

ALBA ORTÍS CARRASCO

**Efecte de *Hanseniaspora uvarum* i *Hanseniaspora viniae* sobre
Oenococcus oeni i la fermentació malolàctica**

TREBALL FINAL DE MÀSTER

Dirigit per CRISTINA REGUANT MIRANDA

Màster en BEGUDES FERMENTADES

Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Tarragona
26 de juny de 2017**

Efecte de *Hanseniaspora uvarum* i *Hanseniaspora vineae* sobre *Oenococcus oeni* i la fermentació malolàctica

Ortís, A., Reguant, C., Bordons, A.

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, 43007 - TARRAGONA, SPAIN.

e-mail: alba.ortis@estudiants.urv.cat

RESUM

Les noves tendències de mercat han conduït a la utilització de llevats No-*Saccharomyces* per a la producció de vins amb nous perfils. Aquests s'acostumen a utilitzar en fermentacions seqüencials en la fermentació alcohòlica (FAL) per després acabar amb la imposició natural o inoculada de *Saccharomyces cerevisiae*. S'ha vist que aquest procediment pot millorar el perfil organolèptic en alguns casos. Però aquesta presència pot afectar la fermentació malolàctica (FML)

S'han estudiat dues espècies de No-*Saccharomyces* pertanyents a *Hanseniaspora*, dues soques de *H. uvarum* i dues de *H. vineae* durant la FAL juntament amb *S. cerevisiae*. El vi resultant s'ha testat en la FML amb quatre soques diferents d'*Oenococcus oeni*. De cada soca de No-*Saccharomyces* es van dur a terme un mínim de dues rèpliques per confirmar els resultats. Es van mantenir unes condicions del most constants i unes condicions ambientals de fermentació controlades.

Durant les FAL es va monitoritzar el consum de sucres i de cèl·lules viables, en el cas de la FML es va controlar el consum d'àcid màlic i també les cèl·lules viables inicials i finals. Els resultats de les fermentacions es van comparar amb una fermentació amb inoculació única de *S. cerevisiae*.

Els resultats obtinguts mostren una interacció entre algunes de les soques de No-*Saccharomyces* i la capacitat d'adaptació al medi d'*O. oeni*. S'han descrit diferències rellevants en el contingut d'àcid màlic, àcid acètic i SO₂ total principalment. L'espècie que ha presentat més diferències respecte la control és *H. uvarum*.

Paraules clau: *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora vineae*, No-*Saccharomyces*, fermentació malolàctica, *Oenococcus oeni*

ABSTRACT

New market trends have led to the utilization of Non-*Saccharomyces* yeasts to produce wine with new characteristics. These are usually used in sequential fermentations in alcoholic fermentation to then finish with either natural or inoculated imposition of *Saccharomyces cerevisiae*. It has been proved that this procedure can help to improve the organoleptic profile in some of the cases. But this presence can affect the malolactic fermentation.

There are studies about two kinds of the Non-*Saccharomyces* that belong to *Hanseniaspora*, two strains of *H. uvarum* and two of *H. vineae* during the alcoholic fermentation with *S. cerevisiae*. The resulting wine has been tested in malolactic fermentation with four different strains of *Oenococcus oeni*. At least two replicas from each strain of Non-*Saccharomyces* were made to confirm the results. During the process, there were stable must conditions and controlled environmental conditions of the fermentation.

During the alcoholic fermentation, the consumption of sugars and viable cells was monitored. Regarding the malolactic fermentation, the consumption of malic acid and also initial and final viable cells were monitored. The results of the fermentations were compared with the results of control fermentation with single inoculation of *S. cerevisiae*.

The results show an interaction between some of the Non-*Saccharomyces* strains and the ability to adapt to the environment of *O. oeni*. Relevant differences have been described on the amount of malic acid, acetic acid and SO₂ mainly. The species that has presented more differences about the control is *H. uvarum*.

Key words: *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora vineae*, Non-*Saccharomyces*, malolactic fermentation, *Oenococcus oeni*

Taula de Continguts

RESUM	III
ABSTRACT	IV
1. INTRODUCCIÓ.....	3
1.1. Ús de llevats No- <i>Saccharomyces</i> en enologia.....	3
1.2. <i>Oenococcus oeni</i> i la fermentació malolàctica	4
1.3. Interaccions entre llevats i bacteris làctics	4
2. MATERIALS I MÈTODES	6
2.1. Microorganismes, cultius, solucions i reactius.....	6
2.2. Preparació d'inòculs	6
2.3. Fermentació alcohòlica.....	7
2.4. Fermentació malolàctica.....	9
2.5. Caracterització del most i del vi	9
2.6. Plaques de difusió.....	12
2.7. Anàlisi estadístic.....	12
3. RESULTATS	13
3.1. Fermentació alcohòlica.....	13
3.2. Fermentació malolàctica.....	17
3.3. Plaques de difusió.....	21
3.4. Anàlisi de components principals (PCA)	21
4. DISCUSSIÓ	23
5. CONCLUSIONS I PERSPECTIVES.....	26
6. AGRAÏMENTS.....	27
7. BIBLIOGRAFIA	28
ANNEX I. Cultius, solucions, reactius i procediments	i
ANNEX II. Taules d'anàlisi ANOVA d' <i>Oenococcus oeni</i>	vi

Índex de taules

Taula 1 Relació de microorganismes utilitzats en aquest estudi	6
Taula 2 Fermentació alcohòlica: Relació d'anàlisi al vi.....	10
Taula 3 Fermentació malolàctica: Relació d'anàlisi al vi.....	10
Taula 4 Preparació de la corba de calibrat per a la determinació de proteïnes totals.....	11
Taula 5 Taula resum de la caracterització del vi després de la fermentació alcohòlica.	18
Taula 6 Caracterització del most inicial.	18
Taula 7 Fermentació malolàctica de <i>S. cerevisiae</i> QA23 amb les quatre soques d' <i>O. oeni</i>	19
Taula 8 Fermentació malolàctica de <i>H. uvarum</i> amb les quatre soques d' <i>O. oeni</i>	19
Taula 9 Fermentació malolàctica de <i>H. vineae</i> amb les quatre soques d' <i>O. oeni</i>	19

Índex de figures

Figura 1 Fórmula per al càlcul de l'acidesa total.....	11
Figura 2 Seguiment de l'evolució de la fermentació alcohòlica amb <i>H.uvarum</i> 13130. Consum de sucres (- - -), i l'evolució de la població de llevats (—).....	13
Figura 3 Seguiment de l'evolució de la fermentació alcohòlica amb <i>H.uvarum</i> 10389. Consum de sucres (- - -), i l'evolució de la població de llevats (—).....	14
Figura 4 Seguiment de l'evolució de la fermentació alcohòlica amb <i>H. vineae</i> TO25A. Consum de sucres (- - -), i l'evolució de la població de llevats (—).....	15
Figura 5 Seguiment de l'evolució de la fermentació alcohòlica amb <i>H. vineae</i> 1471, Consum de sucres (- - -), i l'evolució de la població de llevats (—).....	16
Figura 6 Creixement d' <i>O. oeni</i> CH11 amb les quatre soques de <i>Hanseniaspora</i>	21
Figura 7 Anàlisi de components principals amb les variables obtingudes al final de la fermentació alcohòlica.....	22

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Ús de llevats No-*Saccharomyces* en enologia

Habitualment, la majoria de fermentacions alcohòliques en la producció de vi són inoculades amb *Saccharomyces cerevisiae*. Això és degut a que al llarg del temps s'ha vist que era aquesta era l'espècie que tenia la capacitat d'imposar-se a la microbiota procedent del raïm i d'aquesta manera permetia un millor control dels resultats finals i uns perfils organolèptics més estàndards (Comitini et al. 2010).

