 1980.** Transport and utilization of peptides by yeast. A *Microorganisms and Nitrogen Sources*. Ed. J. W. Payne. 257-379. J. Wiley. Chichester.

**Bell, A., Ough, C., Kliewer, W. 1979.** Effect on must and wine composition, rates of fermentation and wine quality of nitrogen fertilization of *V. Vinifera* var. Thompson Seedless grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 30: 124-128.

**Bell, A.A., Ough, C. S., Kliewer, W. M. 1979.** Effects on must and wine composition, rates of fermentation, and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* var. Thompson seedless grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 2: 124-129.

**Bely, M., Sablayrolles, J. M., Barre, P. 1991.** Automatic detection and correction of assimilable nitrogen deficiency during alcoholic fermentation under enological conditions. A *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*; 18-19 Juny 1991; Seattle, WA, USA: American Society for Enology and Viticulture. 211-214.

**Bertrand, A. 1988.** Role of the continuous distillation process on the quality of Armagnac. A *Distilled Beverage Flavor. Recent Developments*. J. R. Pigott and A. Paterson Eds. Ellis Horwood Ltd. Chichester. 97-115.

**Bidan, P. 1975.** Relation entre la teneur des vins en alcools superieur et la teneur des moûts en substances azotées en particulier en acides amines. *Bull. O.I.V.* 48: 842-867.

**Bidan, P., Feuillat, M., Moulin, J.P. 1985.** Les vins mousseux. Rapport français. 65ème Assemblée Générale de l'OIV. *Bulletin de l'Office International du Vin* 59: 663-65, 563-626.

**Bisson L. F. 1991.** Influence of Nitrogen on Yeast and Fermentation of Grapes. A *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*; 18-19 Juny 1991; Seattle, WA, USA: American Society for Enology and Viticulture. 78-89.

**Bisson, L. F. 1993.** Yeast-Metabolism of sugars. A *Wine. Microbiology and Biotechnology*. Cap. 3. Editat per G. H. Fleet. Harwood Academic Publishers. Chur. SW. 55-75.

**Bisson, L. F. 1999.** Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50(1): 107-119.

**Bisson, L. F., Coons, D. M., Kluckeberg, A. L., Lewis, D. 1993.** Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28: 259-308.



- Bossinger, J., Lawther, R. P., Cooper, T. G. 1974.** Nitrogen repression of the allantoin degradative enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 118: 821.
- Botella, M. A., Perez-Rodriguez, L., Domecq, B., Valpuesta, V. 1990.** Amino Acid Content of Fino and Oloroso Sherry wines. Am. J. Enol.Vitic. 41(1); 12-15.
- Bourgeois, C. M., Thouvenot, D. R. 1970.** Effets de la lysine sur la synthèse et l'activité de l'arginase et de l'ornithine transaminase chez *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 15:140.
- Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-255.
- Brandriss, M. C., Magasanik, B. 1979.** Genetics and physiology of proline utilisation in *Saccharomyces cerevisiae*: enzyme induction by proline. J. Bacteriol. 140: 498.
- Brandriss, M. C., Magasanik, B. 1980.** Proline an essential intermediate in arginine degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 143: 1403.
- Busturia, A. Laguna, R. 1986.** Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 132: 379-385.
- Cabanis J.C.; Cabanis M.T., Cheynier V.,Teissedre P.L. 1998.** Tables de composition. Capitotl 8. A *Oenologie. Fondement scientifiques et technologiques.* Technique & Documentation. Paris
- Cáceres, I., Polo, M. C., Cabezudo, M. D. 1987.** El análisis íntegro de los vinos. V. La fracción nitrogenada. Alimentación. Equipos y tecnología. 123-128.
- Canals, J. M. 1997.** Aplicació de tècniques de cromatografia líquida de proteïnes (FPLC) a l'estudi de vins blancs. Tesi. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona.
- Cantagrel, R., Symonds, P., Carles, J. 1982.** Composition en acides aminés du moût en fonction du cépage et de la technologie et son influence sur la qualité du vin. Sci. Aliments. 2: 109-142.
- Carles J, Lamazou-Betbeder M, Pech R. 1958.** Les acides aminés libre du vin. C. R. Acad. Sci. 246: 1254-1257.
- Carnevallier V., Schlich P., Guerreau J., Charpentier C., Feuillat M. 1999.** Characterization of the production Regions of Chardonnay wines by analysis of free amino acids. Vitis. 38(1): 37-42.

**Cartwright, C. P.; Rose, A. H.; Calderbank, J.; Keenan, H. J. 1989.** Solute transport. A *The Yeast. Metabolism and Physiology of Yeast*. Vol. 3. Editat per A. H. Rose i J. S. Harrison. Academic Press Limited. London, GB. 5-49.

**Castellari, L., Magrini, P., Passarelli, P. Zambonelli, C. 1995.** Effect of must fermentation temperature on minor products formed by cryo and non-cryotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Ital. J. Food Sci.* 2: 125-132.

**Chaler, G. 1991.** Nuevos dispositivos de vendimia mecánica. *Viticultura/Enología Profesional*. 13: 38-45.

**CharoENCHAI, C., Fleet, G. H. i Henschke, P.A. 1998.** Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 49(3): 283-288.

**Charpentier, C., Feuillat, M. 1993.** Yeast autolysis. A *Wine. Microbiology and Biotechnology*. Cap. 7. Editat per G. H. Fleet. Harwood Academic Publishers. Chur. SW. 225-242.

**Charpentier, C. 1998.** Les peptides des moûts et des vin. Les composés azotés. A *Enologie. Fondement scientifiques et technologiques* Cap. 3.4. p. 107-108. Lavoisier (Technique & documentation). Paris.

