

# **Identificació i caracterització de llevats autòctons a la regió vitivinícola del Priorat**

---

Pol Figuerola Gatell

Dirigit per Imma Andorrà Solsona



**UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI**

Tarragona, 20 de maig de 2019

Treball Final de Grau de Biotecnologia

## Agraïments

M'agradaria començar donant les gràcies als meus pares i familiars, per la seva paciència i suport que m'han donat aquests últims mesos. Ells m'han ajudat a tirar el projecte endavant, i m'ho han posat tot més fàcil malgrat el cansament i l'estrès. Sense ells, no hauria arribat on sóc avui.

A la Gemma, que en moments difícils, m'ha fet veure sempre el costat positiu de les coses. Quan tot semblava una muntanya impossible d'escalar ella em va donar el seu escalf i suport i el camí va ser més planer.

Als amics, pels moments de descans i desconexió que hem passat quan ens hem vist.

A tot l'equip de VITEC, pel bon ambient de treball i la predisposició d'ajudar-me sempre a entendre les coses que més em costaven. I també per tots els esmorzars i dinars que hem compartit.

A l'Ari, pels seus riures que s'encomanen i el bon ambient que genera al laboratori. Però sobretot, per fer-me entendre que les coses cal veure-les amb perspectiva, i que si una cosa no arriba avui, arribarà demà.

A la Noe, per estar sempre disposada a donar-te un cop de mà quan ho necessites, i animar-te en els moments més difícils.

A la Gemma, per la seva dedicació en ajudar-me a orientar el treball aquestes últimes setmanes, fins i tot en cap de setmana! Per dir-me que "després de l'1, el 2" quan més estressat estava. I pels "bon dia!" de cada matí.

I finalment a l'Imma, una de les persona amb més paciència i dedicació que he conegut mai. Com a tutora ha estat "estupenda"! Sempre disposada a ajudar, aconsellar-te, i veure les coses des del costat més positiu que hi pugui haver, encara que tingués 50 coses més per fer. No puc fer més que donar-li les gràcies per fer-me sentir com a casa, per escoltar-me quan jo ho necessitava, i per fer que el treball sigui el que és. La dedicació d'aquestes últimes setmanes (i caps de setmana) no tenen preu. Gràcies!

## Índex

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Dades del centre .....                                                            | 2  |
| 2. Resum.....                                                                        | 3  |
| 3. Introducció .....                                                                 | 4  |
| 4. Hipòtesi i objectius.....                                                         | 8  |
| 5. Metodologia .....                                                                 | 9  |
| 5.1 Aïllament de llevats autòctons .....                                             | 9  |
| 5.2 Identificació dels llevats autòctons .....                                       | 10 |
| 5.3 Tipificació de soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                   | 12 |
| 5.4 Caracterització dels llevats a partir de fermentacions a escala laboratori ..... | 13 |
| 5.5 Anàlisi química.....                                                             | 14 |
| 5.6 Anàlisi estadística .....                                                        | 15 |
| 6. Resultats i discussió.....                                                        | 15 |
| 6.1 Microfermentacions espontànies per a aïllar llevats autòctons.....               | 15 |
| 6.2 Identificació de llevats autòctons.....                                          | 16 |
| 6.3 Tipificació de soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                   | 20 |
| 6.4 Fermentacions a escala laboratori .....                                          | 22 |
| 7. Conclusions.....                                                                  | 31 |
| 8. Bibliografia .....                                                                | 32 |
| 9. Autoavaluació.....                                                                | 36 |

## 1. Dades del centre

VITEC – Centre Tecnològic del Vi

Àrea de Microbiologia

Línia de Recerca: Microbiologia Enològica

Ctra. de Porrera, Km 1. Falset (43730). Tarragona

Tutora del Centre: Immaculada Andorrà Solsona



## 2. Resum

Actualment, són moltes les bodegues que utilitzen llevats autòctons com a eina per a la vinificació, ja que reflecteixen la identitat geogràfica del raïm en les propietats organolèptiques del vi. L'objectiu del present treball ha estat determinar la biodiversitat de llevats vínics de la Denominació d'Origen (D.O.) Montsant i Denominació d'Origen Qualificada (D.O.Q.) Priorat, així com estudiar les seves característiques fermentatives i comparar-les amb llevats comercials. Els llevats es van aïllar de la pell del raïm i en 3 punts de la fermentació alcohòlica de tres raïms diferents: garnatxa de la D.O. Montsant, carinyena de la D.O. Montsant i garnatxa de la D.O.Q. Priorat. Seguidament, es van identificar 7 espècies amb tècniques de PCR-RFLP de la regió 5.8S-ITS de l'ARN ribosomal i seqüenciació de la regió D1/D2 del gen de la subunitat 26S de l'ARN ribosomal (*Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bacillaris*, *Lachancea thermotolerans*, *Zygoascus meyeri*, *Candida californica* i *Saccharomyces cerevisiae*). També es van tipificar 7 soques diferents de *S. cerevisiae* mitjançant l'anàlisi d'elements delta. Les soques autòctones i una soca comercial de *S. cerevisiae* es van caracteritzar a nivell fermentatiu, mitjançant microfermentacions a escala laboratori, i paral·lelament es va realitzar un estudi d'imposició de les soques autòctones. S'han trobat diferències significatives pel que fa a la cinètica fermentativa de les soques autòctones, i tres es poden comparar amb la soca comercial. A nivell químic, s'han trobat diferències significatives en la producció de glicerol i diòxid de sofre, així com una tendència de major acidesa a les fermentacions dutes a terme per les soques autòctones. Per tal de descriure la microbiota autòctona de la regió vitivinícola del Priorat és necessari identificar i caracteritzar llevats autòctons de la zona durant més anyades, amb assajos a escala semi-industrial i utilitzant mostos de la varietat de raïm estudiada. Així, s'obtidrien resultats consolidats que permetrien la selecció de llevats d'interès per a la producció de vins amb característiques específiques del *terroir* de la zona.

### Paraules clau

Llevats autòctons, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentació alcohòlica, garnatxa, carinyena, D.O. Montsant, D.O.Q. Priorat.

### 3. Introducció

La comarca del Priorat és coneguda per la seva activitat i producció vitivinícola associada a la qualitat dels seus vins. Dins d'aquesta comarca s'hi inclouen dos Consells Reguladors de denominacions d'origen: Denominació d'Origen (D.O.) Montsant i Denominació d'Origen Qualificada (D.O.Q.) Priorat. Actualment, un dels temes de més interès en el món del vi és l'estudi de les poblacions microbianes autòctones de la vinya, per tal de conèixer el paper que juguen aquests microorganismes a l'hora de determinar les propietats del vi (Padilla *et al.*, 2016).

La vinificació és el procés d'elaboració de vi a partir de raïm, i en funció de si s'elaboren vins blancs, rosats o negres les etapes d'aquest procés varien. En el present estudi es treballa amb varietats negres, i en termes generals, les diferents etapes del procés de vinificació són les següents: derrapat, maceració, fermentació alcohòlica (FAL), fermentació malolàctica, premsat, criança, filtrat, envelliment i embotellat, encara que no sempre es donen totes les etapes ni segueixen el mateix ordre. Des de la perspectiva biotecnològica, el pas més interessant són les fermentacions, ja que és el moment en què els microorganismes juguen un paper clau en l'elaboració del vi.

Louis Pasteur (1822-1895) va descobrir que la fermentació del vi és un procés microbiològic complex, observant la presència de diferents tipus de microorganismes en el que els llevats són els responsables de la transformació dels sucres del most en etanol i CO<sub>2</sub> (Barnett, 2000). De fet, hi ha una gran varietat d'espècies i soques de llevats que contribueixen en la producció de metabòlits durant la FAL, anomenats metabòlits secundaris (Albergaria i Arneborg, 2016; Padilla *et al.*, 2016). Els productes presents a final de fermentació, com aromes i metabòlits, determinen les característiques organolèptiques del vi (Andorrà *et al.*, 2019).

Els compostos que conformen el perfil aromàtic dels vins es poden agrupar en 3 grups: aromes primàries, aromes secundàries i aromes terciàries. Les aromes primàries estan associades a la varietat del raïm amb el que s'ha produït el vi. Les aromes secundàries, o fermentatives, són produïdes pels llevats i bacteris durant les fermentacions. Les aromes terciàries s'originen durant la criança del vi, i depenen del tipus de fusta de la bota, entre d'altres. En funció dels llevats i bacteris que participen a la fermentació, les

aromes secundàries del vi varien, de manera que el perfil sensorial del vi es pot modular en funció dels microorganismes presents en la fermentació (Andorrà *et al.*, 2019).

*Saccharomyces cerevisiae* és el llevat que lidera la FAL en el most. Té una alta capacitat fermentativa i de resistència a condicions ambientals adverses per a la majoria de llevats, fet que li dona un avantatge competitiu respecte a altres llevats presents al raïm, anomenats no-*Saccharomyces*. En general, *S. cerevisiae* pot suportar nivells elevats d'etanol i d'àcids orgànics, pH baixos, escassetat d'oxigen i manca de determinats nutrients. A més, també és capaç de produir toxines antimicrobianes, fet que també aporta un avantatge competitiu respecte altres microorganismes (Albergaria i Arneborg, 2016). De totes maneres, no totes les soques de *S. cerevisiae* tenen les mateixes característiques. Hi poden haver soques amb cinètiques fermentatives més lentes, que tardaran més temps a acabar la FAL; també poden tenir una major o menor eficiència en la producció d'etanol, pel que el grau alcohòlic variarà; o fins i tot poden no ser capaces de fermentar en determinades condicions (Albergaria i Arneborg, 2016). En funció de les característiques que es desitgin, es podran seleccionar les soques de *S. cerevisiae* que s'ajustin més als interessos del bodeguer. Per exemple, l'ús de soques amb baixa eficiència en la producció d'etanol s'ha proposat com a solució al desajust que hi ha entre la maduresa tecnològica i la maduresa fenòlica degut al canvi climàtic (Piccardo *et al.*, 2019).

En els darrers anys, la recerca en el món vitivinícola ha anat orientada a l'ús de llevats no-*Saccharomyces* que se sap que poden millorar el procés de producció del vi o la seva qualitat. Habitualment, aquests llevats no poden dur a terme fermentacions per si sols, però sí que en alguns casos poden regular la capacitat fermentativa de *S. cerevisiae* i aportar diferents metabòlits (Jolly *et al.*, 2014). Les característiques fermentatives de molts llevats han estat estudiades, com per exemple, l'espècie *Starmella bacillaris* (antigament coneguda com *Candida zemplinina* o *Candida stellata*), que s'ha vist que està relacionada amb la producció de glicerol i d'alcohols superiors (alcohols amb més de 3 carbonis), entre d'altres propietats (Andorrà *et al.*, 2010). Un altre cas és *Hanseniaspora uvarum*, que s'associa a la producció d'èsters d'etils i àcid acètic, així com a una reducció de la cinètica fermentativa amb co-cultius amb *S. cerevisiae* (Andorrà *et*

*al.*, 2010; Jolly *et al.*, 2014). Per altra banda, *Metschnikowia pulcherrima* s'associa amb un augment de compostos volàtils com els terpens i els tiols (Sadoudi *et al.*, 2012).

Un cop es coneixen les característiques de cadascuna de les soques de *S. cerevisiae* i dels diferents llevats no-*Saccharomyces* i la seva interacció, es poden seleccionar els llevats que més interessin al productor de vi. Amb la selecció dels llevats adequats es poden modular les propietats organolèptiques del vi, obtenint perfils aromàtics més complexos per tal d'aconseguir un producte més atractiu (Andorrà *et al.*, 2010; Jolly *et al.*, 2014).