Actualment, la gran quantitat de competència internacional entre productors i l'alta demanda de vins amb nous caràcters i amb diferències apreciables segons les zones de procedència ha fet que el món de la producció del vi es plantegessin nous camins en innovació. Una d'aquestes noves línies d'investigació ha estat l'estudi de l'ús de diferents espècies de llevats No-*Saccharomyces* ja que s'ha descobert que tenen un paper més important del que es creia sobre les característiques del producte final (Fleet 2008).

Aquestes espècies No-*Saccharomyces* que es poden trobar de forma natural en el raïm s'ha vist que no són tan resistents a les altes concentracions d'alcohol, no tenen tanta capacitat de transformar els sucres com és el cas de *S. cerevisiae* i moltes vegades no tenen capacitat per acabar la fermentació alcohòlica. Però si que tenen un paper important en els primers estadis de la fermentació alcohòlica (Beltran et al. 2002; Fleet 2008).

Com ja s'ha vist en estudis anteriors l'ús d'aquests llevats com a iniciadors de la fermentació conjuntament amb *S. cerevisiae* poden produir un increment de la complexitat i la qualitat del vi o també una millora en rapidesa a l'hora de dur a terme la fermentació. Per altra banda, també pot portar efectes negatius com l'aparició de components no desitjats com és l'àcid acètic i depenent del llevat pot arribar a produir problemes per a acabar la fermentació (Ciani and Maccarelli 1998; Clemente-Jimenez et al. 2005; Jolly et al. 2006; Fleet 2008; Viana et al. 2008; Comitini et al. 2010; Contreras et al. 2014).

Estudis previs mostren que existeix una interacció entre els llevats *No-Saccharomyces* i *S. cerevisiae* (Andorrà et al. 2012; Wang et al. 2014). En l'estudi que s'ha dut a terme com a part del screening del projecte s'ha treballat amb dues espècies que pertanyen al gènere *Hanseniaspora*. *H. uvarum* i *H. vineae* com a cultiu iniciador on s'ha inoculat *S. cerevisiae* a les 24h de fermentació amb la finalitat de determinar l'efecte sobre la posterior fermentació malolàctica.

1.2. *Oenococcus oeni* i la fermentació malolàctica

La fermentació malolàctica (FML) és la descarboxilació enzimàtica que pateix l'àcid màlic present en el most. Aquesta fermentació secundària es du a terme mitjançant l'acció dels bacteris làctics (BL), sent *Oenococcus oeni* la principal espècie de BL trobada al vi.

Aquesta transformació és beneficiosa en la vinificació de negres i d'alguns vins blancs amb alta acidesa. La descarboxilació de l'àcid L-màlic (dicarboxílic) en àcid L-làctic (monocarboxílic), un àcid més dèbil, és el que redueix l'acidesa del vi i també aconsegueix una major estabilitat microbiològica (Liu 2002; Alexandre et al. 2004).

Però no en tots els vins és un benefici, per contra, pot disminuir la qualitat d'aquest. Depenent del BL present i de l'acidesa inicial del vi pot donar lloc a productes no desitjats i caràcters organolèptics desagradables. A més de la producció de productes nocius per la salut com les amines biògenes i l'etil carbamat (Liu 2002).

Oenococcus oeni és la principal espècie utilitzada per a dur a terme la FML degut a l'alta resistència a les condicions extremes del vi que fa que s'imposi sobre les altres de forma natural i un bon candidat per la utilització d'inòculs. A més a més, generalment, aporta un bon perfil organolèptic al vi final (Liu 2002; Mendoza et al. 2011).

1.3. Interaccions entre llevats i bacteris làctics

Estudis anteriors demostren que hi ha una interacció entre *S. cerevisiae* degut a l'alta sensibilitat al medi dels bacteris làctics i més concretament d'*O. oeni*. Els canvis que les diferents soques poden produir fan que el medi en el que ha de sobreviure *O. oeni* sigui més o menys favorable a l'hora de dur a terme la fermentació malolàctica.

El metabolisme dels llevats pot aportar al medi alguns metabòlits que impossibilitin el creixement dels bacteris làctics. Els metabòlits que poden afectar en l'acció són les altes concentracions d'etanol o l'alliberació de diòxid de sofre entre altres procedents del metabolisme i lisi dels llevats. A més de consumir gran part dels nutrients existents en el most inicial i per tant deixant un medi pobre (Arnink and Henick-Kling 2005; Nehme et al. 2008).

Cal esperar que els canvis que produeixen els llevats *No-Saccharomyces* sobre els vins també seran motiu d'interacció sobre l'actuació d'*O. oeni*. Aquesta interacció tan pot ser positiva amb l'alliberació de substàncies nutrients com les manoproteïnes o el nitrogen que no es consumeix. Com pot ser negativa degut al augment de grau alcohòlic, SO₂ o fins i tot una reducció de l'àcid màlic necessari per al creixement d'*Oenococcus oeni* (Ciani and Maccarelli 1998; Diez et al. 2010; Belda et al. 2014).

2. MATERIALS I MÈTODES

2.1. Microorganismes, cultius, solucions i reactius

2.1.1. Microorganismes

Els microorganismes utilitzats en el següent treball són:

Taula 1 Relació de microorganismes utilitzats en aquest estudi

	Espècie	Soca
Llevats	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CECT 13130
	<i>H. uvarum</i>	CECT 10389
	<i>Hanseniaspora viniae</i>	TO25A (Uruguay)
	<i>H. viniae</i>	CECT 1471
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lalvin-QA23
Bacteris làctics	<i>Oenococcus oeni</i>	13W1 (1Pw13-8893CECT)
	<i>O. oeni</i>	Lallemmand Lalvin VP41
	<i>O. oeni</i>	CH11 Hansen
	<i>O. oeni</i>	PSU-1

2.1.2. Cultius, reactius i solucions

La relació de cultius utilitzats es troba descrita en l'Annex I

2.2. Preparació d'inòculs

2.2.1. Llevats

Per a l'obtenció de l'inòcul necessari d'una concentració de cèl·lules de 10^6 UFC/mL es recupera la soca que inicialment es troba conservada en plaques de Yeast-Peptone-Dextrose (YPD) (composició a l'Annex I) a 4°C. Aquesta recuperació consisteix en la sembra en medi YPD líquid. Aquest es deixa a l'estufa a 27°C durant 24-48h. A partir d'aquest es torna a sembrar en medi YPD líquid en un inòcul del 1% i aquest es deixa créixer 24 h. Al cap d'aquest temps es mesura la densitat òptica (DO) a 600 nm (Spectro

Genesis 10UV, ThermoScientific) per tal d'establir la concentració aproximada de cèl·lules mitjançant l'extrapolació en les corbes de creixement.

Un cop aquesta DO es troba en els valors considerats es fa el rentat de cèl·lules. Aquest consisteix en la centrifugació del medi (8.500 rpm 7 min). Es descarta el sobrenedant. Es torna a suspendre en solució salina 0,84% (Annex I) i es torna a centrifugar (8.500rpm 7 min). Es descarta el sobrenedant i el pellet es torna a suspendre en el most definitiu per al posterior inòcul.

2.2.2. *Oenococcus oeni*

Per a l'obtenció de l'inòcul necessari d'una concentració de cèl·lules de 10^7 UFC/mL es recupera la soca inicialment conservada a -20°C . Aquesta es sembra en Man, Rogosa and Sharpe malic and fructose (MRS_{mf}) líquid modificat (composició a l'annex I). Aquest medi permet reduir el temps de creixement de 7 dies a 48h aproximadament. Es deixa incubar en l'estufa a 28°C i 10% de CO_2 atmosfèric. A partir d'aquest es torna a sembrar en medi MRS_{mf} líquid modificat en un inòcul del 1% i aquest es deixa créixer 48h aproximadament en les mateixes condicions. Al cap d'aquest temps es mesura la densitat òptica (DO) a 600nm (Spectro Genesis 10UV, ThermoScientific) per tal d'establir la concentració aproximada de cèl·lules mitjançant l'extrapolació en les corbes de creixement.