**Chen, E. C.-H. 1978.** The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 36: 39-43.

**Ciurana, J. 1980.** *Els vins de Catalunya*. General Gràfic, S.A. Barcelona.

**Colowick, S. P. 1973.** The hexokinases. A *The Enzymes*. 3ª Edició. Editat per P.D. Boyer. 9: 1-48. New York: Academic Press.

**Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A., Guillamón, J. M. 1998.** Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food. Microbiol.* 41: 169-175.

**Cooper, T. G. 1982.** Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. A *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Metabolism and Gene Expression*. Editat per Strathern, E.W. Jones i J. B. Broach. Cold Spring Harbor Laboratory. NY, USA. 399-461.

**D'Amore, T. i Stewart, G. 1987.** Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 322-330.

**D'Amore, T., Russell, I., Stewart, G. G. 1989.** Sugar utilization by yeast during fermentation. *J. Ind. Microbiol.* 4: 315-324.

**DARP. 1993.** Butlletins divulgatius.

**Davis, R. H. 1986.** Compartmental and regulatory mechanism in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 50: 280-313.

**De la Presa-Owens, C., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., De la Torre-Boronat M. C. 1995.** Characterization of Macabeo, Xarel.lo, and Parellada white wines from the Penedès Region. II. Am. J. Enol. Vitic. 46(4): 529-541.

**De Leenheer, A. P., Lambert, W. E., van Bucxlaer, J. F. 2000.** *Modern chromatographic analysis of vitamins*. 3<sup>a</sup> edició. Chromatographic science series. Marcel Dekker Inc, new York.

**Degre, R. 1993.** Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. A *Wine. Microbiology and Biotechnology*. Cap. 15. Editat per G. H. Fleet. Harwood Academic Publishers. Chur. SW. 421-447.

**Dittrich, H. H., Staudenmayer, T. 1970.** Über die Zusammenhänge zwischen der Sulfit-Bildung und der Schwefelwasserstoff-Bildung bei *Saccharomyces cerevisiae*. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, II Abt. Bd. 124: 113-118.

**Dizy M. i Polo M. C. 1996.** Changes in concentration of nitrogenous compounds during fermentation of white grape musts at pilot plant scale. Food Sci Tech. Int. 2:87-93.

**Dorrestein, E., Laureano, O., Teixeira, A. R. 1995.** Electrophoretic and FPLC analysis of soluble proteins in four Portuguese wines. Am. J. Enol. Vitic. 46: 235-242.

**Du Plessis, C. S. 1983.** Influence de la température d'élaboration et de conservation sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des vins. Bull. OIV. 624: 104-115.

**Dubois C., Manginot C., Roustan J., Sablayrolles J., i Barre P. 1996.** Effect of variety, year, and grape maturity on the kinetics of alcoholic fermentation. Am. J. Enol. 47(4): 363-368.

**Dubois, E., Grenson, M. 1979.** Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: Multiplicity and regulation. Molec. Gen. Genet. 175: 67-76.

**Dubourdieu, D., Serrano, M. Vannier, A. C., Ribéreau-Gayon, P. 1988.** Étude comparée des tests de stabilité protéique. Conn. Vigne Vin. 22: 261-273.

**Dumolin E.D., Azais B.P., Guerain J.T. 1987.** Determination of sugar and ethanol content in aqueous products of molasses distilleries by near infrared spectrophotometry. J. Food Sci. 52 (3): 626-630.

**Edwards, C. G. Beelman, R. B. 1990.** Extraction and analysis of volatile compounds in white wines using Amberlite XAD-2 resin and capillary gas chromatography. *J. Agric. Food. Chem.* 38: 216-220.

**Edwards, C. G., Reynolds, A. G., Rodríguez, A. V., Semon, M. J., i Mills, J. M. 1990.** Implication of acetic acid in the induction of slow/stuck grape juice fermentations and inhibition of yeast by *Lactobacillus* sp. *Am. J. Enol. Vitic.* 50(2): 204-210.

**Egli, C. M., Edinger, W. D., Mitrakul, C. M. i Henick-Kling, T. 1998.** Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85: 779-789.

**Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. i Querol, A. 1999.** Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spcars. *Syst. Appl. Microbiol.* 49: 329-337.

**Etievant, R., Schlich, P., Bouvier, J.C., Symonds, P., Bertrand, A. 1988.** Varietal and geographic classification of French red wines in terms of elements, amino acids and aromatic alcohols. *J. Sci. Food Agricult.* 45: 25-41.

**Ferreras, J. M., Iglesias, R., Girbes, T. 1989.** Effect of the chronic ethanol action on the activity of the general amino-acid permease from *Saccharomyces cerevisiae* var. *Ellipsoideus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 979: 375-377.

**Feuillat M., Charpentier C., Maujean A. 1998.** Les composés azotés. Capitoul 3. A *Oenologie. Fondement scientifiques et technologiques.* Cap. 3. a. Lavoisier (Technique & Documentation). Paris

**Feuillat, M., Bidan, P., Rosier, Y. 1977.** Croissance des bactéries lactiques à partir des principaux constituants azotés du vin. *Ann. Technol. Agric.* 26: 435-447.

**Feuillat, M., Brillant, G., Rochard, J. 1980.** Mise en évidence d'une production de protéases exocellulaires par les levures au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin. *Conn. Vigne Vin.* 1: 36-52.

**Feuillat, M., Charpentier, C., Bonn, E. 1995.** Caracterisation des proteines dans les vins blanc. Applications au cepage chardonnay. *Revue des Oenologie et des techniques vitivinicoles et oenologiques.* 78: 9-14.

**Feuillat, M., Charpentier, C., Massoutier, C. 1997.** Intérêt œnologique des souche de levures *Saccharomyces* cryotolérantes. *Rev. des œnologie.* 85: 18-21.