Tradicionalment, els llevats que participen en les fermentacions del vi provenen de la pell del raïm i de la pròpia bodega. Aquestes fermentacions es coneixen com a fermentacions espontànies o sense cultiu iniciador, i pràcticament la totalitat de llevats que es troben a inici de la FAL són no-*Saccharomyces*, amb una elevada diversitat a nivell d'espècie (Padilla *et al.*, 2016). En general, a les fermentacions espontànies cadascuna de les diferents espècies de no-*Saccharomyces* és reemplaçada seqüencialment per *S. cerevisiae*, de manera que el perfil poblacional del most varia a mesura que avança la FAL (Andorrà *et al.*, 2010; Padilla *et al.*, 2016). Les fermentacions espontànies tenen uns riscos associats degut principalment a la variabilitat de la població de llevats entre anyades, condicions climàtiques, tractaments de la vinya, etc. La variabilitat dels llevats pot comportar cinètiques fermentatives i producció de metabòlits diferents entre anyades, que es tradueix amb una heterogeneïtat d'un mateix vi d'anys diferents, i en el pitjor dels casos aturades de fermentació i/o producció de metabòlits relacionats amb mala qualitat del vi (Jolly *et al.*, 2014).

Tot i els riscos associats, hi ha productors de vi que segueixen duent a terme fermentacions espontànies, ja que es considera que els metabòlits aportats pels llevats autòctons confereixen característiques úniques als vins i el fan un producte diferenciat. Per altra banda, per evitar tots aquests riscos moltes bodegues practiquen la inoculació de llevats seleccionats per les seves bones capacitats fermentatives, pel que en aquest cas les fermentacions no són espontànies (Jolly *et al.*, 2014).

Actualment, la pràctica més habitual per iniciar les fermentacions és la inoculació de llevats comercials. Aquests llevats són inoculats al most, i es caracteritzen per la seva alta capacitat fermentativa, de manera que eviten aturades de fermentació i assegurin

fermentacions homogènies entre anyades (Capozzi *et al.*, 2015). La finalitat d'inocular llevats comercials és que s'imposin als llevats autòctons presents en el most. Encara que la soca comercial s'imposi, els llevats autòctons seguiran creixent en menor mesura, de manera que podran seguir aportant metabòlits secundaris en menys quantitats i durant menys temps.

Des de la perspectiva sensorial, la pràctica d'inoculacions amb llevats seleccionats té aspectes positius, com per exemple la reducció d'aromes no desitjades aportades per determinats llevats autòctons. De la mateixa manera, també redueixen certes aromes desitjades i distintives aportades per altres llevats autòctons (Jolly *et al.*, 2014). Així doncs, l'ús de llevats comercials provoca que els vins acostumin a manca de les propietats organolèptiques distintives que aporten els llevats autòctons de la regió i que els vins presentin un caràcter homogeneïtzador (Padilla *et al.*, 2016).

El concepte *terroir* fa referència a la relació que hi pot haver entre les característiques d'un vi i les condicions ambientals que es donen a la vinya; en altres paraules, una identitat geogràfica. D'entre aquestes condicions hi ha el clima, el sòl, la varietat de raïm, entre d'altres. Es creu que aquestes condicions defineixen la diversitat de la població microbiana autòctona de la vinya i del raïm, de manera que hi poden haver espècies i/o soques úniques que només es trobin a una regió concreta (Padilla *et al.*, 2016). Per tant, la identitat geogràfica ve definida, entre altres paràmetres, per la població autòctona de llevats.

Molts estudis recents se centren en la identificació de llevats autòctons i la caracterització de les seves capacitats fermentatives individuals i en co-cultius. Amb la informació d'aquests assajos, el productor del vi pot realitzar una selecció de les espècies i/o soques que siguin del seu interès, ja sigui per les seves capacitats fermentatives com pels compostos que puguin produir. D'aquesta manera, es poden utilitzar els llevats autòctons de la regió sense els riscos associats a les fermentacions espontànies. La finalitat d'aquests estudis és poder reproduir, amb elevada fiabilitat, a escala industrial les característiques organolèptiques aportades pels microorganismes autòctons, i per tant les característiques que defineixen una regió vitivinícola concreta (Jolly *et al.*, 2014; Capozzi *et al.*, 2015; Padilla *et al.*, 2016).

A la regió vinícola del Priorat, s'han realitzat diversos estudis relacionats amb la identificació, caracterització i selecció de llevats autòctons per a la producció de vins amb propietats organolèptiques típiques de la regió (Torija *et al.*, 2001; Padilla *et al.*, 2016, 2017). Malgrat això, més estudis amb diferents varietats de raïm, anyades i condicions són necessaris per entendre millor la diversitat microbiològica d'aquesta regió.

El present estudi s'emmarca dins del PECT (Projecte d'Especialització i Competitivitat Territorial) "Priorat-Montsant-Siurana", iniciat l'any 2018. Al PECT, VITEC s'encarrega de l'apartat de preservació de la biodiversitat vitivinícola del Priorat. Un dels objectius d'aquest apartat és aïllar, identificar i caracteritzar llevats autòctons de la zona vitivinícola del Priorat. Amb la meua incorporació a VITEC el projecte ja havia començat, pel que processos previs a la identificació de llevats ja havien estat iniciats pel personal de l'àrea de microbiologia (microvinificacions espontànies i aïllament de llevats en medi YPDA).

#### 4. Hipòtesi i objectius

La hipòtesi de treball és que els llevats autòctons de la D.O. Montsant i la D.O.Q. Priorat presenten aptituds fermentatives comparables a soques comercials.

Per aquest motiu, l'objectiu principal d'aquest treball és estudiar els llevats de diferents varietats de raïm de la regió del Priorat, concretament garnatxa i carinyena de la D.O. Montsant i garnatxa de la D.O.Q. Priorat. Els objectius específics són els següents:

- Identificació de llevats a nivell d'espècie aïllats a partir de la pell del raïm i de la FAL espontània de les varietats estudiades.
- Definició de l'evolució del perfil poblacional de llevats durant la FAL espontània en les varietats estudiades.
- Tipificació de soques de l'espècie *S. cerevisiae* aïllades a partir de la pell del raïm i a la FAL espontània de les varietats estudiades.
- Caracterització de les capacitats fermentatives de les diferents soques de llevats aïllats a partir de la pell del raïm i a la FAL espontània de les varietats estudiades.

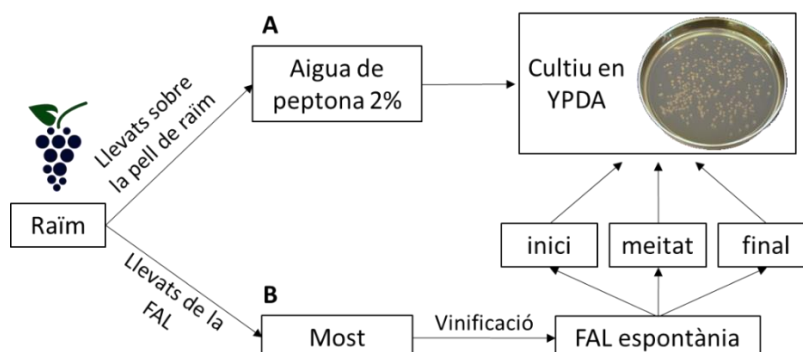
## 5. Metodologia

### 5.1 Aïllament de llevats autòctons

En el present estudi es van aïllar llevats procedents de les varietats de raïm garnatxa de la D.O. Montsant (d'ara en endavant, Montsant Garnatxa), carinyena de la D.O. Montsant (Montsant Carinyena) i garnatxa de la D.O.Q. Priorat (Priorat Garnatxa), a partir de la pell del raïm i durant la FAL espontània.

Per a l'obtenció de llevats autòctons de la superfície de la pell del raïm, es van seleccionar 50 grans de cada varietat de raïm i es van posar en bosses asèptiques per evitar possibles contaminacions. Al laboratori, es van posar en una solució de 200 ml d'aigua de peptona al 2% en un Erlenmeyer de 500 ml, i es van deixar en agitació a 165 revolucions per minut (rpm) durant tres hores (**Figura 1.A**). Seguidament, es van fer diferents dilucions de l'aigua de peptona i es va sembrar en medi YPDA (*Yeast Extract-Peptone-Dextrose Agar*) (2% glucosa, 2% peptona, 1% extracte de llevat i 2% agar).

Per a l'obtenció de llevats autòctons a diferents punts de la FAL espontània, es van realitzar fermentacions espontànies sense inocular cap llevat, a una temperatura de 25 °C. Primer, es van pressionar els grans de raïm recol·lectats en bosses asèptiques per tal d'obtenir un most per a cada varietat. Seguidament, es van vinificar 200 ml de cada most en Erlenmeyers de 500 ml. Es van seguir les fermentacions per pèrdua de densitat, amb el densímetre Densito™ 30PX, i recompte de llevats totals i viables, mitjançant càmera de recompte Thoma® al microscopi òptic i sembra en YPDA, respectivament. Es van aïllar llevats a 3 punts de fermentació: inici, meitat i final de la FAL (**Figura 1.B**).



**Figura 1:** flux de treball per a la obtenció de llevats autòctons sobre la pell del raïm i de la Fermentació Alcohòlica (FAL) espontània.

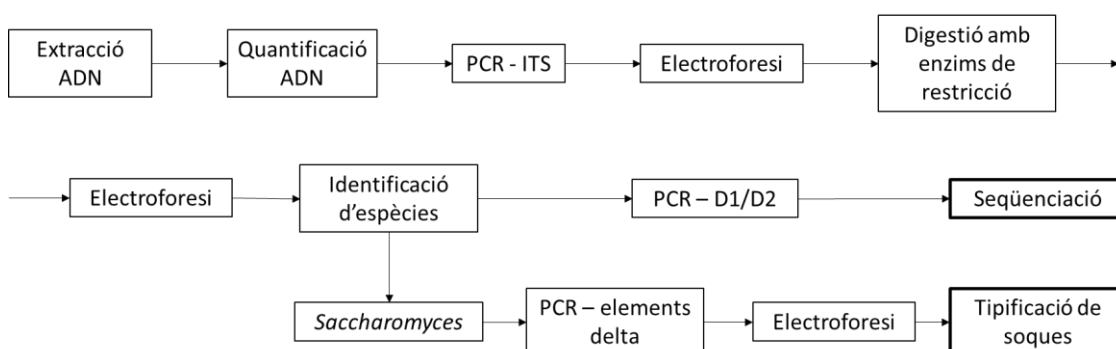
Els cultius en medi YPDA s'incubaven durant 24-48 h a 28 °C per tal d'obtenir colònies diferenciades. Es van aïllar 24 colònies de cada placa, tant de llevats aïllats a la pell del raïm com dels tres punts de la FAL. Per tant, amb 3 varietats de raïm, 4 punts de mostreig per a cadascuna i 24 colònies per a cada punt, el disseny d'estudi comptava amb un total de 288 colònies de llevats aïllats.

Cada colònia aïllada es va fer créixer en medi YPD líquid durant 24h a 28°C i en agitació de 120 rpm. Transcorregut el període d'incubació, es van extreure dues alíquotes de cada cultiu: s'extreien 900 µl i es centrifugaven a 12.000 rpm durant 10 minuts, guardant el *pellet* per a la posterior extracció d'ADN; de l'altra, es barrejaven 900 µl de mostra amb 500 µl de glicerol (proporció 1/3) i es guardava al congelador per a preservar la mostra.

La verema de les varietats de garnatxa i carinyena al Priorat se sol realitzar al mes de setembre, però sempre tenint en compte variants com l'anyada, condicions climàtiques, maduresa fenòlica, etc. En el present treball, el raïm d'estudi va ser veremat el novembre del 2018, considerant-se una verema tardana. Conseqüentment, el raïm contenia elevats nivells de sucres degut a la seva maduresa. L'equip del departament de microbiologia de VITEC es va encarregar d'aïllar les mostres comentades.

## 5.2 Identificació dels llevats autòctons

El flux de treball per a la identificació de llevats s'exposa a la **Figura 2**.



**Figura 2:** flux de treball per a la identificació de llevats a nivell d'espècie i tipificació de soques de *Saccharomyces cerevisiae*.