Un cop la DO es troba dins dels valors considerats es repeteix el procediment de neteja de cèl·lules seguit en els llevats amb la diferència de que els protocols de centrifugat són de 10000 rpm i 5 min.

2.3. Fermentació alcohòlica

2.3.1. Most

La composició del most utilitzat va ser la següent:

Most rectificat concentrat (Most Concentrat Blanc 65 Brix, Concentrats Pallejà S.L.)	25%
Aigua destil·lada esterilitzada	75%

Solució d-Amonium Hydrogen Phosphate (10%)

(aprox.)70 mL

En un recipient prèviament esterilitzat es mesclen el most concentrat i l'aigua destil·lada esterilitzada. Un cop feta la mescla s'afegeixen aproximadament 70 mL de solució aquosa de d-Amonium Hydrogen Phosphate al 10% per ajustar la quantitat de nitrogen present a 300 mg/L.

La proporció utilitzada dels diferents components és orientativa ja que s'ajusta en base a la concentració de sucres final desitjada ($200 \text{ g/L} \pm 10 \text{ g/L}$) de la mateixa manera que es fa amb la quantitat de nitrogen per ajustar-la a 300 mg/L.

2.3.2. Fermentació alcohòlica

La fermentació del most es du a terme en ampolles de vidre de 500 mL estèrils que contenen 400 mL del most preparat i amb un sistema de cànula-vàlvula que permet l'evacuació del CO_2 produït durant la fermentació a més de permetre extreure la mostra sense haver d'obrir l'ampolla mitjançant la cànula. La fermentació es manté en l'estufa a 20°C i en agitació.

El llevat *No-Saccharomyces* s'inocula en una densitat de població de 10^6 UFC/mL. Després de 24 h s'inocula *Saccharomyces cerevisiae* QA23 en la densitat de població de 10^6 UFC/mL. La fermentació control per a la comparació de resultats es du a terme amb la inoculació única de *Saccharomyces cerevisiae* QA23.

Durant la fermentació es retirarà una mostra cada 24 h per a la determinació de la concentració de sucres i per al recompte de cèl·lules viables per veure l'evolució de població com es descriu en l'apartat **2.5.2. Monitorització de fermentacions**.

Un cop acabada la fermentació ($<0,5 \text{ g/L}$ de sucres), el vi obtingut es reparteix en tubs tipus falcon de 50mL i es centrifuga a 4.700 rpm durant 8 min. Un cop centrifugat, el sobrenedant es canvia de recipient repartint en 4 tubs tipus falcon de 50mL i la resta en una ampolla de 250 mL esterilitzada. Es tracten amb 1% de solució de dimethyl dicarbonat (Velcorin®) per acabar amb els llevats que poden haver quedat i es conserva a 4°C durant 24 h per a l'actuació i degradació del producte. Després d'aquest temps es sembra en plaques YPD sòlid per a confirmar el creixement nul. Només així es considera apte per a dur a terme la fermentació malolàctica.

2.4. Fermentació malolàctica

La fermentació malolàctica es du a terme en tubs tipus falcon amb 50 mL del vi que ha resultat de la fermentació alcohòlica. La soca d'*O. oeni* s'inocula en una densitat de població de 10^7 UFC/mL. Aquesta es conserva a l'estufa a 20°C sense agitació.

Durant la fermentació es treu mostra 1 h després d'inocular per a fer recompte de cèl·lules viables i després cada 24 h per a controlar la concentració d'àcid màlic. Un cop acabada la fermentació (<0,3g/L d'àcid L-màlic) s'extreu mostra per a fer recompte de cèl·lules viables finals i es centrifuga a 4.700 rpm 8 min 4°C i es conserva el vi resultant a 4°C per al posterior estudi.

2.5. Caracterització del most i del vi

2.5.1. Most

Després de preparar el most s'extreu mostra per a les diferents mesures necessàries per al control posterior. Es mesura concentració de sucres (glucosa + fructosa), nitrogen amínic, nitrogen amònic i àcid L-màlic mitjançant el multianalitzador químic Miura One (TDI SL, Gavà, Spain) (ISE S.r.l., Ref.: 13310001200). A més també es mesura el pH inicial.

2.5.2. Monitorització de fermentacions

La presa de mostres per a control diari es duia a terme cada 24 h fins a la finalització de les fermentacions per al control de l'evolució de població i de la variació en la concentració de sucres en el cas de les FAL i de l'àcid L-màlic en el cas de les FML.

Per a l'anàlisi de concentracions, la mostra es sotmet a centrifugació (10.000 rpm 5 min) per a ser analitzada mitjançant el multianalitzador Miura One. En el cas de concentració de sucres estimada per sobre de 6 g/L, la mostra s'ha de diluir per a fer possible aquest anàlisi. L'àcid màlic es manté en tots els casos dins dels paràmetres del multianalitzador.

Per al control de variacions de població es pren 100 µL de mostra i mitjançant les dilucions apropiades en solució salina s'inoculen en YPD sòlid i medi agar lisina

(composició a l'Annex I). Aquestes s'incuben a 28°C durant aproximadament 48 h. El recompte de colònies en els medi YPD ens dona la quantitat de llevats totals presents en la fermentació. El recompte en medi agar lisina ens donarà el nombre de cèl·lules pertanyents a *No-Saccharomyces* ja que *S. cerevisiae* no és capaç de créixer amb la lisina com a única font de nitrogen.

En el cas de la FML l'estudi de l'evolució de la població es du a terme a 1 h de la inoculació i a la finalització de la fermentació. Com en el cas de la fermentació alcohòlica es prenen 100 µL de mostra i degudament diluïda en solució salina es sembra en plaques de MRS_{mf} sòlid. S'incuba en l'estufa a 28°C amb 10% de CO₂ atmosfèric durant 7 dies. Després d'aquest temps es pot fer el recompte.

2.5.3. Anàlisi química del vi

L'anàlisi de tots els paràmetre químics es realitza mitjançant el multianalitzador Miura One. A més de la mesura del pH mitjançant un pH metre.

Anàlisis al multianalitzador:

Taula 2 Fermentació alcohòlica: Relació d'anàlisi al vi

Nitrogen amònic (mg/L)	Àcid D-làctic (mg/L)
Nitrogen α - amínic (mg/L)	Àcid cítric (g/L)
Àcid L – màlic (g/L)	Àcid acètic (g/L)
Glicerol (g/L)	Àcid succínic (mg/L)
SO ₂ lliure (mg/L)	Acetaldehid (mg/L)
SO ₂ total (mg/L)	Àcid pirúvic (mg/L)

Taula 3 Fermentació malolàctica: Relació d'anàlisi al vi

Nitrogen amònic (mg/L)	Àcid L-làctic
Nitrogen amínic (mg/L)	Àcid cítric
Àcid acètic	Acetaldehid (mg/L)

2.5.4. Mesura del grau alcohòlic

La mesura del grau el alcohòlic es fa mitjançant ebulliometria (Ebulliometre electrònic uEBU6576, GabSystem). Es prenen 100 mL de mostra per aquesta fi.

L'ebulliometre porta a ebullició la mostra. Amb aquesta temperatura i una roda de càlcul calibrada mitjançant la temperatura d'ebullició d'un patró de concentració d'etanol coneguda es pot determinar el grau alcohòlic del vi.

2.5.5. Acidesa total

L'acidesa total es determina mitjançant la valoració de 5mL de mostra de vi amb NaOH 0,1 N. Mitjançant el pH metre es controla el pH de la mostra i es va anar afegint NaOH fins a portar-la fins a pH 7. Els mL de solució NaOH gastats i mitjançant un factor de conversió s'aconsegueix el valor de l'acidesa total.