- Fleet, G. H. 1990.** Growth of yeasts during wine fermentations. *J. Wine Research*. 1: 211-223.
- Fleet, G. H. 1990.** Which yeasts species really conduct the fermentation? A actes de *The seventh Australian wine industry technical conference*. 14-16 Agost, 1989, Adelaide, SA. Editat per P.J. Williams, D. Davidson, T. H. Lee. Adelaide, SA: Australian Industrial Publishers. 153-156.
- Fleet, G. H., Heard, G. M. 1993.** Yeast-growth during fermentation. A *Wine. Microbiology and Biotechnology*. Cap. 2. Editat per G. H. Fleet. Harwood Academic Publishers. Chur. SW. 27-54.
- Fleet, G. H., Heard, G. M., Gao, C. 1989.** The effect of temperature on the growth and ethanol tolerance of yeasts during wine fermentation. A *Seventh International Symposium on Yeasts*. J. Wiley & Sons Ltd. 43-46.
- Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P. 1984.** Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1034-1038.
- Frezier, V. i Dubourdiou, D. 1992.** Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 375-380.
- Gafner, J., Schütz, M. 1997.** Impact of glucose-fructose-ratio on stuck fermentations: practical experiences to restart stuck fermentations. A *The composition of musts. Influence on stuck fermentations. Les entretiens scientifiques Lallemand*. Lallemand S.A. Toulouse. 93-96.
- Gao, C., Fleet, G. H. 1988.** The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata*, and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 405-410.
- Geneix, C. 1984.** Recherches sur la stimulation et l'inhibition de la fermentation alcoolique de moût de raisin. Tesi de l'Université de Bordeaux II, Talence, França.
- Gerbaud, V., Gabas, N., Laguerie, C., Blouin, J., Vidal, S., Moutounet, M., Pellerin, P. 1996.** Effect of wine polysaccharides on the nucleation of potassium hydrogen tartrate in model solutions. *Trans. I. Chem. E.* 74(A): 782-789.
- Gilboe D. D. i Williams J. N. 1956.** Evaluation of the Sakoguchi reaction for quantitative determination of arginine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91:535-556.
- Giovanelli, G., Peri, C., Parravicini. 1996.** Kinetics of grape juice fermentation under aerobic and anaerobic conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(4): 429-434.

- Giudici, P., Caggia, C., Pulvirenti, A. i Rainieri, S. 1998.** Karyotyping of *Saccharomyces* strains with different temperatur profiles. J. Appl. Microbiol.. 84: 811-819.
- González-Lara, R., Correa, I., Polo, M.C. 1989.** Classification of variety musts by statistical analysis of their electrophoretic protein pattern. Food Chem. 34: 103-110.
- González-Lara, R., González, L. M. 1991.** Analysis of the soluble proteins in grape must by two-dimensional electrophoresis. J. Chromatogr. 541: 453-458.
- Greasham, R. L., Moat, A. G. 1973.** Amino acid transport in a polyaromatic amino acid auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 115: 975-981.
- Gregory, M. E., Keenan, M. H. J., Rose, A. H. 1982.** Accumulation of L-Asparagine by *Saccharomyces cerevisiae* X-2180. J. Gen. Microbiol. 128: 2557-2562.
- Guillamón, J. M., Barrio, E. i Querol, A. 1996.** Characterization of wine yeast strain of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers. Relationships between genetic distance and geographic origin. Syst. Appl. Microbiol. 19: 122-132.
- Guillamón, J. M., Barrio, E., Huerta, T. i Querol, A. 1994.** Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. Int. J. Syst. Bacteriol, 44: 708-714.
- Guilloux-Benatier, M., Guerreau, J., Feuillat, M. 1995.** Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganims. Am. J. Enol. Vitic. 46(4): 486-492.
- Guitart A., Hernández Orte P., Ferreira V., Peña C., Cacho J. 1999.** Some observations about the correlation between the amino acid content of musts and wines of the Chardonnay variety and their fermentation aromas. Am. J. Enol. Vitic. 50(3):253-258.
- Guymon, J. F., Ingraham, J. L., Crowell, E. A. 1961.** The formation of *n*-propyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. 95: 163-168.
- Hartigan, J. 1975.** Clustering algorithms. John Willey and Sons. New York.
- Heard, G. M., Fleet, G. H. 1985.** Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. Appl. Eviron. Microbiol. 50: 727-728.

**Henschke, P. A., Jiranek, V. 1993.** Yeast. Metabolism of nitrogen compounds. A *Wine. Microbiology and Biotechnology*. Cap. 4. Editat per G. H. Fleet. Harwood Academic Publishers. Chur. SW. 77-164.

**Henschke, P.A., Jiranek, V. 1991.** Hydrogen sulfide formation during fermentation: Effect of nitrogen composition in model grape must. A *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*; 18-19 Juny 1991; Seattle, WA, USA: American Society for Enology and Viticulture. 172-184.

**Hernández Orte P., Guitart A., Ferreira V, Gracia J., Cacho J. 1998.** Influencia del tiempo de maceración y de la adición de enzimas sobre la composición de los aminoácidos de mostos y vinos y su relación con el aroma. *Food Sci. Tech. Int.* 4(6):407-418.

**Herraiz, T., Ough, C. S.** Formation of ethyl esters of amino acids by yeasts during the alcoholic fermentation of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 44(1): 41-48.

**Hidalgo. 1993.** *Tratado de viticultura general*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

**Hohmann, S., Cederberg, H. 1990.** Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes *PDC1* and *PDC5*. *Eur. J. Biochem.* 188: 615-621.

**Houtman, A. C., du Plessis, C. S. 1981.** The effect of juice clarity and several conditions promoting yeast growth on fermentation rate: the production of aroma compounds and wine quality. *S. Afr. J. enol. Vitic.* 2: 71-81.

**Hsu, J. C., Heatherbell, D. A. 1987.** Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice, and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 6-10.

**Huang, Y. C., Edwards, C. G., Peterson, J. C. i Haag, K. M. 1996.** Relationship between sluggish fermentations and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(1): 1-10.