En primer lloc, es va aïllar l'ADN partint del *pellet* que s'havia guardat anteriorment i seguint el protocol descrit per Querol *et al.* (1992), i posteriorment, es va quantificar i analitzar la seva puresa amb l'espectrofotòmetre Biodrop  $\mu$ Lite® (Isogen Life Science, Barcelona). La concentració s'ajustava a 1-50  $\mu$ g/ml (Guillamón *et al.*, 1998).

Es va realitzar una PCR-RFLP (Polimorfisme de Longitud del Fragment de Restricció) de la regió 5.8S-ITS de l'ARN ribosomal amb el termociclador T100™ de Bio-Rad *Laboratories* (Hèrcules, Califòrnia, EUA). El fragment amplificat conté les regions ITS1, 5.8S ARN ribosomal i ITS2. Els encebadors utilitzats van ser l'ITS1 [0,2  $\mu$ M] (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') i l'ITS4 [0,2  $\mu$ M] (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La *mix* per a la PCR contenia *Reaction Buffer* 1 X,  $MgCl_2$  [3 mM], encebador ITS1 [0,2  $\mu$ M], encebador ITS4 [0,2  $\mu$ M], dNTPs [0,8 mM] i Taq Polimerasa [0,01 U/ $\mu$ l] (*Bioline*, Londres, Regne Unit). Els cicles de temperatura de la PCR eren els següents: desnaturalització inicial a 95 °C durant 5 minuts, seguit de 40 cicles de desnaturalització a 95 °C durant 30 segons, hibridació a 52 °C durant 1 minut i extensió a 72 °C durant 1 minut, amb una extensió final a 72 °C durant 7 minuts.

Els productes de l'amplificació de la PCR van ser visualitzats emprant una electroforesi en un gel d'agarosa (1,6 %) dissolt en tampó TBE 1X (Tris 0,089 M; Àcid Bòric 0,089 M; EDTA 0,002 M, pH 8) i RedSafe™ *Nucleic Acid Staining Solution* (20.000 X) (Labotaq, Sevilla, Espanya) com a agent intercalant de l'ADN. Es va utilitzar el marcador de pes molecular HyperLadder™ 100 pb (parells de bases) (*Bioline*, Londres, Regne Unit). Els gels es van visualitzar amb el transil·luminador Gel Doc™ XR de Bio-Rad *Laboratories* (Hèrcules, Califòrnia, EUA). En funció de la longitud dels fragments obtinguts en pb, es decidia amb quin o quins enzim/s es realitzava la digestió, tenint en compte l'estudi d'Esteve-Zarzoso *et al.* (1999).

Les digestions es duen a terme amb els següents enzims de restricció: *Hinfl*, *DdeI* i *HaeIII* (*ThermoFisher Scientific*, Massachusetts, EUA). La *mix* per a la digestió contenia l'enzim de restricció [0,1 U/ $\mu$ l] i tampó de reacció 1 X. La *mix* es barrejava amb el producte de la PCR (ADN amplificat) i es deixava a 37 °C, *overnight*. Seguidament, es realitzava una electroforesi en gel d'agarosa per visualitzar els fragments resultants de la digestió. El gel es preparava tal com s'explica al paràgraf anterior, però canviant el percentatge

d'agarosa al 3 %. Prenent com a referència l'estudi d'Esteve-Zarzoso *et al.* (1999), es poden identificar les espècies de llevat estudiades a partir del pes molecular de les bandes obtingudes en l'amplificació i digestió amb els diferents enzims de restricció.

Per tal de corroborar la identificació d'espècies de llevats, es va realitzar la seqüenciació del domini D1/D2 de l'ADN, que codifica per la subunitat 26S de l'ARN ribosomal (Kurtzman i Robnett, 1998). Per a tal fi, es va amplificar l'ADN per PCR amb els encebadors NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') i NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). La *mix* de la PCR contenia *Reaction Buffer* 1 X, MgCl<sub>2</sub> [2,5 mM], encebador NL1 [0,2 µM], encebador NL4 [0,2 µM], dNTPs [0,8 mM] i Taq Polimerasa [0,05 U/µl] (*Bioline*, Londres, Regne Unit). Els cicles de temperatura de la PCR eren els següents: desnaturalització inicial a 95 °C durant 3 minuts, seguit de 36 cicles de desnaturalització a 95 °C durant 1 minut, unió dels encebadors a 52 °C durant 2 minuts i extensió a 72 °C durant 2 minuts, amb una extensió final a 72 °C durant 5 minuts. El producte obtingut es va enviar a l'empresa MacroGen (Madrid), en la que es va seqüenciar l'ADN. Per a identificar les espècies a les que pertanyien les seqüències, es va comparar amb la base de dades del *GenBank* mitjançant el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), una eina de l'NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) que compara seqüències per alineaments.

### 5.3 Tipificació de soques de *Saccharomyces cerevisiae*

En el cas d'identificar llevats de l'espècie *S. cerevisiae*, es va realitzar una tipificació de les soques per tal d'estudiar-ne la seva diversitat. Per a tal objectiu, es realitzava una PCR amb els encebadors Delta12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') i Delta21 (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'), per amplificar les regions inter-delta (o elements delta), unes seqüències típiques de *S. cerevisiae*, seguint el protocol descrit per Legras i Karst (2003). La *mix* de PCR es va preparar amb *Reaction Buffer* 1 X, MgCl<sub>2</sub> [2,5 mM], encebador Delta12 [1 µM], encebador Delta21 [1 µM], dNTPs [0,2 mM], Taq Polimerasa [0,02 U/µL] i BSA [0,20 mg/ml] (*Bioline*, Londres, Regne Unit). Els cicles de temperatura eren els següents: desnaturalització inicial a 95 °C durant 4 minuts, seguit de 35 cicles de desnaturalització a 95 °C durant 30 segons, hibridació a 46 °C durant 30 segons i extensió a 72 °C durant 1,5 minuts, amb una extensió final a 72 °C durant 10 minuts. Per tal de visualitzar i comparar els diferents perfils de bandes de cada soca de *S. cerevisiae*,

es realitzava una electroforesi en un gel d'agarosa amb els productes de la PCR, seguint el procediment descrit anteriorment. El percentatge d'agarosa era de l'1,6 % i el marcador de pes molecular era l'HyperLadder™ 1Kb (kilo base) (*Bioline*, Londres, Regne Unit).

#### 5.4 Caracterització dels llevats a partir de fermentacions a escala laboratori

Es van estudiar les capacitats fermentatives de 7 soques de *S. cerevisiae* (S1-7) del raïm Priorat Garnatxa amb un total de 27 microfermentacions realitzades a escala laboratori. Per una banda, es van preparar monocultius de cada soca per separat i per triplicat (21 microfermentacions); per altra banda, es va realitzar un cultiu mixt amb les 7 soques per estudiar la capacitat d'imposició de cadascuna, també per triplicat (3 microfermentacions). Per comparar els resultats amb una soca comercial, es va realitzar un monocultiu per triplicat d'una soca anomenada "A" (3 microfermentacions). L'objectiu de realitzar triplicats per a cada microfermentació era poder detectar resultats erronis i descartar punts si era necessari. Les fermentacions es van realitzar amb un most procedent de la verema del 2018 d'una altra varietat de raïm. Aquest havia estat guardat a 0 °C .

Per tal de simular les condicions d'un most de Priorat Garnatxa, es van analitzar els paràmetres químics inicials del most d'estudi, tal com s'especifica a l'apartat d'Anàlisi Química. Un dels paràmetres analitzats va ser el nivell de sucres totals (D-glucosa i D-fructosa) per tal de determinar el Grau Alcohòlic Probable (GAP). Degut a que els mostos del Priorat tenen una concentració de sucres elevada, es va augmentar la concentració de sucres per simular les condicions del most de la zona, i així obtenir un GAP més alt, del 15,5 % (v/v) (Portillo *et al.*, 2016). El most va ser esterilitzat amb un agent anomenat Velcorin® (dimetil dicarbonat), per evitar contaminacions externes a l'inòcul disminuint la càrrega microbiana d'aquest.

Les microfermentacions a escala laboratori es van realitzar amb 200 ml de most en un Erlenmeyer de 500 ml, i a una temperatura controlada de 25 °C i sense agitació. La concentració del cultiu iniciador era de  $2 \times 10^6$  cèl·lules/ml per a cada soca. Per a la inoculació massiva, la concentració del cultiu iniciador era de  $2,1 \times 10^6$  cèl·lules/ml en total,  $3 \times 10^5$  cèl·lules/ml per a cadascuna de les 7 soques inoculades.

El seguiment de les microfermentacions es va fer per pèrdua de densitat del most, recompte de cèl·lules totals al microscopi i recompte de cèl·lules viables en medi YPDA. En el moment en que la densitat va ser inferior a 1000 g/l, es van mesurar els nivells de sucres per determinar quan acabava la fermentació. Les fermentacions es van considerar finalitzades quan els nivells de sucres residuals eren inferiors a 1 g/l.

En el cas de l'estudi d'imposició en el cultiu mixt, es van aïllar 24 colònies de l'últim punt (final FAL) de recompte de viables i es va realitzar una tipificació de les colònies: extracció de l'ADN, PCR d'elements delta i electroforesi en gel d'agarosa per comparar perfils de les diferents soques amb els protocols detallats anteriorment.

### 5.5 Anàlisi química

L'anàlisi inicial del most comprenia els següents paràmetres: grau Brix, GAP, sucres totals (D-glucosa i D-Fructosa), densitat, PAN (Nitrogen Amínic Primari), amoni ( $\text{NH}_4^+$ ), NFA (Nitrogen Fàcilment Assimilable), pH, glicerol, ATT (Acidesa Total Tartàrica), àcid acètic, acidesa volàtil, àcid tartàric, àcid L-màlic, sulfurós lliure i sulfurós total.

Al final de la FAL de cadascuna de les rèpliques, es van analitzar els següents paràmetres: sucres residuals (D-glucosa i D-Fructosa), densitat, grau alcohòlic, pH, glicerol, ATT, acidesa volàtil, àcid L-màlic, àcid L-làctic, sulfurós lliure i sulfurós total.

Els sucres, el PAN, l'amoni, el glicerol, els àcids i els sulfits es van mesurar a partir de mètodes enzimàtics o colorimètrics amb un analitzador automàtic (*Random Access Analyzer Y15*) amb els corresponents kits enzimàtics (BioSystems S.A., Barcelona, Espanya). La densitat es va mesurar amb un densímetre Densito™ 30PX (Mettler Toledo, Columbus, EUA). El NFA es va calcular a partir dels valors obtinguts del PAN i de l'amoni amb la següent fórmula:  $\text{NFA} = (\text{amoni} \times 0,78) + \text{PAN}$ . El grau Brix, grau alcohòlic, pH, ATT i acidesa volàtil es van determinar mitjançant espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR) amb un equip *WineScan FT120* (Foss Elèctric, Barcelona, Espanya). A partir del grau Brix es va calcular el GAP

Totes aquestes anàlisis es van realitzar seguint el protocol establert per la OIV (2019) en el *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*.