Factor de conversió:

$$\begin{aligned} \text{Volum mL NaOH} \cdot \frac{0,1N}{1000\text{mL}} \cdot \frac{1\text{mol H}_2\text{T}}{2\text{mol NaOH}} \cdot \frac{150\text{g H}_2\text{T}}{1\text{mol H}_2\text{T}} \cdot \frac{1}{0,005} = \\ = \text{Volum mL NaOH} \cdot 1,5 = \textbf{acidesa total} \end{aligned}$$

Figura 1 Fórmula per al càlcul de l'acidesa total

2.5.6. Proteïna total

Es va determinar mitjançant el mètode Bradford. Aquest consisteix en la preparació d'una recta de calibrat amb diferents concentracions conegudes de BSA (bovine serum albumin) juntament amb el reactiu Bradford.

Taula 4 Preparació de la corba de calibrat per a la determinació de proteïnes totals.

[] µg/mL (BSA)	µL H ₂ O	µL BSA (20µg/mL)
0	1000	0
5	750	750
10	500	500
15	250	750
20	0	1000

Posteriorment se li afegeix el reactiu Bradford tant a les mostres desconegudes com en les de la corba. Després del temps d'incubació es mesura l'absorbància a 595 nm.

Un cop aconseguits els valors d'absorbància de la corba de calibrat es poden extrapolar els valors de les mostres a determinar per saber el contingut de proteïnes totals.

2.5.7. Manoproteïnes

La determinació de manoproteïnes es va fer mitjançant 5 mL de mostra tractada i hidrolitzada mitjançant el kit Megazyme (K-Mangl 02/15) i el mètode segons descrit a l'Annex I.

2.6. Plaques de difusió

Es van preparar diferents plaques en medi específic (composició en l'Annex I) per avaluar el creixement. Es van sembrar les diferents soques d'*O. oeni* que estaven a una densitat òptica (DO) de 1,5. Es van sembrar 1 mL repartint per tota la superfície. Un cop està absorbit es van col·locar els discs impregnats amb els vins resultants. Aquestes es van incubar a l'estufa a 28°C i amb un 10% de CO₂ durant 48 h aproximadament.

2.7. Anàlisi estadístic

Per al tractament estadístic de les dades s'ha utilitzat el software d'estadística *XLSTAT* versió 19.03.45028.

S'han dut a terme un mínim de dues repeticions per a cada fermentació per tal de calcular el valor mitjà i d'analitzar la desviació. Les dades obtingudes van ser sotmeses a un anàlisi ANOVA multivariant amb un anàlisi posterior mitjançant el test de Tukey considerant els resultats significatius quan el p -valor $\leq 0,05$.

També s'ha dut a terme un anàlisi de components principals (PCA) per determinar de forma visual les diferències entre els vins aconseguits.

3. RESULTATS

3.1. Fermentació alcohòlica

3.1.1. *Hanseniaspora uvarum*

El comportament que s'ha observat en les fermentacions seqüencials amb *Hanseniaspora uvarum* és la velocitat de degradació de sucres (línia discontinua (---) de la Figura 2 i Figura 3), molt més lenta que en el control. La duració de les fermentacions, tenint en compte les dues soques estudiades, oscil·la entre 250 i les 350 h mentre que en el cas de la control és de 144 h. La velocitat mitjana de degradació de sucres en el control és de $1,32 \pm 0,20$ g/L/h, mentre que s'observen diferències significatives respecte la velocitat mitjana de les soques 13130 i 10389 que són $0,84 \pm 0,25$ i $0,77 \pm 0,05$ g/L/h respectivament.

Pel que fa a l'evolució de les poblacions (línia continua (—) de la Figura 2 i Figura 3), podem observar unes poblacions en el seu punt màxim d'una densitat entre 10^7 i 10^8 UFC/mL tant els casos de *Saccharomyces* com de *No-Saccharomyces*. També cal destacar que les poblacions de la fermentació control assolixen una població màxima més elevada que en les seqüencials.

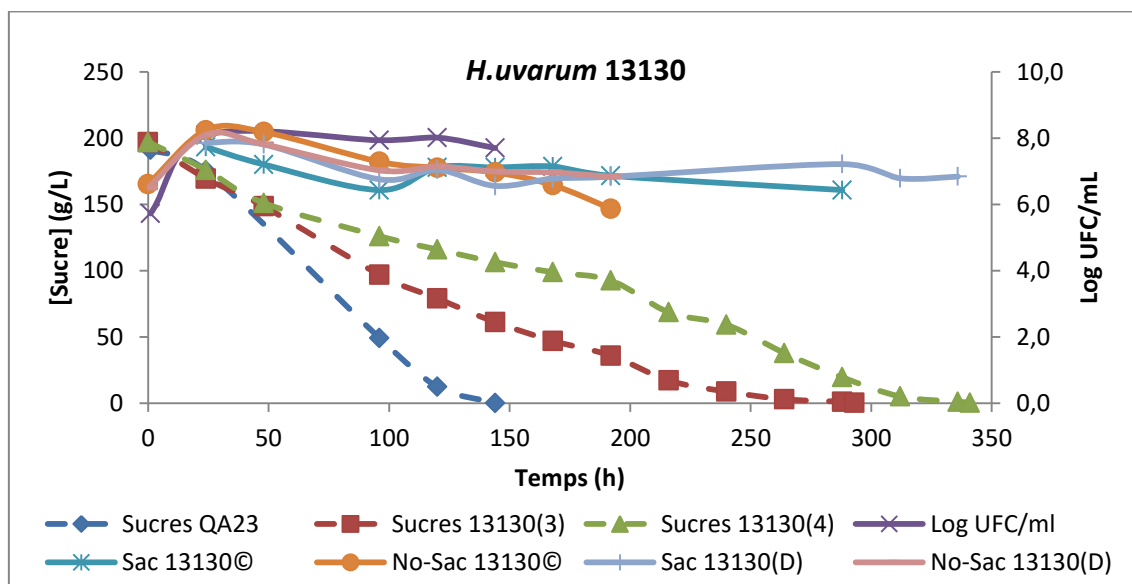


Figura 2 Seguiment de l'evolució de la fermentació alcohòlica amb *H. uvarum* 13130. Consum de sucres (- - -), i l'evolució de la població de llevats (—).

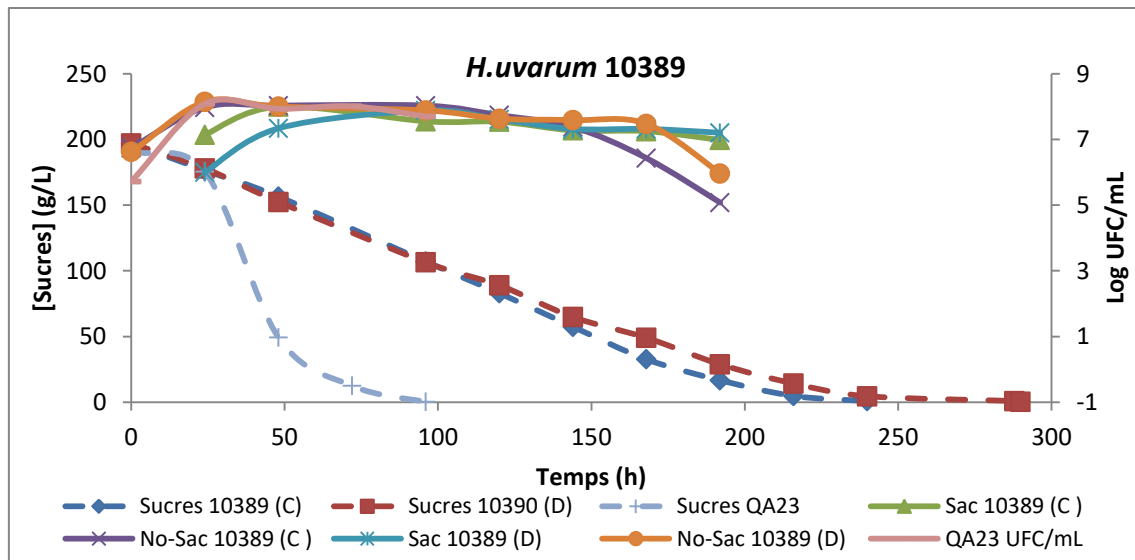


Figura 3 Seguiment de l'evolució de la fermentació alcohòlica amb *H.uvarum* 10389. Consum de sucres (- - -), i l'evolució de la població de llevats (—).