Huang, Z. i Ough, C. S. 1991. Amino acid profiles of commercial grape juices and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(3): 261-267.

**Iglesias, R., Ferreras, J. M., Arias, F. J., Muñoz, R., Girbes, T. 1990.** Changes in the activity of the general amino acid permease from *Saccharomyces cerevisiae* var. *Ellipsoideus* during fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 36. 808-810.

**Ingledeu W. M. 1997.** Nutrients, yeast hulls and proline in the wine fermentation. A *The composition of musts. Influence on stuck fermentations. Les entretiens scientifiques Lallemand*. Lallemand S.A. Toulouse. 15-21.

**IngledeW, W. M., Magnus, C. A., Patterson, J. R. 1987.** Yeast foods and ethyl carbamate formation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 332-335.

**IngledeW, W. M., Magnus, C. A., Sosulski, F.W. 1987.** Influence of oxygen on proline utilization during the wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 246-248.

**IngledeW, W., Kunkee, R. 1985.** Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 65-76.

**Jaulmes P. , Bessières C., Fourcade S., Campeau C. 1963.** Dosage microbiologique des vitamines et des acides aminés dans les vins après différents traitements. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier.* 23:361.

**Jiménez, A. 1994.** Aplicaciones industriales de la fermentación alcohólica: fabricación de cervezas, vinos, ect. Levaduras de interés industrial I. Sesión 4. Asignatura 2: Manipulación de células. Mejora de estirpes productoras. Fusión celular y producción de híbridomas. Comunicación. Master de Biotecnología II. CBMSO-UAM. Cantoblanco. Madrid.

**JiraneK, V., Eglinton, J. M., Gockowiak, P., Langridge, P., Henschke. 1993.** Nitrogen: a critical regulator of fermentation. Stockley, C. S., Johnstone, R. S., Leske, P.A. i Lee, T. H., ed. *Proceedings of the Eight Australian Wine Industrytechnical conference, 25-29 d'Octubre de 1992, Melbourne, Victoria.* Adelaide, SA: Winetitles, 133-141.

**JiraneK, V., Langridge, P., Henschke, P. A. 1991.** Yeast nitrogen demand: Selection criterion for wine yeasts for fermenting low nitrogen musts. *Actes de International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine* (Seattle, 1991). Editat per J. Rantz. Davis, CA. 266-269.

**JiraneK, V., Langridge, P., Henschke, P. A. 1995.** Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.* 46(1): 75-83.

**Jobé, J. 1982.** *Le nouveau grand livre du vin.* Editorial Edita, S.A. Lausanne.

**Jones, M., Pierce, J. S. 1964.** Adsorption of amino acids from wort by yeasts. *J. Instit. Brew.* 70: 307-315.

**Jones, R. P. 1990.** Roles for replicative deactivation in yeast-ethanol fermentations. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10: 205-222.

**Käppeli, O., Sonnleitner, B. 1986.** Regulation of sugar metabolism in *Saccharomyces*-type yeast: experimental and conceptual considerations. *Crit. Rev. Biotechnol.* 4: 299-325.



**Killian, E., Ough, C. S. 1979.** Fermentation esters-formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* 30: 301-305.

**Kinsella, J.E. 1990.** Flavor perception and binding. *Int. New Fat Oils Relat. Mater.* 1: 215-226.

**Kishimoto, M. 1994.** Fermentation characteristics of hybrids between cryophilic wine yeast *Saccharomyces bayanus* and the mesophilic wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferm. Bioeng.* 4: 432-435.

**Kliewer W. M. 1968.** Changes in the concentration of free amino acids in grape berries during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 65-76.

**Kliewer, W. M. 1970.** Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes. *J. Food Sci.* 35: 17-21.

**Kluba R. M., Mattick L.R., Hackle L.R. 1978.** Changes in the free and total amino acid composition of several *Vitis labruscana* grape-varieties during maturation. *Am. J. Enol. Vitic.* 29: 114-123.

**Kotyk, A., Dvoráková, M. 1990.** Transport of L-Tryptophan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiology.* 35. 209-217.

**Kreger-van Rij N. J. W. 1984.** *The Yeast, a Taxonomic Study.* 3<sup>a</sup> edició. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

**Kruckeberg, A., L., Bisson, L., F. 1990.** The *HTX2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high affinity glucose transport. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5903-5913.

**Kumada, J., Nakajima, S., Takahashi, T., Narziss, L. 1975.** Einfluss von Druck und Temperatur bei der Gärung auf den Stoffwechsel der Hefe und Bierqualität. A les *Actes del 15è European Brewery Convention.* Nice. 615-623.

**Kurtzman, C. P. 1998.** *The Yeasts, a Taxonomic Study.* 4<sup>a</sup> edició. Editat per Kurtzman, C. P., i Fell, J. W. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

**Lacerda, V., Marsden, A., Buzato, J. B., Ledingham, W. M. 1990.** Studies on ammonium assimilation in continuous cultures of *S. cerevisiae* under carbon and nitrogen limitation. A *Proceedings of the 5<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology.* Christiansen, C., Munck, L. & Villadsen, J. Eds. Munksgaard International Publishers. Copenhagen. 1075-1078.

**Lafon-Lafourcade S., Larue F., Ribéreau-Gayon P. 1979.** Evidence for the Existence of "Survival Factors" as an Explanation for Some Peculiarities of Yeast Growth, Especially in Grape Must of High Sugar Concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 38(6): 1069-1073.

**Lafon-Lafourcade, S. Geneix, C., Ribéreau-Gayon, P. 1984.** Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1246-1249.

**Lafon-Lafourcades S., Peynaud E. 1959.** Dosage microbiologique des acides aminés de moûts de raisin et des vins. *Vitis.* 2: 45-56

**Lagace, L. S., Bisson, L. F. 1990.** Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 147-155.

**Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. 2000.** Yeast and its importance to wine aroma – A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 97-129.