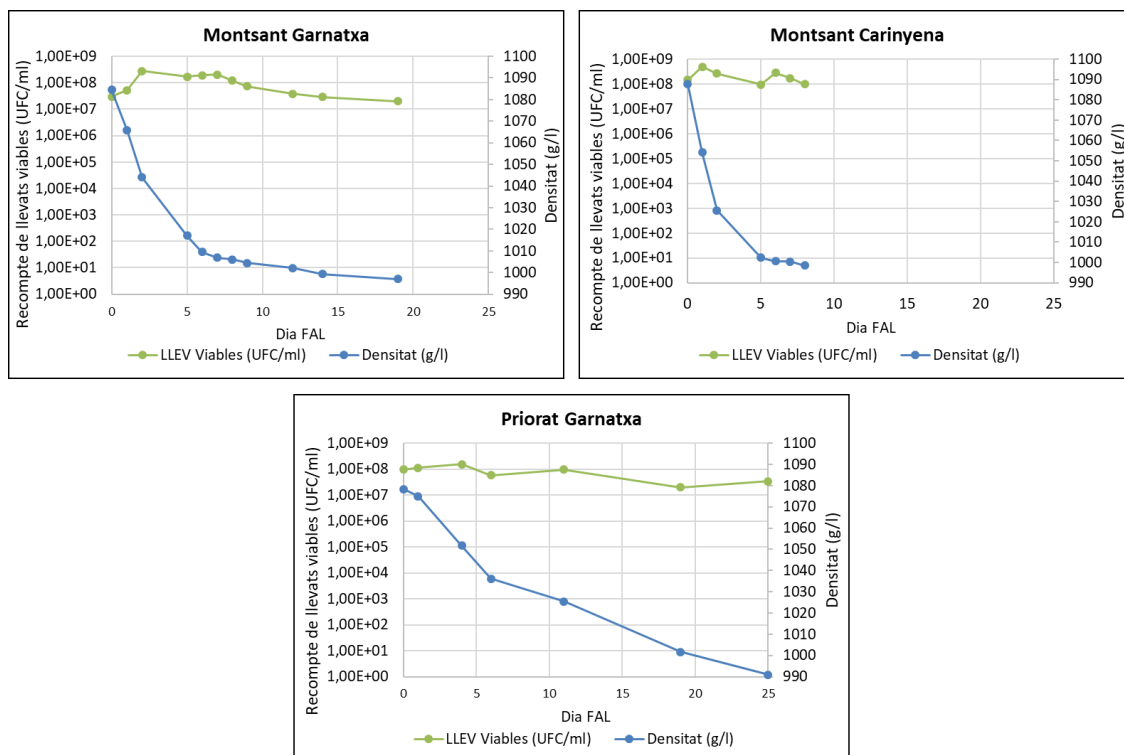
## 5.6 Anàlisi estadística

Les diferències significatives es van determinar mitjançant l'anàlisi unidireccional de variància (ANOVA) utilitzant el test *Tukey* (HSD) amb el paquet XLSTAT del programa d'Excel. L'interval de confiança es va establir al 95 % ( $p \leq 0,05$ ).

## 6. Resultats i discussió

### 6.1 Microfermentacions espontànies per a aïllar llevats autòctons

El seguiment de les FAL espontànies per pèrdua de densitat i recompte de llevats viables es mostra a la **Figura 3**. A mesura que els llevats creixen i la població augmenta, els nivells de sucres disminueixen, i la densitat del most també ho fa. En un inici, existeix una fase de latència, en la que els llevats no creixen perquè s'adapten a l'ambient i per tant, no hi ha consum significatiu de sucres i la densitat varia poc. Al gràfic de Priorat Garnatxa de la **Figura 3** es pot intuir aquesta fase entre el primer i el segon punt, malgrat no és clara del tot. Seguidament, a la fase de creixement exponencial els llevats es divideixen a ritme elevat i consumeixen grans quantitats de sucres. La fase exponencial s'identifica als dos gràfics de Montsant en el moment en què la densitat disminueix de manera més significativa. Després, els llevats arriben a la fase estacionària, en la que la població total no augmenta, i per tant el consum de sucres és limitat i la densitat s'estabilitza. La fase estacionària s'observa als gràfics Montsant Garnatxa i Montsant Carinyena, quan la densitat no varia significativament al llarg dels dies. Finalment, els llevats moren per falta de substrat i la població disminueix. Així doncs, els gràfics de la **Figura 3** reflecteixen que l'evolució de la FAL espontània va ser l'esperada, excepte en el cas de Priorat Garnatxa, en què la densitat va disminuir de manera lenta i en cap moment es podia distingir un consum elevat de sucres (fase exponencial), ni una estabilització de la densitat (fase estacionària).



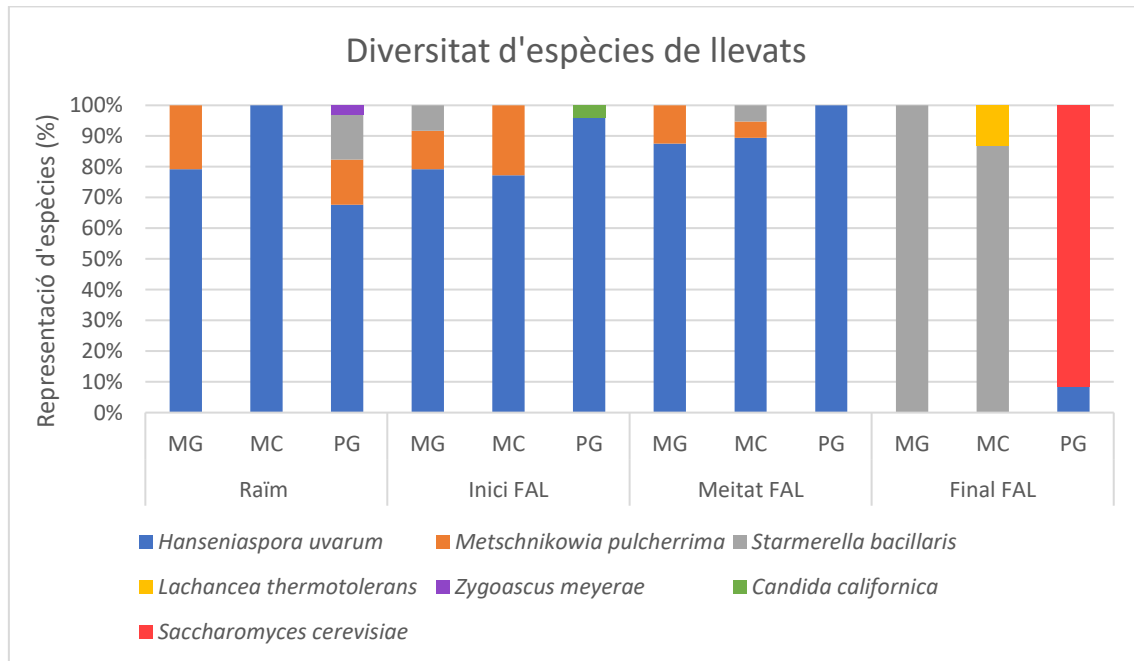
**Figura 3:** seguiment de les Fermentacions Alcohòliques (FAL) espontànies en els diferents raïms estudiats, per densitat (g/l) i recompte de llevats viables (LLEV Viables). UFC: Unitats Formadores de Colònia.

Els llevats autòctons es van aïllar en tres punts de la FAL: inici (dia 0 per a totes les varietats), meitat (dia 2 per a Montsant Garnatxa, dia 1 per a Montsant Carinyena i dia 4 per a Priorat Garnatxa) i final (dia 14 per a Montsant Garnatxa, dia 7 per a Montsant Carinyena i dia 25 per a Priorat Garnatxa). El criteri per determinar quan es considerava meitat i final de fermentació va ser la densitat del most. La densitat inicial dels mostos va ser d'entre 1078-1088 g/l. A partir d'aquest valor, la meitat de la FAL es va determinar a una densitat de 1040-1060 g/l, moment en què ja s'havien consumit sucres. El final de la FAL es va determinar quan la densitat va ser inferior a 1000 g/l, moment en què la FAL ja avançava més lentament (Padilla *et al.*, 2016). Diversos estudis demostren que per sota d'una densitat de 1000 g/l, els sucres són inferiors a 4 g/l (Balikci *et al.*, 2016).

## 6.2 Identificació de llevats autòctons

En el present estudi es van identificar 7 espècies de llevats diferents (**Figura 4**). Al raïm Montsant Garnatxa es van identificar 3 espècies de llevats: *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima* i *Starmerella bacillaris*. Al raïm Montsant Carinyena, es van identificar 4 espècies de llevats: *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bacillaris* i *Lachancea thermotolerans*. Finalment, al raïm Priorat Garnatxa,

es van identificar 6 espècies de llevats: *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bacillaris*, *Zygoascus meyeri*, *Candida californica* i *Saccharomyces cerevisiae*. Cal tenir en compte que es van analitzar 24 colònies aleatòries per a cada punt de mostreig, pel que aquests resultats s'han d'interpretar com una mostra homogènia i al mateix temps representativa de la diversitat de llevats que es trobaria al camp.



**Figura 4:** biodiversitat d'espècies de llevats en cada un dels raïms estudiats: Montsant Garnatxa (MG), Montsant Carinyena (MC) i Priorat Garnatxa (PG); en la pell del raïm i durant tres estadis de la Fermentació Alcohòlica (FAL): inici, meitat i final.

Al raïm Montsant Garnatxa s'ha observat que *H. uvarum* va ser l'espècie més abundant a la pell del raïm, tant a inici com a meitat de la FAL, i *M. pulcherrima* (forma anamorfa *Candida pulcherrima*) també va ser identificada en aquests estadis. Els resultats són comparables amb estudis realitzats en raïms de la D.O.Q. Priorat que afirmen que els llevats predominants a les primeres etapes de la FAL espontània són de gèneres no-*Saccharomyces* (Torija *et al.*, 2001), d'entre els quals els més presents són llevats del gènere *Hanseniaspora* i *Candida* (Padilla *et al.*, 2016). La presència de *S. bacillaris* (antigament *Candida zemplinina* o *Candida stellata*) a inici de la FAL concorda amb els estudis anomenats anteriorment, malgrat que és la menys abundant. *S. bacillaris* va ser l'únic llevat identificat a final de la FAL. A l'estudi d'Andorrà *et al.* (2010) també s'havia aïllat aquesta espècie a final de la FAL, juntament amb *S. cerevisiae*. Malgrat això, en el

present estudi no es va aïllar *S. cerevisiae* a final de la FAL. De fet, els resultats esperats eren aïllar *S. cerevisiae* a meitat de la FAL, amb una presència moderada, i a final de la FAL, com a espècie dominant. En diversos estudis s'ha demostrat que *S. cerevisiae* té molt poca presència en la població total de llevats a la pell del raïm i a inici de la FAL, i que la seva presència augmenta a mesura que avança la FAL, ja que és el llevat que es considera amb més capacitats fermentatives, tolerància d'alcohol i imposició, entre d'altres (Jolly *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2016; Albergaria i Arneborg, 2016).

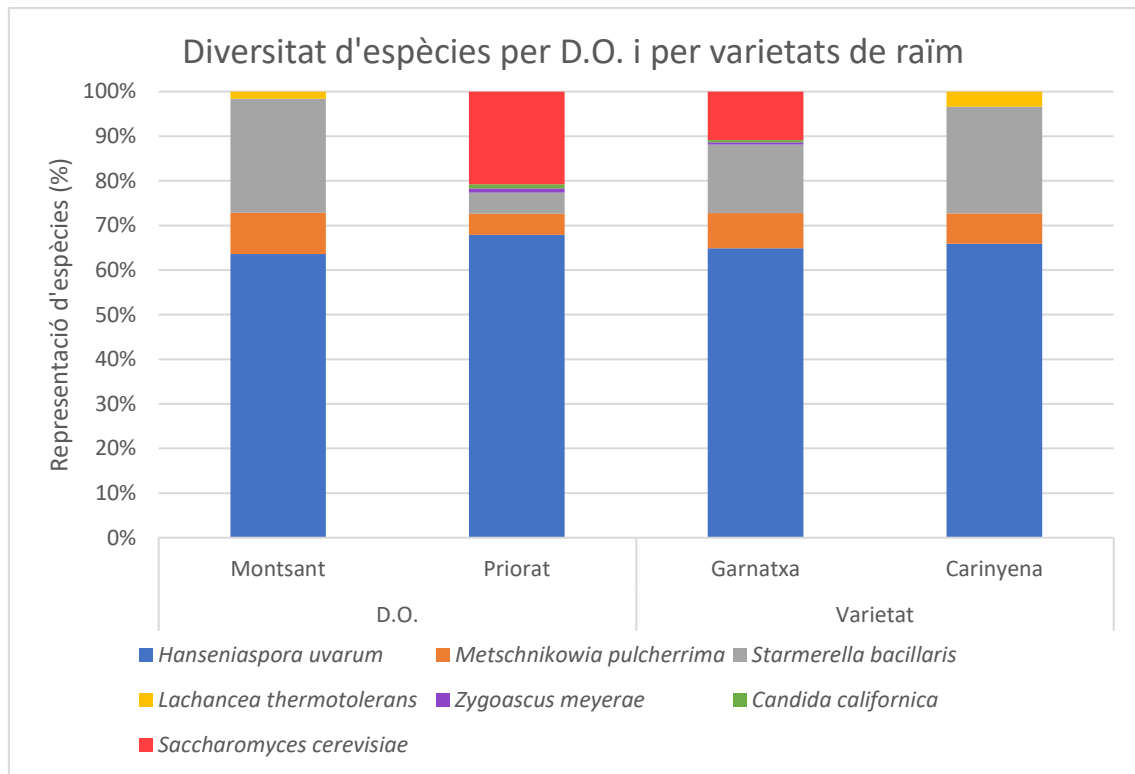
Per al raïm Montsant Carinyena es van obtenir uns resultats similars als de Montsant Garnatxa. L'espècie *H. uvarum* va ser l'única identificada a la pell del raïm i la més abundant als estadis inicials de la FAL. A mesura que la FAL anava avançant es van identificar més espècies, fet que coincideix amb els estudis que confirmen que a mesura que avança la FAL hi ha una successió seqüencial de les espècies de llevats (Jolly *et al.*, 2014). A inici de la FAL es va identificar *M. pulcherrima*, a més de *H. uvarum*. A meitat de la FAL, a més de les dues anteriors, es va identificar *S. bacillaris*. A final de la FAL només es va aïllar *S. bacillaris*, que es va imposar a les dues espècies anteriors, i *L. thermotolerans*, present amb menys abundància. Tots els llevats identificats ja havien estat descrits anteriorment per Padilla *et al.* (2016) en un estudi de llevats autòctons de raïms de la D.O.Q. Priorat, però amb la diferència que tots ells havien estat identificats preferentment als estadis inicials de la FAL. Com en el raïm Montsant Garnatxa, cal destacar l'absència de l'espècie *S. cerevisiae*.