Respecte a la composició i caracterització del vi que trobem a la Taula 5 podem destacar que s'observen diferències significatives en la concentració d'àcid L-màlic residual, aquest és inferior en el cas de les fermentacions seqüencials respecte a la control. De la mateixa manera que s'observa una diferència significativa en l'acidesa total, que encara que aquesta vingui determinada per la concentració dels diferents àcids que podem trobar en el vi pot estar afectada per la presència de l'àcid màlic.

Un altre paràmetre en el que s'observa una diferència significativa és en la concentració de glicerol, ja que es troba lleugerament més elevada en les fermentacions seqüencials respecte la producció de d'aquest per part de *S.cerevisiae*.

Dels paràmetres mesurats, l'àcid acètic i l'acetaldehid són de gran importància en l'efecte sobre el perfil organolèptic del vi, ja que si es troben en excés poden comportar defectes greus en el vi. En el cas que ens ocupa podem observar que l'àcid acètic es troba molt per sobre dels valors control i per tant es faran detectables a l'hora de l'anàlisi sensorial. Pel que fa a l'acetaldehid s'observa un augment respecte el control però no es considera significatiu en les dues soques analitzades.

Per últim, d'aquesta espècie, cal destacar els nivells més elevats de SO₂ totals respecte a la resta d'espècies treballades. Els valors de SO₂ totals de la soca 13130 són

130,50±76,74 mg/L i en el cas de 10389 estan en 165,50±83,45 mg/L. Aquests valors, encara que amb una desviació estàndard molt elevada segueixen sent molt significatius respecte el control (5,67±4,73 mg/L) i respecte *H. vinæ* en el que no hi ha detecció.

3.1.3. *Hanseniaspora vinæ*

Un cop estudiat el comportament a l'hora de fermentar de *H. vinæ* hem pogut veure (línia discontinua de la Figura 4 i Figura 5) que en les dues soques estudiades (TO25A i 1471) el 99% dels sucres es consumeix en 120 h i 100 h respectivament. Una diferència que no es considera significativa respecte el control.

En l'estudi de l'evolució de la població (línia continua (—) en la Figura 4 i Figura 5) es pot veure que les poblacions del llevat *No-Saccharomyces* que s'han inoculat a una densitat de població de l'ordre de 10^6 UFC/mL augmenten al cap de 24 h de la inoculació igual que es comporta el control. A mida que avança la fermentació la població va disminuint però es troba població de les dues soques fins al final de la fermentació.

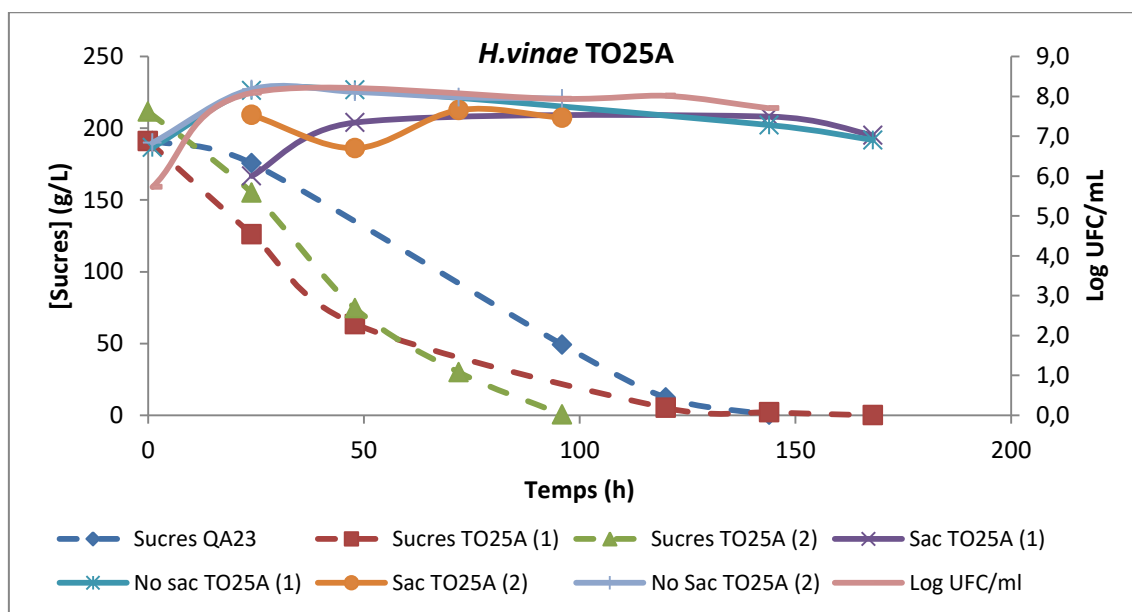


Figura 4 Seguiment de l'evolució de la fermentació alcohòlica amb *H. vinæ* TO25A. Consum de sucres (- - -), i l'evolució de la població de llevats (—).

També podem observar que *S. cerevisiae* no augmenta tant la població quan es troba en la fermentació seqüencial amb *H. uvarum* (Figura 2 i Figura 3) i *H. vinæ* (Figura 4 i

Figura 5) com quan es troba en cultiu únic tot i que la població es manté per sobre de 10^7 UFC/mL.

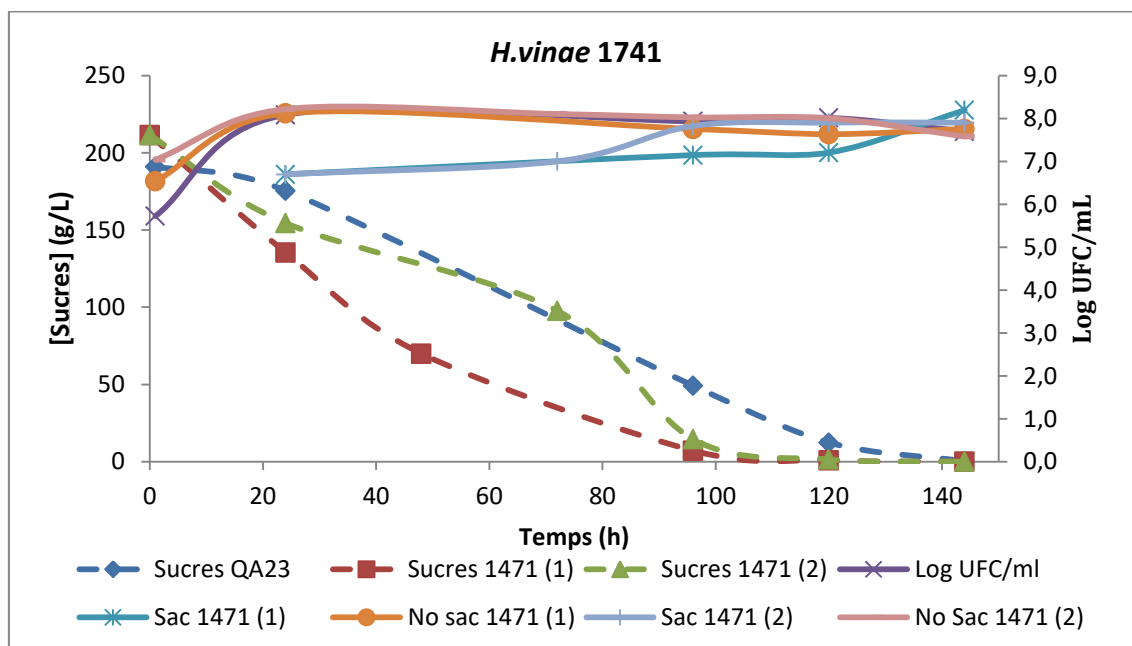


Figura 5 Seguiment de l'evolució de la fermentació alcohòlica amb *H. viniae* 1741, Consum de sucres (- - -), i l'evolució de la població de llevats (—).