**Lamikanra, O, Inyang, I. D. 1988.** Temperature influence on Nmuscadine wine. Protein Characteristics. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 113-116.

**Larchevêque, C., Casanova, A., Dupuch, V. 1999.** Influence de différents activateurs de la fermentation alcoolique sur la composition en acides aminés et la fermentescibilité des moûts de *Vitis vinifera* L. Var. Muscadelle provenant de vignes enherbées. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 33(4) 161-175.

**Large, P. J. 1986.** Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast.* 2: 1-34.

**Laurent, M. H., Henick-Kling, T. i Acree, T. E. 1994.** Changes in the aroma and odor of Chardonnay wine due to malolactic fermentation. *Wein Wissenschaft.* 49(1): 3-10.

**Leao, C., Van Uden, N. 1985.** Effects of ethanol and other alkanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 359-363.

**Lehninger, Albert L. 1987.** Glucólisis. A *Bioqímica*. Capítol 16. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.

**Lehtonen P. 1996.** Determination of Amines and Amino Acids in Wine- A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(2):127-133.

**Lema, C, García-Jares, C. 2000.** Influencia de la poblaciones de levaduras autóctonas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* en el aroma del vino Albariño. *Viticultura y Enología Profesional.* 66:52-64.

**Lema, C., Garcí-Jares, C., Orriols, I. i Angulo, L. 1996.** Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 206-216.

**Llauberes, R. M., Dubourdiu, D., Villettaz, J. C. 1987.** Exocellular Polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. *J. Sci. Food. Agric.*, 41: 277-286.

**Longo, E., Velázquez, J. B., Sierio, C., Cansado, J., Calo, P. i Villa, T. G. 1992.** Production higher alcohol, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnes, N. W. Spain). *World J. Microbiol. Biotech.* 8: 539-541.

**Lonvaud-Funel, A., Joyeux A., Ledoux O. 1991.** Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 501-508.

**Lubbers, S., Charpentier, C., Feuillat, M. 1996.** Étude del a rétention de composés d'arômes par les bentonites en moût, vin et milieux modèles. *Vitis.* 35: 59-62.

**Lüthi H., Vetsch U. 1952.** Papierchromatographische Bestimmung von Aminosäuren in Weinen. *Schwiez Zeitzch fur Obst und Weinbau.* 61: 405-408.

**Lüthi H., Vetsch U. 1953.** Papierchromatographische Trennung und Bestimmung von Aminosäuren in Traubenmost und Wien. *Der Deutsch Weinbau.* 7: 33-53.

**Marder, R., Becker, J. M., Naider, F. 1977.** Peptide transport in yeast: Utilization of leucine- and lysine-containing peptides by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 131: 906-916.

**Mareca, I. 1983.** Vitaminas de mosto y vino. Enzimas. A *Origen, composición y evolución del vino.* Capitol 14. Editorial Alhambra, S.A. Madrid.

**Margheri, G., Versini, G., Pelligrini, Tanon, D. 1986.** L'azoto assimilabile e la tiamina in fermentazione, loro importanza qualifattori di qualita del vini. *Vini d'Italia.* 71-86.

**Martínez, J., Millan, C., Ortega, J. M. 1989.** Growth of natural flora during the fermentation of inoculated musts from "Pedro Ximénez" grapes. *S. Afri. J. Enol. Vitic.* 10: 31-35.

**Masneuf, I. 1996.** Recherches sur l'identification génétique des levures de vinification. Applications cenologiques. Tesi de Doctorat de La universitat de Bordeaux II.

- Masneuf, I., Aigle, M., Dubourdiou, D. 1996.** Development of a polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in ecology. FEMS Microbiol. Letters.
- McClellan, C. J., Does, A. L., Bisson, L. F. 1989.** Characterization of hexose uptake in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. Am. J. Enol. Vitic. 40: 9-15.
- McKelvey, J., Rai, R., Cooper, T. G. 1990.** GABA transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 6: 263-270.
- Millery, A., Duteurtre, B., Boudaille, J.P., Maujean, A. 1986.** Différenciation des trois cépages champenois à partir de l'analyse des acides aminés libres des moûts des récoltes 1983 et 1984. Rev. Fr. Oenol. 103:32-50.
- Moine-Ledoux, V. 1996.** Recherches sur le rôle des mannoprotéines de levure vis-à-vis de la stabilisation protéique et tartarique des vins. Tesi. Université de Bordeaux II.
- Moio, L., Addeo, F. 1989.** Focalizzazione isoelettrica delle proteine dei mosti e dei vini. Vignevini. 26(4): 53-57.
- Moneton, P., Sarthou, P., Le Goffie, F. 1986.** Transport and hidrolysis of peptides in *Saccharomyces cerevisiae*. J. of General Microbiology. 132 (8): 2147-2153.
- Monk, P., Hook, D., Freeman, B. 1987.** Amino acid metabolism by yeast. Lee, T. H., ed. *A Proceedings of the sixth Australian wine industry technical conference*; 14-17 Juliol 1986; Adelaides, SA: Australian Industrial Publishers. 129-133.
- Monteiro, F. F., Bisson L. F. 1992.** Utilization of adenine by yeast during grape juice fermentation and investigation of the possible role of adenine as a precursor of urea. Am. J. Enol. Vitic. 43(1): 18-22
- Monteiro, F. F., Bisson, L. F. 1991a.** Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 42: 47-57.
- Monteiro, F. F., Bisson, L. F. 1991b.** Amino acid utilisation and urea formation during vinification fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 42: 199-208.
- Monteiro, F. F., Trousdale, E. K., Bisson, L. F. 1989.** Ethyl carbamate formation in wine: Use of radiactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. Am. J. Enol. Vitic. 40: 1-8.