Finalment, el raïm Priorat Garnatxa va ser del que es van aïllar i identificar més espècies. A la pell del raïm es van identificar *H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *S. bacillaris* i *Z. meyeræ*, la primera amb major abundància. Les 3 primeres espècies coincideixen amb espècies descrites a l'estudi de Padilla *et al.* (2016), mentre que *Z. meyeræ* també havia estat descrita en estudis d'altres regions vinícoles per Jolly *et al.* (2014). Durant la vinificació, la presència de *H. uvarum* anava augmentant, de manera que a inici de la FAL es va detectar juntament amb *C. californica* i a meitat de la FAL va ser l'única espècie aïllada. Aquests resultats concorden amb la presència destacable de *H. uvarum* als primers estadis de la FAL, que ja s'havien descrit en altres estudis fets en raïms de la D.O.Q. Priorat (Torija *et al.*, 2001; Padilla *et al.*, 2016). Referent a *C. californica* s'havia identificat en estudis amb raïms amb alts continguts de sucres (Rantsiou *et al.*, 2013), de manera

que els resultats del present estudi coincideixen amb la bibliografia. Com en Montsant Garnatxa i Montsant Carinyena, a final de la FAL el perfil d'espècies de llevats va canviar significativament, malgrat que en Priorat Garnatxa hi havia la presència de *H. uvarum*. En aquest cas, l'espècie que es va identificar majoritàriament va ser *S. cerevisiae* fet que concorda amb l'aparició de *S. cerevisiae* i reemplaçament d'espècies no-*Saccharomyces* a final de FAL descrit en diferents estudis (Torija *et al.*, 2001; Jolly *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2016).

Cal destacar que l'espècie *S. cerevisiae* només es va aïllar en un dels punts de mostreig, dels 12 que hi havia en total. Una possible explicació podria ser que la baixa o inexistent presència de *S. cerevisiae* al raïm provoca que en alguns casos no hi arribi a haver un creixement ni domini de la FAL per part d'aquesta espècie. Hi ha estudis que expressen que *S. cerevisiae* pot provenir tant de la vinya i raïm com de la bodega, i que aquestes últimes poden tenir millors capacitats fermentatives en alguns casos (Valero *et al.*, 2007). En els casos de poblacions insuficients de *S. cerevisiae*, les soques provinents de la bodega juguen un paper important per liderar la FAL (Le Jeune *et al.*, 2006). Cap dels mostos estudiats va estar en contacte amb la bodega. Així doncs, el fet que *S. cerevisiae* no s'arribés a implantar podria ser degut a una baixa població o a una insuficient capacitat fermentativa de *S. cerevisiae*.

Seguidament s'observa una comparativa del total d'espècies de llevats aïllades i identificades de la pell del raïm i dels tres punts de FAL en funció de la regió (D.O.) i en funció de la varietat de raïm (**Figura 5**).



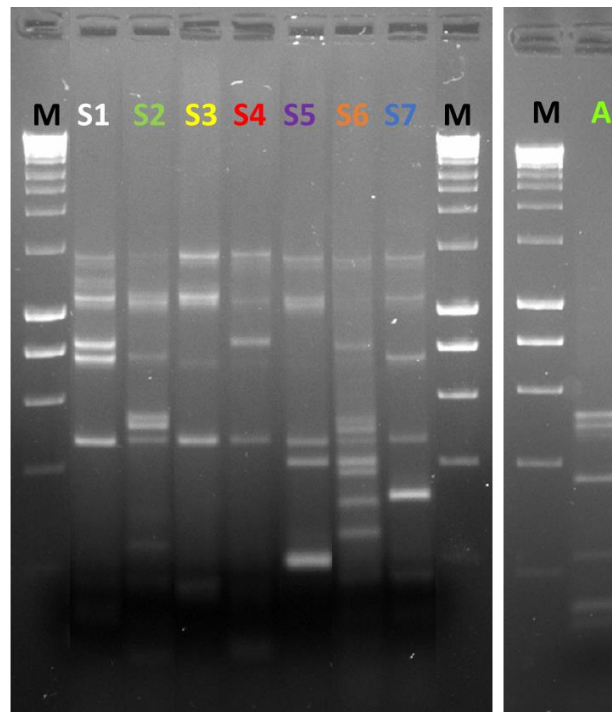
**Figura 5:** diversitat d'espècies per Denominació d'Origen (D.O.) (o D.O.Q. en el cas de Priorat) i per varietats de raïm. D.O. Montsant, número de colònies identificades (n)=184; D.O.Q. Priorat, n=106; Garnatxa, n=202; Carinyena, n=88.

Les espècies *H. uvarum* i *M. pulcherrima* es trobaven en proporcions similars tant en la D.O. Montsant com en la D.O.Q. Priorat, i com en les varietats garnatxa i carinyena. L'espècie *S. bacillaris* també es va trobar en ambdues regions i varietats, tot i que les proporcions van ser diferents. Pel que fa a *L. thermotolerans* només es va trobar a la D.O. Montsant i a la varietat Carinyena, mentre que *Z. meyeriae* i *C. californica* només es va identificar a la D.O.Q. Priorat i a la varietat garnatxa. Encara que *L. thermotolerans*, *Z. meyeriae* i *C. californica* s'han detectat a altres regions vitivinícoles del món, aquestes soques podrien ser un tret distintiu de la D.O.Q. Priorat respecte la D.O. Montsant, i al revés. Finalment, l'absència de *S. cerevisiae* a la D.O. Montsant és un fet destacable.

### 6.3 Tipificació de soques de *Saccharomyces cerevisiae*

L'anàlisi de la diversitat de soques de l'espècie *S. cerevisiae* només es va realitzar en llevats aïllats al final de la FAL de Priorat Garnatxa, ja que va ser l'únic cas en el que es va aïllar aquesta espècie. En l'electroforesi dels productes de la PCR d'elements delta, es van poder observar fins a 7 perfils diferents de soques *S. cerevisiae* (S1-7), i es va comprovar que cap coincidia amb el perfil de bandes de la soca comercial estudiada, tal

i com es presenta a la **Figura 6**. Les proporcions de cadascuna de les soques de *S. cerevisiae* van ser les següents, en percentatge: S1: 4,5 %; S2: 27,3 %; S3: 22,7 %; S4: 27,3 %; S5: 4,5 %; S6: 4,5 %; S7: 9,1 %.



**Figura 6:** fotografia d'un gel d'electroforesi en el que es poden veure els diferents perfils de bandes corresponents als elements delta de *Saccharomyces cerevisiae* amplificats per PCR. S1-7: soques de *S. cerevisiae* autòctones; "A": soca de *S. cerevisiae* comercial. M: marcador de pes molecular HyperLadder™ 1kb (Bioline, Londres, Regne Unit).

## 6.4 Fermentacions a escala laboratori

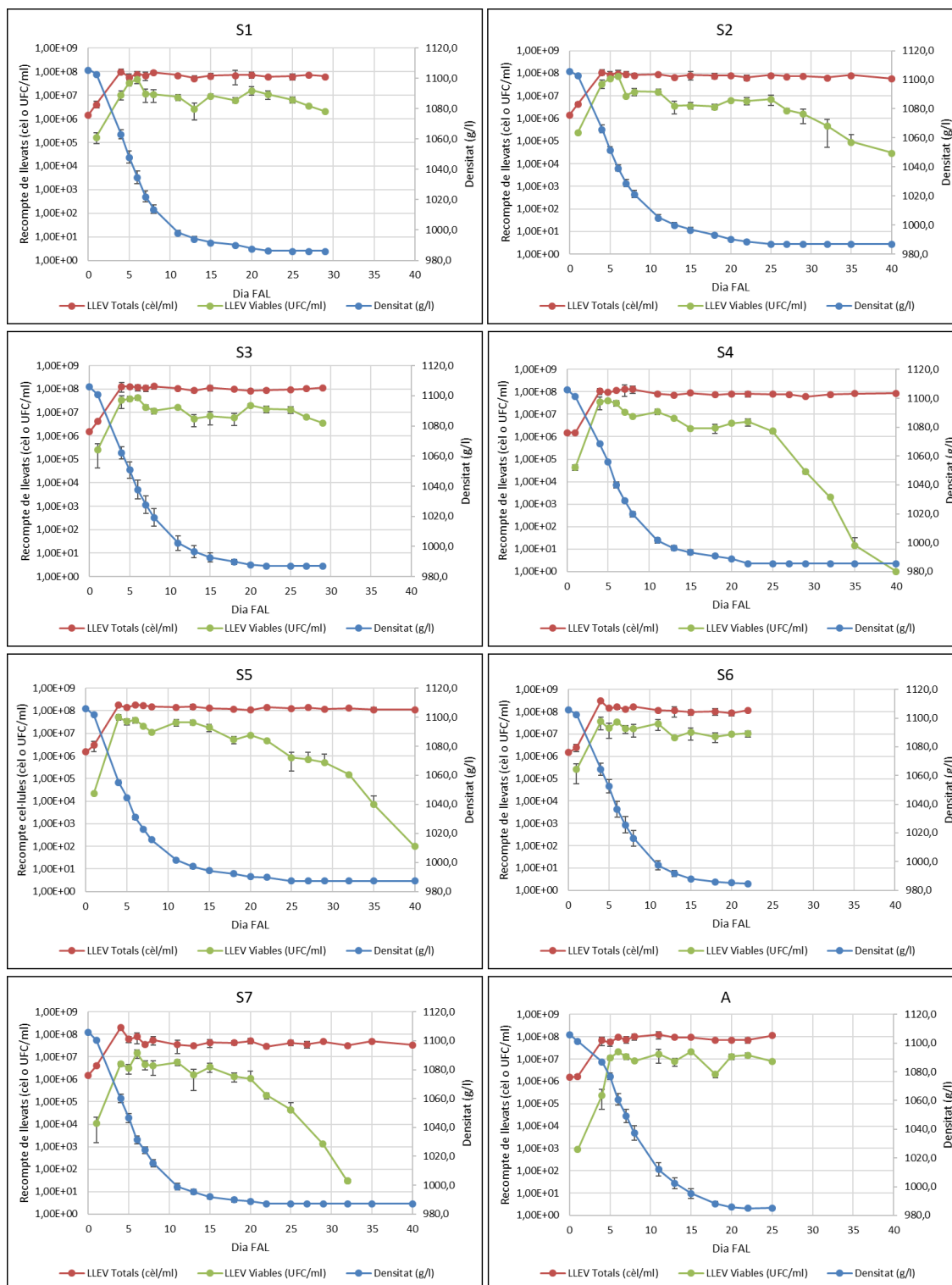
Les condicions inicials del most amb què es van realitzar les fermentacions es presenten a la **Taula 1**.