En la caracterització química dels vins obtinguts que es pot veure en la Taula 5 no existeix una diferència significativa en el grau alcohòlic que es manté en un valor mitjà de 12,5°.

En el cas de la utilització de les soques de *No-Saccharomyces* s'ha vist que produeix un augment estadísticament significatiu del pH (Taula 5) que pot estar explicat per la menor presència en el medi d'àcid L-màlic. Ja que en la fermentació control veiem que la concentració final després de la FAL és superior que en les fermentacions seqüencials. D'igual manera s'observen diferències significatives en l'acidesa total, una reducció d'aquesta respecte el control.

La concentració de nitrogen (Taula 5), tan el nitrogen amònic com el nitrogen amínic, s'ha vist que té molta variabilitat fins i tot dins de la mateixa soca. En general si que hi ha un consum de nitrogen però no deixen el medi tan empobrit en nitrogen total com en el cas de la fermentació control.

Un dels paràmetres importants en quan al tema organolèptic és la concentració d'àcid acètic. En aquest cas s'ha observat (Taula 5) un augment significatiu d'aquest àcid i per tant podria afectar negativament en el perfil organolèptic. Juntament amb aquest, un altre compost que pot afectar aquest aspecte és la presència d'acetaldehid. S'ha observat una elevació estadísticament significativa en les fermentacions amb la soca 1471.

Considerant les dues soques de *H. vineae* s'ha pogut veure que la quantitat de SO₂ tant el total com en forma lliure (Taula 5) són nivells dins de l'esperat, molt propers als nivells trobats en la fermentació control.

3.2. Fermentació malolàctica

Després de la finalització de la fermentació alcohòlica s'han inoculat els vins resultants amb les diferents soques d'*Oenococcus oeni* (13W1, PSU-1, VP41 i CH11).

Com a observació principal a la finalització d'aquesta fase podem dir que en els vins obtinguts mitjançant la fermentació seqüencial amb *H. vineae* no ha presentat problemes per a dur a terme la fermentació malolàctica. Mentre que en el cas de la *H. uvarum*, la soca 10389 ha acabat les fermentacions en 3 de les 4 rèpliques realitzades encara que aquestes han estat a una velocitat molt més lenta (Taula 8) que en *H. vineae* (Taula 9). I en el cas de la soca 13130 la fermentació malolàctica només ha pogut arribar a terme en la primera rèplica mentre que en les altres rèpliques només la soca PSU-1 ha estat capaç d'acabar-la. Les altres soques no han estat capacitades per consumir l'àcid màlic present en el medi.

Pel que fa a les dinàmiques de poblacions s'inoculen totes les fermentacions a una densitat de cèl·lules de 10⁷ UFC/mL. Després de la monitorització de la fermentació veiem que es manté i en alguns casos augmenta discretament la quantitat de cèl·lules presents en la fermentació. Només en els casos de les fermentacions que no van arribar a funcionar s'ha trobat que la població de cèl·lules trobada inicial era la correcta però al tornar a analitzar al cap de 4 dies sense consum d'àcid màlic trobem que la població de cèl·lules viables ha desaparegut quasi completament.

Taula 5 Taula resum de la caracterització del vi després de la fermentació alcohòlica.

FAL	Grau alcohòlic	Velocitat degradació de sucre (g/L/h)	pH	Nitrogen amònic (mg/L)	Nitrogen α -amínic (mg/L)	Àcid acètic (g/L)	Àcid L- màlic (g/L)	Glicerol (g/L)	Acetaldehid (mg/L)	SO ₂ lliure (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)	Manoproteïnes (mg/L)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>												
13130	13,0±0,4	0,84±0,25b	3,449±0,150	13,25±14,01	35,87±30,16	0,88±0,28a	1,81±0,07b	7,55±0,33a	64,50±16,74b	10,25±6,24	130,50±76,74a	102,49±84,47
10389	13,0±0,6	0,77±0,05b	3,538±0,096	39,67±20,37	39,64±16,67	1,00±0,34a	1,86±0,03b	7,60±0,49a	81,75±29,97b	10,75±5,74	165,50±83,45a	138,91±127,53
<i>Hanseniaspora viniae</i>												
TO25A	12,3±0,0	1,67±0,75a	3,454±0,079	102,02±144,28	11,90±14,00	0,52±0,02ab	1,60±0,08b	6,40±0,00b	35,00±14,14b	1,50±0,71	ND	220,72±27,44
1471	12,7±0,0	1,47±0,00ab	3,528±0,012	10,00±0,00	64,28±28,19	0,40±0,00ab	1,61±0,08b	6,40±0,00b	204,00±48,08a	3,50±0,71	ND	220,72±27,44
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>												
QA23	12,5±0,0	1,32±0,20a	3,322±0,172	5,00±4,00	39,01±29,32	0,04±0,01b	2,21±0,18a	6,67±0,46ab	45,33±9,50b	1,33±1,15	5,67±4,73a	86,87±94,70

Les lletres presents a la taula indiquen diferències estadísticament significatives.

Taula 6 Caracterització del most inicial.

	[Sucres] g/L	Nitrogen amònic (mg/L)	Nitrogen α amin (mg/L)	Àcid L-màlic (g/L)	pH
Most inicial	198,88±9,33	240,50±4,04	87,74±8,57	2,35±0,20	4,166±0,122

Taula 7 Fermentació malolàctica de *S. cerevisiae* QA23 amb les quatre soques d'*O. oeni*.

	<i>S. cerevisiae</i>	13W1	PSU-1	VP41	CH11
QA23	Vel deg màlic (g/L/h)	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	Ac. Acètic (g/L)	0,22±0,06	0,21±0,01	0,22±0,06	0,20±0,04
	Acetaldehid (mg/L)	0,21 ± 0,05	0,17 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,22 ± 0,03
	pH	3,555 ± 0,131	3,583 ± 0,121	3,583 ± 0,121	3,613 ± 0,107

Taula 8 Fermentació malolàctica de *H. uvarum* amb les quatre soques d'*O. oeni*.

	<i>H. uvarum</i>	13W1	PSU-1	VP41	CH11
13130	Vel deg màlic (g/L/h)	0,01±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01	0,03±0,02
	Ac. Acètic (g/L)	1,06±0,23	1,09±0,21	0,99±0,15	1,02±0,19
	Acetaldehid (mg/L)	39,67±33,01	37,33±17,47	36,33±22,12	32,33±32,72
	pH	3,504±0,211	3,635±0,074	3,563±0,152	3,552±0,230
	Àcid cítric (g/L)	0,27±0,10	0,11±0,01	0,20±0,05	0,23±0,15
	SO2 lliure (mg/L)	7,00±0,00	7,00±1,41	7,00±1,41	9,50±2,12
	SO2 total (mg/L)	97,00±7,07	110,00±8,49	91,00±8,49	94,00±9,90
10389	Vel deg màlic (g/L/h)	0,01±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
	Ac. Acètic (g/L)	1,00±0,39	0,99±0,36	0,97±0,37	0,93±0,32
	Acetaldehid (mg/L)	17,00±0,00	31,50±3,54	23,50±0,71	25,00±1,41
	pH	3,685±0,108	3,712±0,088	3,690±0,074	3,695±0,079

De manera remarcable, en la soca 13130 (Taula 8), l'alt contingut de SO₂ total és un dels trets característics que la diferencia de les altres situacions tot i que s'observa una disminució respecte al contingut final després de la fermentació alcohòlica (Taula 5).