- Mora, J., Barbas, J. i Mulet, A. 1990.** Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Am. J. Enol. Vitic. 41: 156-159.
- Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Polo, M. C. 1996.** Peptides in must and wines. Changes during the manufacture of Cavas (sparkling Wines). J. Agric. Food Chem. 44: 3783-3788.
- Murphey, J. M., Powers, J. R., Spayd, S. E. 1989a.** Estimation of soluble protein concentration of white wines using Coomassie brilliant blue G-250. Am. J. Enol. Vitic. 40: 189-193.
- Murphey, J.M., Spayd, S. E., Powers, J. R. 1989b.** Effect for grape maturation on soluble protein characteristics of gewürtztraminer and white riesling juice and wine. Am. J. Enol. Vitic. 40: 199-207.
- Naider, F., Becker, J. M., Katzir-Katchalski, E. 1974.** Utilization of methionine-containing peptides and their derivatives by a methionine-requiring auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 249: 9-20.
- Naumov, G. I. 1987.** Genetic basis for classification and identification of the ascomycetous yeasts. Stud. Mycol. 30: 469-475.
- Nikawa, J. I., Nagumo, T., Yamashita. 1982.** Myo-inositol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 150: 441.
- Nordström, K. 1964.** Formation of esters from acids by brewer's yeast. IV. Effect of higher fatty acids and toxicity of lower fatty acids. J. Inst. Brewing. 70: 233-242.
- Nykänen, L. 1986.** Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. Am. J. Enol. Vitic. 37: 84-96.
- O'Connor-Cox, E.S.C., Lodolo, E. J., Axcell, B. C. 1996.** Mitochondrial relevance to yeast fermentative performance: a review. J. Inst. Brewing. 102:19-25.
- Ollivier, C., Stonestreet, T., Larue, F., Dubourdiou, D. 1987.** Incidence de la composition colloïdale des mouts blancs sur leur fermentescibilité. Conn. Vigne Vin. 21(1): 59-70.
- Ooghe, W., Kastelijn, H., De Waele, A. 1981.** Détermination de l'origine d'un vin rouge à l'aide du spectre des acides aminés. Ann. Fals. Exp. Chim. 789: 381-408.
- Ough, C. S., 1969.** Rapid determination of proline in grapes and wines  
J. Food Sci. 34: 228-230.

**Ough, C. S., Amerine M.A. 1988.** Nitrogen compounds. Capítol 6.2º Edició. A *Methods for analysis of must and wines*. John Wiley and sons. University of California.

**Ough, C. S., 1968.** Proline content of grapes and wines. *Vitis* 7: 321-331.

**Ough, C. S., 1976.** Ethyl carbamate in fermentated beverages and foods. *J. Agri. Food Chem.* 24: 323-328.

**Ough, C. S., Bell, A. A. 1980.** Effects of nitrogen fertilization on grapevines on amino acids metabolism and higher alcohol formation during grape juice fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 122-123.

**Ough, C. S., Crowell, E. A., Gutlove, B. R. 1988.** Carbamyl compound reactions with ethanol. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 239-242.

**Ough, C. S., Huang, Z., An, D., Stevens, D. 1991.** Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: Effects on urea excretion and readsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 26-40.

**Ough, C. S., Lee, T. H. 1981.** Effect of vineyard nitrogen fertilization level on the formation of some fermentation esters. *Am. J. Enol. Vitic.* 32(2): 125-127.

**Ournac, A., Flanzly, M., 1970.** Localisation et évolution des la vitamine B1 dans le vin. *Ann. Techn.* 3: 257-292.

**Paetzold, M., Dulau, L., Dubourdieu, D. 1990.** Fractionnement et caractérisation des glycoprotéines dans les moûts de raisins blancs. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 24: 13-28.

**Pekur, G.N., Bur'yan, N. I., Pavlenko, N. M. 1981.** Characteristics of nitrogen metabolism in wine yeasts under different fermentation conditions. *Appl. Biochem. Microbiol.* 17. 248-252.

**Peppard, T. 1988.** Analytical measurement of volatile sulfur compounds in beer. A *Beer Analysis*. Linkens, H. F. & Jackson, J. F. Eds. Springer-Verlag, Berlín. 241-253.

**Poux C. 1970.** Leas acides aminés dans les moûts et les vins. *Rev. Fr. Oenol.* 38: 5-19.

**Pueyo, E., Dizey, M., Polo, M. C. 1993.** Varietal differentiation of must and wines by means of protein fraction. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 255-260.

**Quain, D. E. 1988.** Studies on yeast physiology-Impact of fermentation performance and product quality. *J. Inst. Brewing.* 95: 315-323.

**Querol, A. Barrio, E. i Ramón, D. 1992.** A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 439-446.

**Querol, A. Barrio, E., Ramón, D. 1994.** Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 315-323.

**Querol, A., Barrio, E., T- Huerta, i Ramón, D. 1992.** Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2948-2953.

**Rainieri, S., Zambonelli, V., Tini, V., Castellari, L., i Giudici, P. 1998.** The enological traits of thermotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 49 (3).

**Rainieri, S., Zambonelli, C., Tini, V., Castellari, L. i Giudici, P. 1998.** The enological traits of thermotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 49(3): 319-324.

**Rankine, B. C. i Bridson, D. A. 1971.** Bacterial spoilage in dry red wine and its relationship to malolactic fermentation. *Aus. Wine Brewing Spirit Rev.* 90(3): 44-50.

**Rapp, A., Versini, G. 1997.** Influence of nitrogen compounds in grapes on aromas compounds of wines. *A The composition of musts. Influence on stuck fermentations. Les entretiens scientifiques Lallemand.* Lallemand S.A. Toulouse. 71-82.

**Rauhut, D. 1993.** Yeasts-Production of sulfur compounds. *A Wine microbiology and biotechnology.* Cap. 6. Fleet, G. H., Ed. Chur. Suïssa. 183-223.