**Taula 1:** paràmetres inicials del most. GAP: Grau Alcohòlic Probable; PAN: Nitrogen Amínic Primari; NFA: Nitrogen Fàcilment Assimilable; ATT: Acidesa Total Tartàrica.

| Grau Birx             | GAP (% v/v)        | Sucres totals (D-Glucosa i D-Fructosa) (g/l) |                              |
|-----------------------|--------------------|----------------------------------------------|------------------------------|
| 24,6                  | 15,5               | 268,0                                        |                              |
| Densitat (g/l)        | PAN (mg/l)         | Amoni (mg/l)                                 | NFA (mg/l)                   |
| 1110,6                | 157,3              | 115                                          | 247                          |
| pH                    | Glicerol (g/l)     | ATT (g/l)                                    | Àcid acètic (g/l)            |
| 3,29                  | 0,1                | 7,5                                          | 0,08                         |
| Acidesa volàtil (g/l) | Àcid L-màlic (g/l) | Diòxid de sofre lliure (mg/l)                | Diòxid de sofre total (mg/l) |
| 0,14                  | 5,7                | 23                                           | 70                           |

Els nivells de sucres inicials van ser de 268,0 g/l i el GAP de 15,5 % (v/v), característic dels vins del Priorat (Portillo *et al.*, 2016). El glicerol va ser de 0,1 g/l, l'àcid L-màlic de 5,7 g/l i l'àcid tartàric de 2,6 g/l. L'àcid L-màlic i el tartàric són molècules responsables de l'acidesa total del vi, entre d'altres. L'àcid L-màlic provoca inestabilitat microbiològica als vins, pel que és interessant que els seus nivells baixin durant la fermentació (Su *et al.*, 2013).

Les evolucions de les microfermentacions realitzades pel monocultiu de cada soca autòctona (S1-S7) i de la soca comercial A es mostren la **Figura 7**.



**Figura 7:** seguiment de les microfermentacions de cadascuna de les soques inoculades (S1-S7 i A), per densitat (g/l), recompte de llevats totals (LLEV Totals) i recompte de llevats viables (LLEV Viables). UFC: Unitats Formadores de Colònia. Cada punt es mostra com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard de les rèpliques.

A final de la FAL, una de les rèpliques de cadascuna de les fermentacions de les soques de *S. cerevisiae* S2, S4 i S5 es va descartar per a realitzar els anàlisis estadístics, degut a que l'evolució de la FAL era diferent a les altres dues rèpliques i podia contribuir a una disminució de la fiabilitat de les anàlisis estadístiques.

Les soques S1, S3, S6 i A, juntament amb el cultiu massiu, van arribar a final de fermentació al voltant del dia 17 i 25 de la FAL. La durada d'aquestes fermentacions va ser lleugerament més llarga del que s'ha observat en altres estudis, que durava entre 5 i 20 dies (Sadoudi *et al.*, 2012; Padilla *et al.*, 2016). Concretament les soques S1, S3 i A van acabar la fermentació el dia 25 de FAL com a mitjana dels triplicats i la S6 al dia 22. Malgrat que la soca comercial A va ser la més lenta a iniciar la fermentació, va acabar-la amb els mateixos dies que la majoria de soques de *S. cerevisiae*.

Pel que fa a les soques S2, S4, S5 i S7, van patir una aturada de fermentació, ja que entre els dies 30 i 40 de FAL els nivells de sucres residuals no van variar, i eren majors d' 1 g/l. La mitjana de sucres residuals per a cada soca va ser d' 1,5 g/l per a la soca S2; 3,1 g/l per a la soca S4; 9,2 g/l per a la soca S5 i 8,0 g/l per a la soca S7.

A la **Taula 2** es presenten els valors de diferents paràmetres químics de cadascun dels vins obtinguts de les fermentacions realitzades amb cada soca de *S. cerevisiae*.

**Taula 2:** anàlisis estadístiques de diferents paràmetres a final de fermentació en els inòculs de cultius purs (S1-S7 i A). Les dades es mostren com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard de les rèpliques. Les lletres diferents en una mateixa columna signifiquen que les soques presenten diferències significatives en aquell paràmetre, amb una  $p < 0,05$ .

|               | Àcid L-màlic<br>(g/l) | Àcid L-làctic<br>(g/l) | Grau alcohòlic<br>(% v/v) | Acidesa volàtil<br>(g/l) | Acidesa total<br>tartàrica (g/l) | pH                 | Diòxid de sofre<br>lliure (mg/l) | Diòxid de sofre<br>total (mg/l) | Glicerol (g/l)   |
|---------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------|
| S1            | 4,6 $\pm$ 0,3 a       | < 0,1 a                | 14,71 $\pm$ 0,15 a        | 1,27 $\pm$ 0,03 a        | 9,1 $\pm$ 0,0 b                  | 3,25 $\pm$ 0,01 bc | < 10 a                           | 63 $\pm$ 2 b                    | 6,3 $\pm$ 0,2 bc |
| S2            | 4,4 $\pm$ 0,1 a       | < 0,1 a                | 12,54 $\pm$ 0,42 cd       | 1,08 $\pm$ 0,05 bc       | 8,8 $\pm$ 0,1 bc                 | 3,26 $\pm$ 0,00 ab | < 10 a                           | 38 $\pm$ 6 d                    | 5,9 $\pm$ 0,5 c  |
| S3            | 4,1 $\pm$ 0,2 a       | < 0,1 a                | 13,45 $\pm$ 0,23 bc       | 0,75 $\pm$ 0,04 e        | 7,9 $\pm$ 0,1 d                  | 3,30 $\pm$ 0,02 a  | < 10 a                           | 66 $\pm$ 4 b                    | 6,1 $\pm$ 0,2 c  |
| S4            | 4,6 $\pm$ 0,3 a       | < 0,1 a                | 11,17 $\pm$ 0,01 d        | 1,18 $\pm$ 0,01 ab       | 9,5 $\pm$ 0,0 a                  | 3,16 $\pm$ 0,01 d  | < 10 a                           | 20 $\pm$ 1 e                    | 7,1 $\pm$ 0,3 ab |
| S5            | 4,0 $\pm$ 0,0 a       | < 0,1 a                | 12,03 $\pm$ 0,37 d        | 0,94 $\pm$ 0,04 cd       | 8,4 $\pm$ 0,0 c                  | 3,20 $\pm$ 0,00 cd | < 10 a                           | 20 $\pm$ 0 e                    | 6,4 $\pm$ 0,2 bc |
| S6            | 4,1 $\pm$ 0,2 a       | < 0,1 a                | 14,22 $\pm$ 0,46 ab       | 1,03 $\pm$ 0,02 cd       | 8,5 $\pm$ 0,1 c                  | 3,28 $\pm$ 0,02 ab | < 10 a                           | 48 $\pm$ 1 c                    | 6,8 $\pm$ 0,1 bc |
| S7            | 4,4 $\pm$ 0,1 a       | < 0,1 a                | 11,79 $\pm$ 0,60 d        | 1,21 $\pm$ 0,04 a        | 9,1 $\pm$ 0,2 b                  | 3,18 $\pm$ 0,04 d  | < 10 a                           | 16 $\pm$ 2 e                    | 6,4 $\pm$ 0,5 bc |
| A             | 4,2 $\pm$ 0,1 a       | < 0,1 a                | 14,31 $\pm$ 0,27 ab       | 0,94 $\pm$ 0,00 d        | 8,6 $\pm$ 0,1 c                  | 3,29 $\pm$ 0,01 ab | < 10 a                           | 85 $\pm$ 2 a                    | 8,0 $\pm$ 0,1 a  |
| Pr > F        | 0,051                 | > 0,05                 | 0,000                     | 0,000                    | 0,000                            | 0,000              | > 0,05                           | 0,000                           | 0,000            |
| Significància | No                    | No                     | Sí                        | Sí                       | Sí                               | Sí                 | No                               | Sí                              | Sí               |

Els nivells d'àcid L-màlic obtinguts en totes les fermentacions van ser d'entre 4,0 i 4,6 g/l, sense trobar diferències significatives entre cap de les soques. Aquests valors mostraven un consum d'àcid L-màlic d'aproximadament 1 g/l respecte el most inicial. En altres estudis s'havia descrit que *S. cerevisiae* pot consumir entre un 3-45 % de l'àcid L-màlic present en el most (Swiegers *et al.*, 2005). Valors alts d'àcid L-màlic a final de fermentació redueixen l'estabilitat microbiològica del vi, ja que pot ser consumit per altres microorganismes que produeixen metabòlits no desitjables. En aquest cas, els valors d'àcid L-màlic eren relativament alts, pel que la realització d'una fermentació malolàctica per reduir els nivells d'aquest compost seria interessant per tal de millorar l'estabilitat microbiològica del vi (Su *et al.*, 2013).

Pel que fa als nivells d'àcid L-làctic, en totes les fermentacions van ser inferiors a 0,1 g/l, sense diferències significatives entre els grups. L'àcid L-làctic confereix acidesa al vi, però al contrari que l'àcid L-màlic, confereix estabilitat microbiològica i un gust més plaent. L'àcid L-làctic és producte de la fermentació malolàctica a partir de l'àcid L-màlic, la qual no s'espera trobar en *S. cerevisiae*. El fet que no s'hagués produït àcid L-làctic però que hi hagués hagut un consum d'àcid L-màlic, podria explicar-se pel fet que l'àcid L-màlic s'hagués consumit mitjançant la fermentació maloalcohòlica, entre altres explicacions possibles (Su *et al.*, 2013).

El grau alcohòlic variava entre l'11,79 % i el 14,71 % (v/v) en el total de les fermentacions. Aquest paràmetre està influenciat principalment pel consum de sucres, pel que en els mostos que no es van acabar de consumir els sucres el grau alcohòlic era més baix. Sense tenir en compte les soques que no van acabar la FAL (S2, S4, S5 i S7), el grau alcohòlic obtingut variava entre el 13,45 % i el 14,71 % (v/v), i hi havia diferències significatives entre totes les soques excepte la S6 i l'A. La S1 és la que presentava el grau alcohòlic més alt, 14,71 % (v/v), i la S3 el més baix, 13,45 % (v/v). Els graus alcohòlics obtinguts no van arribar al 15,5 % (v/v) previst pel GAP, però estaven dins del rang típic de grau alcohòlic de vins del Priorat (Portillo *et al.*, 2016).

L'acidesa volàtil va ser d'entre 0,75 g/l i 1,27 g/l, amb diferències significatives entre algunes de les soques. La soca amb més acidesa volàtil va ser la S1, amb 1,27 g/l, mentre que la S3 va ser la que presentava la més baixa, 0,75 g/l. En tots els casos, l'acidesa volàtil

va augmentar respecte la inicial (0,14 g/l). El tipus de metodologia emprada per a les microfermentacions podria haver propiciat l'oxidació del most i conseqüentment un augment de l'acidesa volàtil. A nivells baixos, l'acidesa volàtil aporta una acidesa agradable i està relacionada amb aromes afruitades del vi, però a nivells superiors a 0,5 g/l el component principal és l'àcid acètic, que aporta un gust agre desagradable i aromes de vinagre. La OIV estableix que el límit d'acidesa volàtil en vins és de 1,2 g/l (Vilela-moura *et al.*, 2011).