Taula 9 Fermentació malolàctica de *H. vineae* amb les quatre soques d'*O. oeni*

	<i>H. vineae</i>	13W1	PSU-1	VP41	CH11
TO25A	Vel deg màlic (g/L/h)	0,02±0,00	0,05±0,01	0,02±0,00	0,02±0,00
	Ac. Acètic (g/L)	0,80 ± 0,05	0,82 ± 0,04	0,82 ± 0,11	0,83 ± 0,10
	Acetaldehid (mg/L)	2,00±2,83	10,50±12,02	ND	6,00±1,41
	pH	3,734 ± 0,053	3,743 ± 0,032	3,740 ± 0,047	3,730 ± 0,009
1471	Vel deg màlic (g/L/h)	0,02±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00
	Ac. Acètic (g/L)	0,62 ± 0,01	0,56 ± 0,04	0,55 ± 0,02	0,55 ± 0,01
	Acetaldehid (mg/L)	49,50±4,95	48,50±7,78	46,50±10,61	51,50±0,71
	pH	3,805 ± 0,023	3,814 ± 0,018	3,814 ± 0,024	3,801 ± 0,030

Pel que fa a l'anàlisi estadístic per a determinar la significança dels resultats en la FML es troba en l'Annex II.

3.2.1. *Oenococcus oeni* 13W1

En les fermentacions malolàctiques dutes a terme per la soca 13W1 trobem que existeix una diferència significativa (Annex II. Taula 1) en el contingut d'àcid acètic respecte a les fermentacions control (Taula 7). Aquest es troba especialment elevat en les fermentacions que impliquen a l'espècie de No-*Saccharomyces H. uvarum* (Taula 8).

També en les fermentacions provinents de la seqüència amb *H. uvarum* trobem un augment de nitrogen amònic present en el medi en les fermentacions que finalment no van tirar endavant.

3.2.2. *Oenococcus oeni* PSU-1

Com a fet remarcable, aquesta soca d'*O. oeni* ha estat la única que ha pogut completar la fermentació malolàctica en tots els vins tant control com els que han participat els llevats *Hanseniaspora*.

També s'ha observat que la velocitat de degradació del màlic és significativament més alta (Annex II. Taula 2) en el cas de les fermentacions amb la participació de qualsevol de les dues *H. vineae* (Taula 9).

Com ja s'ha comentat amb anterioritat, la concentració d'àcid acètic és remarcablement més alta en comparació al contingut control. I com a fet puntual en aquesta soca PSU-1 trobem un augment significatiu d'acetaldehid en les fermentacions control, mentre que en les fermentacions seqüencials de No-*Saccharomyces* no s'observa (Taula 8 i Taula 9).

3.2.3. *Oenococcus oeni* VP41 i CH11

En el cas de les dues soques VP41 i CH11 no s'han trobat diferències significatives entre les diferents fermentacions excepte el cas de la concentració de l'àcid acètic (Annex II. Taula 3 i Annex II. Taula 4), que ha estat una característica constant en les fermentacions seqüencials. S'observa un augment de la concentració d'aquest àcid en les dues espècies de *Hanseniaspora* que s'han treballat (Taula 8 i Taula 9), i de manera

molt més marcada en *H. uvarum* (Taula 8). La resta de paràmetres no s'observa cap diferència significativa amb el control.

3.3. Plaques de difusió

Aquest mètode està en fases inicials de desenvolupament per a poder estudiar la inhibició de creixement de les soques d'*O. oeni* mitjançant l'halo d'inhibició que es produeix al voltant dels discs impregnats. Un exemple dels resultats preliminars obtinguts (Figura 6) mostren un creixement elevat en *H. vineae* TO25A mentre que s'aprecia un petit halo d'inhibició al voltant de les dues soques de *H. uvarum*.

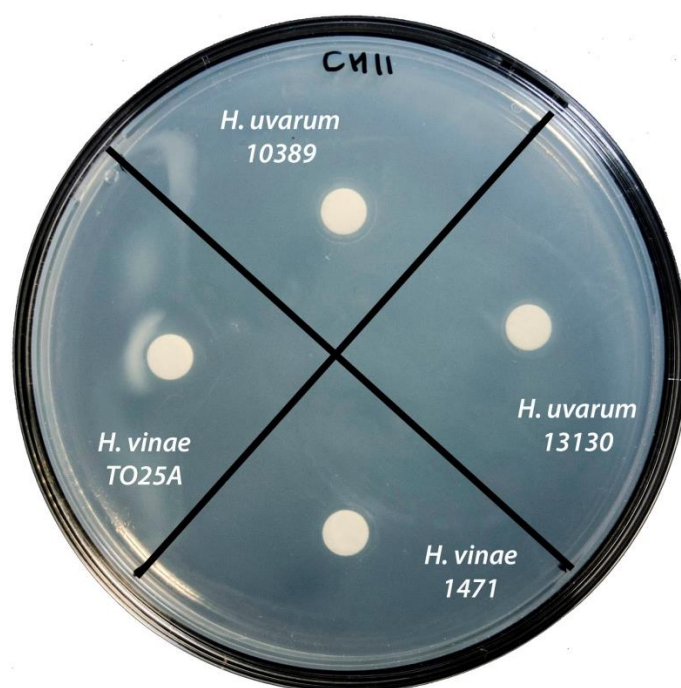


Figura 6 Creixement d'*O. oeni* CH11 amb les quatre soques de *Hanseniaspora*

3.4. Anàlisi de components principals (PCA)

S'ha dut a terme un anàlisi de components principals (Figura 7) amb les dades obtingudes de la fermentació alcohòlica. S'han utilitzat les variables descriptives que s'han considerat més significatives en el test de Tukey per veure si hi havia diferenciació de les espècies o soques utilitzades.

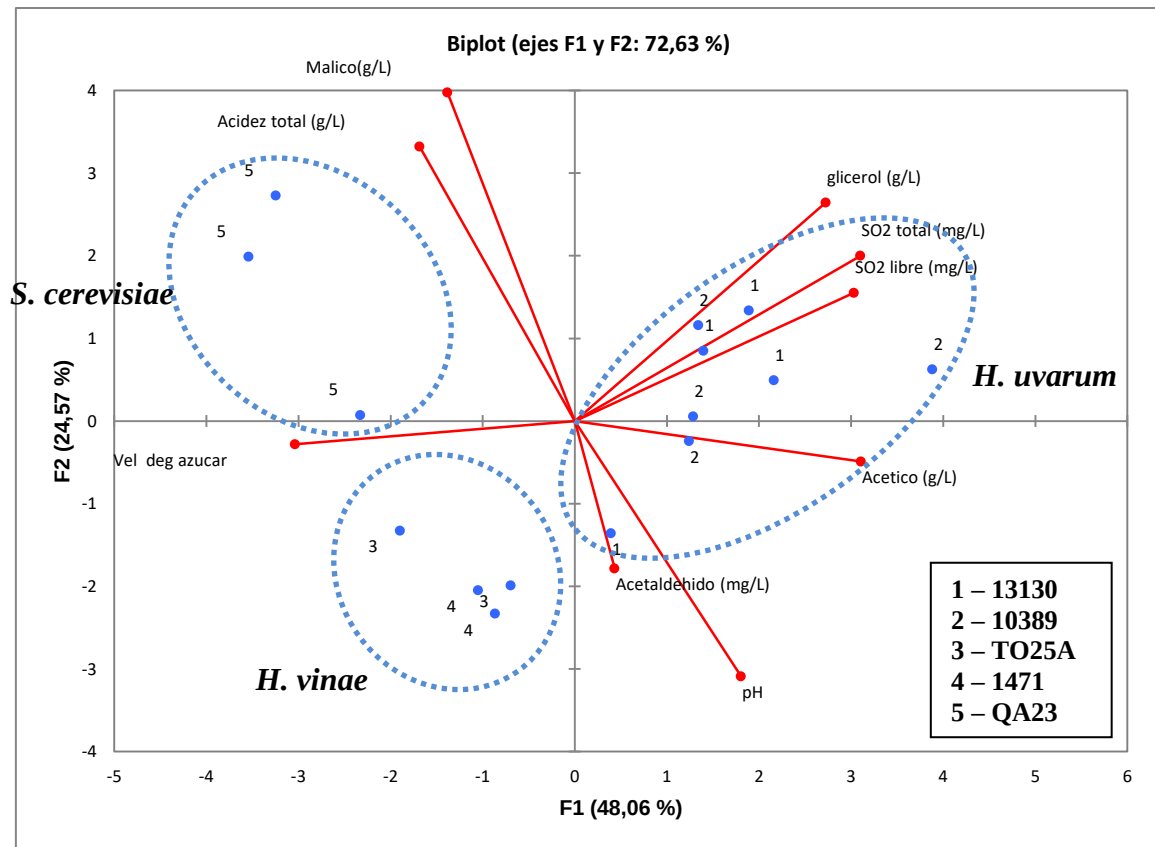


Figura 7 Anàlisi de components principals amb les variables obtingudes al final de la fermentació alcohòlica.