**Rauhut, D., Kürbel, H. 1994a.** Die Entstehung von H<sub>2</sub>S aus Netzschwefelrückständen während der Gärung und dessen einfluss auf die Bildung von Böckserverursachenden Schwefelhaltigen Metaboliten in Wein. *Vitic. Enol. Sci.* 49: 27-36.

**Rauhut, D., Kürbel, H. 1994b.** Analysis of volatile sulfur compounds in wine using gas chromatography with a sulfur chemiluminescence detector. *A actes de Sixteenth International Symposium on Capillary Chromatography.* Riva del Garda. Italia. 732-741.

**Reifenberger, E., Boles, E., Ciriacy, M. 1997.** Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* 245: 324-333.

**Rhodes, N., Morris, C. N., Ainsworth, S., Kinderlerer, J. 1986.** The regulatory properties of yeast pyruvate kinase. *Biochem. J.* 234: 705-715.

**Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P., Ribéreau-Gayon, P. 1976.** *Sciences et techniques du vin. Traité d'oenologie.* Tome 1- Analyse et contrôle des vins. Tome 2- Caractères des vins. Maturation du raisin. Tome 3- Vinifications. Transformations du vin. Tome 4- Clarification et stabilisation. Matériels et Installations. Bordas, Paris.

**Ribereau-Gayon, P., Peynaud, E., Ribereau-Gayon, J., Sudraud, P. 1975.** *Traité d'Œnologie.* Sciences et Techniques du Vin. Vol. 2, Bordas, Paris.

**Ribéreau-Gayon, P., Dubourdiou, D., Donèche Bernard, Lonvaud, A. 1998.** *Traité d'Œnologie.* 1. Microbiologie du vin. Vinifications. Dunod. Paris. Fr.

**Roon, R. J., Larimore, F., Levy J. S. 1975.** Inhibition of amino acid transport by ammonium ion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 124: 325-331.

**Sablayrolles, J. M. 1997.** Sluggish and stuck fermentations, effectiveness of ammonium-nitrogen and oxygen additions. A *The composition of musts. Influence on stuck fermentations. Les entretiens scientifiques Lallemand.* Lallemand S.A. Toulouse. 23-27.

**Sablayrolles, J. M., Salmon, J. M., Barre, P. 1996.** Carences nutritionnelles des moûts. Efficacité des ajouts combinés d'oxygène et d'azote ammoniacal. *Revue Française d'Œnologie.* 159:25-30.

**Sauvage F.X., Nicol M.; Verries C., Sarris, J., Pradal M., Robin J.P. 1993.** Acides aminés libres et quelques activités enzymatiques de moûts de raisins mûrs. Analyses statistiques de l'effet varietal. *Sci. Aliments.* 13: 443-462.

**Sauvage F.X., Romieux C. G., Sarris J., Pradal M., Robin J.P., Flanzly C. 1991.** Évolution de quelques activités enzymatiques au cours de la maturation du raisin. Influence d'un stress hypoxique après la vendange. *Rev. Fr. Oenol.* 132: 14-20.

**Schultz A. S. i Pomper S. 1948.** Amino acids as a nitrogen source for growth of Yeasts. *Arch. Biochem.* 19: 184-192.

**Schutte, L. 1975.** Precursors of sulfur-containing flavor compounds. A *Fenaroli's handbook of flavor ingredients.* Furia, T. E. & Bellanca, N. Eds. CRC Press, Cleveland. Ohio. 184-227.

**Schütz, M., Kunkee, E. 1977.** Formation of hydrogen sulfide from elemental sulfur during fermentation by wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 28: 137-144.



**Seeber, R., Sferlazzo, G., Leardi, R., Dalla Serra, A. Versini, G. 1991.** Multivariate data analysis in classification of musts and wines of the same variety according to vintage year. *J. Agr. Food Chem.* 39: 1764-1769.

**Sinigaglia, M., Gardini, F., Guerzoni, M. E. 1993.** Relationship between thermal behaviour, fermentation performance and fatty acid composition in two strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotech.*

**Soles, R. M.; Ough, C. S.; Kunkee, R. E. 1982.** Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 33: 94-98.

**Soden, A., Francis, I. L., Oakey, H., Henschke, P. A. 2000.** Effect of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *AJGWR.* 6(1):21-30.

**Spayd, S. E. i Andersen-Bagge, J. 1996.** Free amino acid composition of grape juice from 12 *Vitis vinifera* cultivars in Washington. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(4): 389-402.

**Sponholz, W. 1991. Nitrogen Compounds in Grapes, Must, and Wine.** A *Proceedings of International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*; 18-19 Juny 1991; Seattle, WA, USA: American Society for Enology and Viticulture. 67-77.

**Sponholz, W.-R. 1993.** Wine spoilage by microorganisms. A *Wine. Microbiology and Biotechnology.* Cap. 14. Editat per G. H. Fleet. Harwood Academic Publishers. Chur. SW. 395-420.

**Stuckey, W., Iland, P., Henschke, P.A., Gawel, R. 1991.** The effect of lees contact time on Chardonnay wine composition. A *actes de International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*; 18-19 Juny 1991; Seattle, WA, USA: American Society for Enology and Viticulture.

**Symonds, P., Cantrarel, R. 1982.** Application de l'analyse discriminante à la différenciation des vins. *Ann. Falsif. Expert. Chim.* 75: 63-74.

**Tabor, H., Tabor, C. W., Cohn, M. S. 1983.** Mass screening for mutants in the polyamine biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Meth. Enzymol.* 94: 104-108.

**Tercelj D. 1965.** Étude des composés azotés du vin. *Ann. Technol. Agric.* 14: 307-319.

**Thomas K., Hynes S., IngledeW W. 1994.** Effects of paraticulate materials and osmoprotectans on Very-High-Gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(5): 1519-1524.

**Thomas K., Ingledew W. M. 1992.** The relationships of low lysine and high arginine concentrations to efficient ethanolic fermentation of wheat mash. *Can. J. Microbiol.* 38: 626-634.