L'acidesa total mesurada en àcid tartàric (ATT) és un paràmetre important en l'estabilitat microbiològica del vi. Els valors d'ATT en les microfermentacions oscil·laven entre 7,9 i 9,5 g/l, uns valors elevats si es comparen amb altres estudis: de 4,6 a 5,2 g/l (Padilla *et al.*, 2017). L'ATT és un paràmetre que no es veia afectat per la cinètica de la fermentació, ja que hi havia diferències significatives entre algunes de les soques, fins i tot les que no van acabar la FAL.

El pH al final de les diferents fermentacions va ser d'entre 3,16 i 3,30, havent-hi diferències significatives entre alguna de les soques. La soca S3 és la que tenia un pH més elevat (3,30), mentre que els tres valors més baixos es van trobar en les soques S4, S5 i S7, que no van acabar la fermentació. El pH és un paràmetre molt relacionat amb l'acidesa total del vi (Su *et al.*, 2013).

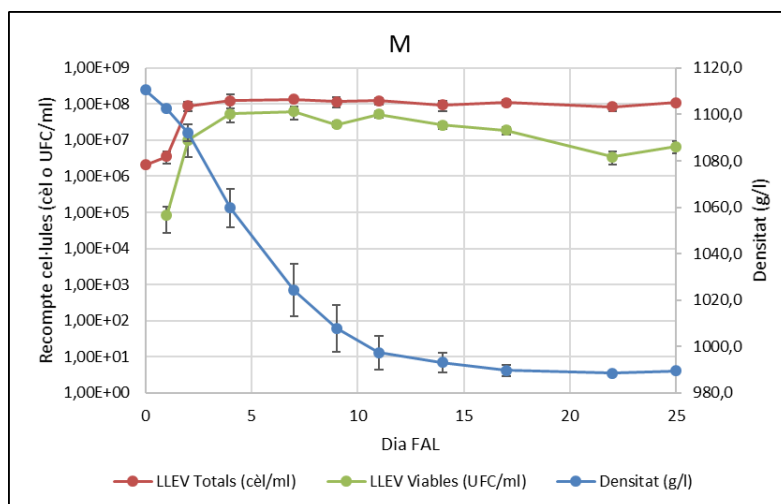
Els nivells de diòxid de sofre lliure en totes les fermentacions va ser menor a 10 mg/l, el que significa que hi va haver una disminució respecte al most inicial, on els nivells eren de 23 mg/l. Referent al diòxid de sofre total, també va disminuir en totes les soques autòctones (S1-7) respecte l'inicial (70 mg/l), mentre que en la soca comercial A va augmentar a 85 g/l. Les soques que no van poder consumir els sucres per sota d' 1 g/l presentaven els nivells més baixos, entre 16 i 38 mg/l. Les soques autòctones que van acabar la fermentació tenien nivells d'entre 48 i 66 mg/l, sent la soca S3 la del valor més alt dins d'aquest grup. En el vi, el diòxid de sofre és present en forma combinada i en forma lliure. El diòxid de sofre lliure està en equilibri amb dues espècies més: bisulfit ( $\text{SO}_3^-$ ) i sulfit ( $\text{SO}_3^{2-}$ ). Les proporcions d'aquestes tres espècies depenen del pH. A partir de determinades concentracions de diòxid de sofre, la majoria de llevats no poden créixer, però sempre depenent de l'espècie i soca. En canvi, algunes espècies i soques

de llevats sí que toleren el diòxid de sofre. Hi ha espècies i soques que produeixen diòxid de sofre en petites quantitats (augment del contingut en el vi); d'altres el poden assimilar i incorporat a diferents vies metabòliques com la síntesi d'aminoàcids o formació d'àcid sulfhídric (desagradable, degut a l'aroma d'ou podrit) (Waterhouse *et al.*, 2016; Ferrer-Gallego *et al.*, 2018). El diòxid de sofre es caracteritza per la seva activitat antioxidant i antisèptica, però també perquè pot causar reaccions al·lèrgiques a les persones. És per aquest motiu que la recerca de nous compostos antioxidants i antisèptics substituïts, així com llevats que no produeixin diòxid de sofre, són dos focus en la investigació enològica (Ancín-Azpilicueta *et al.*, 2016; Ferrer-Gallego *et al.*, 2018).

El glicerol és un metabòlit que confereix suavitat i untuositat i té un gust dolç en boca, i s'associa a vins complexos i de qualitat, però sempre depenent de les varietats de raïm, la regió i les soques de llevat (Jolly *et al.* 2014). Els nivells de glicerol obtinguts oscil·laven entre els 5,9 g/l i 8,0 g/l. En general, els nivells eren inferiors comparats amb els que s'havien trobat a l'estudi de Padilla *et al.* (2016) amb raïm de la D.O.Q. Priorat, però superiors als d'altres estudis (Andorrà *et al.*, 2010). La soca comercial A va ser millor productora de glicerol, i presentava diferències significatives amb totes les soques autòctones excepte la S4; en canvi, la soca S2 presentava menys nivells de glicerol a final de FAL. Així doncs, els llevats autòctons tenien una menor capacitat de producció de glicerol comparats amb la soca comercial.

Per tal de confirmar els resultats obtinguts en la caracterització de les capacitats fermentatives (cinètica fermentativa i perfil de metabòlits) caldria realitzar fermentacions de monocultius a escala semi-industrial (50 kg) amb mostos de les varietats de raïm d'on s'han aïllat els llevats. El canvi de l'escala a semi-industrial permetria evitar l'oxidació del most, que amb molta probabilitat influeix a les fermentacions a escala laboratori. Per altra banda, l'ús del most autèntic del raïm d'on provenen els llevats també podria variar els valors d'alguns dels paràmetres químics analitzats, pel que serien més representatius del que passaria en bodega. També permetria comprovar si els llevats tenen un comportament similar que a l'escala laboratori (200 ml), abans de fer estudis a escala industrial. Un altre avantatge de l'escala semi-industrial és que es podrien realitzar tastos degut al major volum del vi d'estudi, i per tant tenir informació referent a anàlisis sensorials.

A la **Figura 8** es mostra l'evolució de la FAL realitzada per l'inòcul massiu (M) de totes les soques de *S. cerevisiae* (S1-7). L'evolució de la densitat era comparable a la de les soques amb monocultius amb cinètiques fermentatives més altes, i als 11 dies la densitat ja era inferior a 1000 g/l. El nombre de cèl·lules totals i viables va augmentar durant els 5 primers dies, i es va estabilitzar fins pràcticament el final de la FAL. La fermentació amb l'inòcul massiu va acabar al dia 22 de FAL de mitjana.



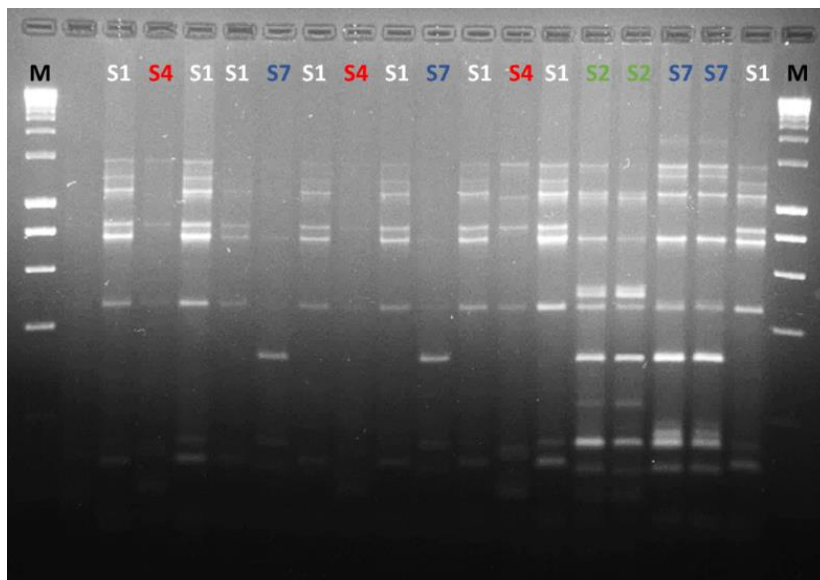
**Figura 8:** seguiment de les microfermentacions de cadascuna de les soques inoculades (S1-7 i A), per densitat (g/l), recompte de llevats totals (LLEV Totals) i recompte de llevats viables (LLEV Viables). UFC: Unitats Formadores de Colònia. Cada punt es mostra com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard de les rèpliques.

Els resultats de les anàlisis químiques del vi obtingut de l'inòcul massiu es mostren a la **Taula 3**. Tots els paràmetres es trobaven dins dels valors obtinguts als monocultius, excepte el grau alcohòlic, que en aquest cas, va ser més alt (14,91 % (v/v)).

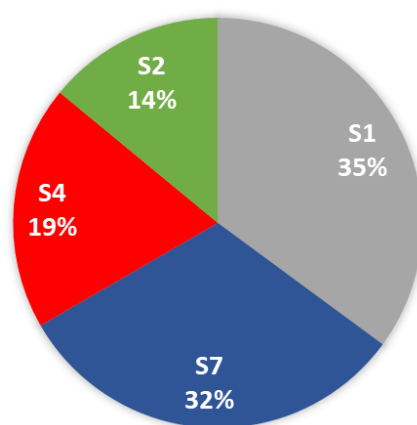
**Taula 3:** paràmetres a final de fermentació de l'inòcul massiu. Les dades es mostren com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard de les rèpliques.

| Àcid L-màlic (g/l)            | Àcid L-làctic (g/l)           | Grau alcohòlic (% v/v) |
|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| 4,1 $\pm$ 0,2                 | < 0,1                         | 14,91 $\pm$ 0,62       |
| Acidesa volàtil (g/l)         | Acidesa total tartàrica (g/l) | pH                     |
| 0,98 $\pm$ 0,08               | 8,5 $\pm$ 0,1                 | 3,26 $\pm$ 0,01        |
| Diòxid de sofre lliure (mg/l) | Diòxid de sofre total (mg/l)  | Glicerol (g/l)         |
| < 10                          | 53 $\pm$ 4                    | 5,9 $\pm$ 0,3          |

A la **Figura 9** es mostra un dels gels d'electroforesi realitzats per al control d'implantació de les diferents soques de *S. cerevisiae*, en la inoculació massiva de totes les soques de *S. cerevisiae*. La soca amb més percentatge d'imposició va ser la S1 (35 %) seguida de la S7 (32 %). Les soques S4 (19 %) i S2 (14 %) van créixer en menor mesura, mentre que les soques S3, S5 i S6 no es van aïllar (**Figura 10**).



**Figura 9:** fotografia d'un gel d'electroforesi amb diferents perfils de bandes corresponents als elements delta de *Saccharomyces cerevisiae* amplificats per PCR. Les soques van ser aïllades a final de fermentació amb inoculació massiva. S1, S2, S4 i S7 marcades del mateix color les mateixes soques. M: marcador de pes molecular HyperLadder™ 1kb (*Bioline*, Londres, Regne Unit).



**Figura 10:** percentatge d'imposició de les soques aïllades a final de fermentació amb inoculació massiva.

El fet més destacable d'aquestes imposicions va ser que les soques que es van determinar amb un major percentatge d'imposició al final de la FAL de la inoculació massiva eren les que presentaven menys capacitats fermentatives en els monocultius: cinètica fermentativa lenta i incapacitat de consumir sucres per sota d' 1 g/l. L'única excepció va ser la soca S1, que presentava bona cinètica fermentativa i va consumir sucres per sota d' 1 g/l en els monocultius. De fet, la S1 va ser la soca que va mostrar més capacitat d'implantar-se, ja que tenia el percentatge més elevat d'imposició.

Una possible explicació a que no es detectessin la resta de soques aïllades de les fermentacions espontànies podria ser l'ambient microbiològic del most. Hi ha estudis que demostren les relacions tan positives (sinèrgies de creixement) com negatives (mecanismes inhibitoris) entre diferents espècies de llevats (Jolly *et al.*, 2014). En el cas de les fermentacions espontànies, les proporcions dels llevats no-*Saccharomyces* respecte els *Saccharomyces* i les proporcions de les soques de *S. cerevisiae* eren diferents que en les microfermentacions a escala laboratori. En aquest últim cas, *S. cerevisiae* era el llevat amb més presència, i la proporció de les diferents soques també era diferent respecte les condicions espontànies. D'aquesta manera, en la fermentació espontània, les proporcions dels llevats no-*Saccharomyces* i les soques de *S. cerevisiae* podrien ser factors que afavorissin el creixement de les soques amb més capacitat fermentativa.

A l'hora de seleccionar soques per realitzar la FAL cal tenir en compte diversos aspectes com són la cinètica fermentativa, perfil sensorial i capacitat d'imposició, entre d'altres. Les soques de *S. cerevisiae* seleccionades han de presentar una correcta cinètica fermentativa: durada de fermentació curta, capacitat de consumir els sucres residuals i que no presenti una fase de latència llarga. Per altra banda, des de la perspectiva sensorial, es valoren les aromes i metabòlits produïts per la soca. Finalment, també és important la capacitat d'imposició de la soca per sobre d'altres llevats presents en el most per evitar possibles contaminacions o el creixement i imposició d'altres microorganismes.

La soca S1 va ser la que es va imposar i tenia bones capacitats fermentatives, similars a les de la soca comercial. A nivell químic, la soca S1 i la A presentaven diferències significatives en els nivells d'acidesa volàtil (major a la S1), ATT (major a la S1), diòxid de sofre total (menor a la S1) i glicerol (menor a la S1). Per la resta de paràmetres no hi havia diferències significatives però sí que s'observava una tendència de més eficiència de producció d'etanol en la soca comercial.

## 7. Conclusions

El present estudi exposa la diversitat d'espècies i soques de llevats autòctons de la D.O. Montsant i de la D.O.Q. Priorat. Un total de 288 llevats procedents de la pell del raïm i de microvinificacions espontànies es van aïllar de tres raïms diferents: garnatxa i carinyena de la D.O. Montsant i garnatxa de la D.O.Q. Priorat. Es van identificar fins a 7 espècies de llevats diferents: *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bacillaris*, *Lachancea thermotolerans*, *Zygoascus meyeriae*, *Candida californica* i *Saccharomyces cerevisiae*. En l'espècie *S. cerevisiae* es van tipificar un total de 7 soques. Cal destacar que *S. cerevisiae* només es va aïllar en un dels dotze punts de mostreig que hi havia en total, fet que es podria explicar perquè el most mai va estar en contacte amb la bodega.

De les 7 soques de *S. cerevisiae* tipificades, només 3 presentaven cinètiques fermentatives acceptables, similars a les de la soca comercial, però lentes comparades amb altres estudis. Cal destacar que en la majoria de paràmetres químics les fermentacions amb soques autòctones mostraven característiques fermentatives similars a la soca comercial, excepte un contingut d'àcids inferiors i una major capacitat de produir glicerol en la comercial. Pel que fa a la capacitat d'imposició, de les 4 soques que es van imposar, 3 no presentaven capacitats fermentatives correctes en els monocultius.

Per tal de d'obtenir més informació de les aptituds fermentatives dels llevats autòctons i poder-les comparar amb les comercials, més estudis i assajos són necessaris en el futur. Primer de tot, se seleccionarien les soques autòctones de *S. cerevisiae* amb millors aptituds fermentatives. Amb aquestes soques, es realitzarien cultius mixtos a escala

laboratori amb les espècies no-*Saccharomyces* identificades a les fermentacions espontànies, per tal de seleccionar els cultius mixtes amb resultats més interessants. Aquests s'estudiarien a escala semi-industrial amb most de garnatxa i carinyena de la D.O. Montsant i D.O.Q. Priorat. Així doncs, es podria realitzar una anàlisi comparativa dels vins obtinguts a nivell fermentatiu, químic i sensorial, per definir les diferents aptituds de cada llevat.

Tots els estudis d'identificació, caracterització i selecció cal que es repeteixin al llarg de diferents veremes, per tal d'obtenir uns resultats contrastats i fiables, i minimitzar els possibles efectes de variables externes i no controlables com les condicions climàtiques o del sòl d'una anyada. Amb aquests resultats, les bodegues podran escollir quin o quins llevats són més interessants per a obtenir el seu vi. En cas d'utilitzar llevats autòctons, el vi tindrà més tipicitat de la regió, i per tant, un tret distintiu respecte altres vins d'altres bodegues que no vinifiquin amb llevats autòctons.

## 8. Bibliografia

- Albergaria, H. i Arneborg, N., (2016) Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**, 2035-2046.
- Ancín-Azpilicueta, C., Jiménez-Moreno, N., Moler, J.A., Nieto-Rojo, R. i Urmeneta, H., (2016) Effects of reduced levels of sulfite in wine production using mixtures with lysozyme and dimethyl dicarbonate on levels of volatile and biogenic amines. *Food Additives and Contaminants* **33**, 1518-1526.
- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A. i Guillamón, J.M., (2010) Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *European Food Research and Technology* **231**, 215-224.
- Andorrà, I., Miró, G., Espligares, N., Mislata, A.M., Puxeu, M. i Ferrer-Gallego, R., (2019) *Yeasts in Biotechnology*. IntechOpen. doi: [dx.doi.org/10.5772/intechopen.84128](https://doi.org/10.5772/intechopen.84128).
- Balikci, E.K., Tanguler, H., Jolly, N.P. i Erten, H., (2016) Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. *Yeast* **33**, 313-321.

- Barnett, J.A., (2000) A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast* **16**, 755-771.
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M.A., Grieco, F. i Spano, G., (2015) Microbial *terroir* and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research* **181**, 75-83.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. i Querol, A., (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 329-337.
- Ferrer-Gallego, R., Puxeu, M., Martín, L., Nart, E., Hidalgo, C. i Andorrà, I., (2018) Microbiological, Physical, and Chemical Procedures to Elaborate High-Quality SO<sub>2</sub>-Free Wines, en: *Grapes and Wines - Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization*. IntechOpen, p. 171-193. doi: 10.5772/intechopen.71627.
- Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. i Querol, A., (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology* **169**, 387-392.
- International Organisation of vine and wine, (2019) *Compendium of international Methods of Wine and must Analysis*. Volume 1, International Organisation of vine and wine.
- Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C. i Lollier, M., (2006) Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology* **23**, 709-716.
- Jolly, N.P., Varela, C. i Pretorius, I.S., (2014) Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* **14**, 215-237.
- Kurtzman, C.P. i Robnett, C.J., (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **73**, 331-371.

- Legras, J.L. i Karst, F., (2003) Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. FEMS Microbiology Letters **221**, 249-255.
- Padilla, B., García-Fernández, D., González, B., Izidoro, I., Esteve-Zarzoso, B., Beltran, G. i Mas, A., (2016) Yeast biodiversity from DOQ priorat uninoculated fermentations. Frontiers in Microbiology **7**, 1-11.
- Padilla, B., Zulian, L., Ferreres, À., Pastor, R., Esteve-zarzoso, B., Beltran, G. i Mas, A., (2017) Sequential Inoculation of Native Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Wine Making. Frontiers in Microbiology **8**, 1-12.
- Piccardo, D., Favre, G., Pascual, O., Canals, J.M., Zamora, F. i González-Neves, G., (2019) Reducción del contenido de alcohol y pH de vinos tintos Pinot noir y Tannat empleando uvas con diferentes niveles de maduración. BIO Web of conferences **12**, 1-7.
- Portillo, M. del C., Franquès, J., Araque, I., Reguant, C. i Bordons, A., (2016) Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). International Journal of Food Microbiology **219**, 56-63.
- Querol, A., Barrio, E. i Ramón, D., (1992) A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. Systematic and Applied Microbiology **15**, 439-446.
- Rantsiou, K., Campolongo, S., Alessandria, V., Rolle, L., Torchio, F. i Cocolin, L., (2013) Yeast populations associated with grapes during withering and their fate during alcoholic fermentation of high-sugar must. Australian Journal of Grape and Wine Research **19**, 40-46.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J. i Alexandre, H., (2012) Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. Food Microbiology **32**, 243-253.

- Su, J., Wang, T., Wang, Y., Li, Y. i Li, H., (2013) The use of lactic acid-producing , malic acid-producing , or malic acid-degrading yeast strains for acidity adjustment in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. i Pretorius, I.Salber., (2005) Microbial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**, 139-173.
- Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M. i Mas, A., (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations : Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **79**, 345-352.
- Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M. i Dequin, S., (2007) Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Research* **7**, 317-329.
- Vilela-moura, A., Schuller, D., Mendes-faia, A., Silva, R.D., Chaves, S.R., Sousa, M.J. i Côte-Real, M., (2011) The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality : reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**, 271-280.
- Waterhouse, A.L., Sacks, G.L. i Jeffery, D.W., (2016) *Understanding Wine Chemistry* (224-226). Wiley, Regne Unit.

## 9. Autoavaluació

L'estada en pràctiques a VITEC m'ha servit per a créixer professionalment com a futur bioquímic i biotecnòleg, i a dia d'avui em sento segur a l'hora de treballar de forma independent en un laboratori microbiològic i de biologia molecular.

Seguint el pla de treball establert, he pogut consolidar i ampliar els meus coneixements tant pràctics com teòrics. En la majoria dels casos, les tasques realitzades ja les havia dut a terme al llarg de la carrera, com són l'extracció d'ADN, la PCR, el gel d'electroforesi, entre d'altres; en canvi, assajos com les microfermentacions mai els havia dut a terme, i per tant els he après de nou. El fet de treballar de manera individual i amb quantitats grans de mostres han fet que consolidi el que ja havia après en les pràctiques dins la Universitat i que hagi après a organitzar-me i optimitzar el temps de treball. Fer pràctiques a VITEC també m'ha obert la possibilitat de conèixer el món de l'enologia, i aprendre conceptes bàsics de com es fa un vi, les propietats de les fermentacions i tècniques per a la detecció i quantificació de llevats en vins.

Un altre aspecte que vull remarcar és que he analitzat i interpretat els resultats obtinguts al final d'alguns experiments. Això m'ha permès un cert grau d'independència a l'hora de prendre decisions sobre quin seria el següent pas, tot i que sempre amb la supervisió de l'Imma. La presa de decisions ha fet que també tingui més sentit de la responsabilitat a l'hora de treballar, i per tant m'he implicat més en la investigació del grup.

A més de tots aquests coneixements, també cal destacar la feina bàsica d'un laboratori, com és la preparació de material, reactius i medis. Aquesta preparació podria ser feina més encarada a un operari que no pas a un investigador, però al final tots som treballadors del laboratori i és important saber dur a terme tota aquesta preparació. De la mateixa manera, també cal mantenir netes totes les àrees de treball i equipaments, ja que en un laboratori microbiològic l'ambient ha de ser sempre el màxim estèril possible.

Per altra banda, més enllà dels coneixements de bioquímica i biotecnologia, la comunicació entre treballadors és essencial a l'hora de poder gestionar bé el temps. Per exemple, quan es donava el cas, dos treballadors necessitàvem el mateix bany, però un

el necessitava a 37 °C i l'altre a 65 °C. Si això se sabia amb antelació, un dels dos podia retardar el seu experiment per tal de no coincidir amb l'altre, i invertir aquell temps en donar un cop de mà a l'altre per tal que pogués acabar més ràpid, preparar medis de cultiu, o qualsevol altra tasca comunitària. Sense comunicació tota aquesta previsió no es pot fer, i per problemes com aquest un experiment pot sortir malament.

Pel que fa a la redacció del treball, cal destacar el suport rebut per part de la Gemma i l'Imma. Tots els seus consells, suggeriments i correccions m'han fet millorar a l'hora de saber plasmar en un paper tot el treball fet al laboratori, els resultats i la seva interpretació.

La valoració general de les pràctiques és d'allò més positiva, ja que els companys i l'ambient de treball era alegre i sa, cosa que considero molt important de cara a aprendre, obtenir bons resultats i encarar els reptes. És per això que les pràctiques també m'han fet créixer a nivell humà, aprenent les dinàmiques d'un lloc de treball i la manera correcta d'actuar.