**Torriani, S., Zapparoli, G., Suzzi, G. 1998.** Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie Leeuwenhoek.* 0:1-9.

**Trioli, G. 1997.** Effect of fermaid addition to white grape juice on the behavior of several commercial yeasts strains. A *The composition of musts. Influence on stuck fermentations. Les entretiens scientifiques Lallemand.* Lallemand S.A. Toulouse. 83-88.

**Trioli, G., Paronetto, L. 1992.** Relazioni tra componenti azotate dei mosti e qualità dei vini. *Vignevini.* 1(2): 29-36.

**Tromp, A. 1984.** The effect of yeast strain, grape solids, nitrogen and temperature on fermentation rate and wine quality. *S. Afri. J. Enol. Vitic.* 5: 1-6.

**Turnell, D. C., Cooper, J. D. H. 1982.** Rapid assay for amino acids serum or urine by precolumn derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *Clin. Chem.* 28 (3):527-553.

**Usseglio-Tomasset, L., Bosia P.D. 1990.** Evolution des acides aminés et des oligopeptides du moût au vin. *Bull. OIV.* 63: 21-46.

**Van Dijken, J. P., Scheffers, W. A. 1986.** Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 199-224.

**Van Uden, N. 1989.** *Alcohol toxicity in yeasts and bacteria.* Boca Raton: CRC Press.

**Van Uden, N. i Farinha, M. 1958.** On the significance of temperature relations and vitamin deficiency patterns in the delimitation of yeast species. *Portoguese Acta Biological Series.* 6: 161-171.

**Vaughan Martini, A i Martini, A. 1987.** Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie Leeuwenhock.* 53: 77.

**Vaughan-Martini, A. i Martini, A. 1993.** A taxonomic key for genus *Saccharomyces*. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 113-119.

**Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P. 1990.** Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Micro.* 136: 359-403.

- Versari, A., Parpinello, G. P. i Cattaneo, M. 1999.** *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *J. Industrial Microbiol. Biotech.* 23: 447-455.
- Versavaud, A., Dulau, L., Hallet, J.-N. 1993.** Etude écologique de la microflore levurienne spontanée du vignoble des Charantes et approche moléculaire de la diversité infraspécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Fr. Œnol.* 142: 20-28.
- Veziñhet, F., Hallet, J.-N., Valade, M., Poulard, A. 1992.** Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Am. J. Enol. Vitic.* 43 (1): 83-86.
- Vos, P. J. A., Gray, R.S. 1979.** The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must. *Am. J. Enol. Vitic.* 30(3): 187-192.
- Walker, G. M. 1998.** Yeast Metabolism. A *Yeast. Physiology and biotechnology*. Cap. 5. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. GB. 52-99.
- Walker, M. A. Liu, L. 1995.** The use of isoenzymes to identify 60 grapevine rootstocks (*Vitis spp.*). *Am. J. Enol. Vitic.* 46(3):299-305
- Walsh, R. M. i Martin, P. A. 1977.** Growth of *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator. *J. Inst. Brewing.* 83: 169-172.
- Walton, J. D., Paquin, C. E., Kaneko, K., Williamson, V. M. 1986.** Resistance to Antimycin A in yeast by amplification of *ADH4* on a linear, 42 kb palindromic plasmid. *Cell.* 46: 857-863.
- Waters, E. J., Pellerin, P., Brillouet, J.-M. 1994.** A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydr. polym.* 23: 185-191.
- Watson, K. 1987.** Temperature relations. A *The Yeast*. Vol.2. 2<sup>a</sup> edició. A. H. Rose i J. S. Harrison. (Eds.). pàgines 41-47. Academic Press Inc. London.
- Webster, D. R., Edwards, C. G., Spayd, J. C. Peterson, Seymour, B. J. 1993.** Influence of vineyard nitrogen fertilization on the concentrations of monoterpenes, higher alcohols, and esters in aged riesling wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 44(3): 275-284.
- Wermelinger, B. 1991.** Nitrogen dynamics in grapevine: Physiology and modeling. A actes *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*; 18-19 Juny 1991; Seattle, WA, USA: American Society for Enology and Viticulture. 23-31.

**White, T. J., Bruns, T., Lee, S. i Taylor, J. 1990.** PCR protocols. A guide to methods and applications. *A Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics*. Pàgines. 315-322. Editat per Innis, M. A., Gelfand, J. J., Sninsky, J. J. i White, T. J. San Diego: Academic Press.

**Wibowo, D., Eschenbruch, C. R., Fleet, G. H. i Lee, T. H. 1985.** Ocurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36(4): 302-313.

**Winkler, A. J., Cook, J. A., Kliewer W. M., Lider L. A. 1974.** General Viticulture. 2<sup>nd</sup> ed. University of California Press. Berkeley.

**Woodward, J. R., Cirillo, V. P. 1977.** Amino acid transport and metabolism in nitrogenstarved cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 130: 714-723.

**Yarrow, D., Nakase, T. 1975.** DNA base composition of species of the genus *Saccharomyces*. *Antonie Leeuwenhoek.* 41: 81-88.

**Yokotsuka, K., Aihara, T., Umehara, Y., Kushida, T. 1975.** Free amino acids and peptides in musts and wines from Japanese grapes. *J. Ferment. Technol.* 53: 631-635.

**Yokotsuka, K., Nozaki, K., Takayanagi, T. 1994.** Characterization of soluble glycoproteins in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 410-416.

**Zambonelli, C., Passarelli, P., Rainieri, S. i Giudici, P. 1993.** Taxonomic and technological implications of sterility in hybrids from cryotolerants and non-cryotolerants *Saccharomyces* strains. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia.* 43: 217-223.

**Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H. i Nury, F. S. 2001.** Análisis y producción de vino. Editorial Acribia. Zaragoza.