4. DISCUSSIÓ

Existeix poca literatura publicada sobre l'efecte de la utilització de llevats No-*Saccharomyces* en el procés de la fermentació malolàctica (Ramírez et al. 2016) i degut al creixent interès en l'ús d'aquests llevats com a participants en la fermentació alcohòlica es fa palès la necessitat d'estudiar l'efecte que aquests tenen sobre l'acció d'*Oenococcus oeni* i la fermentació malolàctica.

Com hem pogut observar en els resultats, el fet d'utilitzar la fermentació seqüencial amb llevats No-*Saccharomyces* efectivament ens dona perfils molt diferents (Taula 5) en el vi resultant. I com hem pogut constatar, aquests canvis poden conduir a fermentacions malolàctiques amb problemes en el cas de *H. uvarum* però també a FML sense cap problema a l'hora de consumir l'àcid màlic com en el cas de *H. viniae*.

La capacitat de les soques de No-*Saccharomyces* juntament amb *Saccharomyces cerevisiae* estudiades per consumir els sucres presents en el most és variable però si que arriben a concluir-la ([Sucres]<0,5 g/L). Relacionat amb aquesta capacitat semblant al control, podem observar que el grau alcohòlic (Taula 5) no varia significativament entre les fermentacions estudiades ($12,75^{\circ}\pm 0,43$).

En la fermentació alcohòlica control s'observa un augment més elevat de la població màxima de *S. cerevisiae* mentre que en les seqüencials, tot i augmentar, no assoleix màxims tan alts. Això podria ser degut a la competència amb les soques de No-*Saccharomyces* presents i tot i que s'acaba imposant no té la mateixa facilitat que es troba en un cultiu únic.

La presència d'àcid L-màlic que trobem en els vins obtinguts per fermentacions seqüencials (Taula 5) és significativament menor que en el cas de *S. cerevisiae* i de la que es troba en l'anàlisi de most inicial (Taula 6). D'aquesta manera es pot deduir que hi ha un petit consum d'aquest àcid per part de *Hanseniaspora*, deixant el medi lleugerament més empobrit per a *O. oeni*.

Un dels paràmetres amb més variabilitat i que no ha seguit cap patró visible és la concentració de nitrogen, tan l'amònic i l' α -amínic (Taula 5). Aquest fet pot ser donat per les diferents necessitats dels microorganismes en el cas de la fermentació alcohòlica.

Mentre que en el cas de la fermentació malolàctica sí que s'observa que les fermentacions que no van acabar presenten una concentració major, que possiblement és degut a la lisi de les cèl·lules ja que no es va detectar creixement en la monitorització de viables.

Una de les principals característiques en la utilització de llevats No-*Saccharomyces* és l'augment de la concentració de l'àcid acètic (Bely et al. 2008; Viana et al. 2011; Lu et al. 2017). En el present estudi també s'ha observat un augment d'aquest durant la fermentació alcohòlica (Taula 5) i un augment posterior d'aquest durant la fermentació malolàctica com a part del metabolisme d'*O. oeni* sobretot les soques PSU-1 i CH11 en combinació amb *H. uvarum* (Taula 8).

L'acetaldehid és un dels components que es veu augmentat en les fermentacions amb No-*Saccharomyces* (Medina et al. 2009; Whitener et al. 2017). En el cas de les dues espècies estudiades de *Hanseniaspora* trobem un augment de l'acetaldehid durant la fermentació alcohòlica sobretot en la soca 1471 de *H. vinæ* (204,00±48,08 mg/L). Aquest es veu disminuït per la fermentació malolàctica donada la capacitat d'*Oenococcus oeni* de consumir-lo.

El SO₂ és el producte utilitzat com a protector del most per evitar creixement de microorganismes no desitjats a més de per la seva activitat antioxidant (Mehlomakulu et al. 2014). S'ha vist que algunes soques de llevats No-*Saccharomyces* poden produir certa quantitat de SO₂ (Fleet 2003). En aquest estudi s'ha vist que *H. uvarum* 13130 té una producció elevada d'aquest component i probablement és la principal raó per la qual la majoria de fermentacions malolàctiques que es van intentar van fracassar ja que els bacteris làctics tenen una alta sensibilitat (Carreté et al. 2002). Per altra banda també hem pogut observar que la soca PSU-1, tot i les altes concentracions de SO₂, ha estat capaç de dur a terme la FML.

Les manoproteïnes són un grup de macromolècules que en condicions de laboratori produeixen un augment del creixement dels bacteris làctics (Diez et al. 2010). En aquest estudi no s'han trobat efectes significatius sobre la fermentació malolàctica ni el creixement en les condicions del vi.

Després d'analitzar les dades mitjançant ANOVA es pot extreure les variables que són significatives en la caracterització dels vins aconseguits per les diferents fermentacions d'aquest estudi. Tenint en compte aquestes variables s'ha aplicat un anàlisi de components principals (PCA) (Figura 7) per intentar veure si mitjançant aquestes es podia veure una diferenciació de les diferents espècies i soques utilitzades. Després de l'anàlisi podem veure que sí que existeix una diferència entre les diferents espècies. Per contra, no s'observen diferències entre soques de la mateixa espècie.

5. CONCLUSIONS I PERSPECTIVES

Per a concluir aquest estudi portat a terme sobre l'efecte de l'ús de No-*Saccharomyces* durant la fermentació alcohòlica sobre *Oenococcus oeni* i la fermentació malolàctica podem dir que en el cas de *Hanseniaspora* s'han observat efectes significatius sobre el comportament del bacteri làctic. Aquest és molt variable depenent de l'espècie i inclús de la soca emprada com demostra les diferències que existeixen entre les quatre soques de *Hanseniaspora* estudiades.

El mètode de detecció de la inhibició mitjanant les plaques de difusió és un mètode amb potencial per a la comparació ràpida i la detecció dels efectes més immediats i evidents sobre *O. oeni*.

Actualment es tenen resultats preliminars de l'anàlisi sensorial dut a terme en els vins aconseguits. Aquest estudi està en fase de desenvolupament però sembla ser que podria detectar diferències entre les diferents soques tant de *Hanseniaspora* com d'*O. oeni*.

Després de dur a terme aquest estudi i de constatar quines soques poden afectar més a la supervivència està previst un estudi en profunditat d'aquestes i la investigació dels efectes a nivell molecular com és l'estudi transcriptòmic i proteòmic a més de l'activitat enzimàtica. Posteriorment es farà una comprovació dels resultats mitjançant estudis a més gran escala en condicions de celler.

6. AGRAÏMENTS

M'agradaria agrair l'oportunitat de dur a terme aquest treball en un grup d'investigació com és el de bacteris làctics amb Cristina Reguant i Albert Bordons on m'han fet sentir molt ben acollida i on he pogut aprendre molt.

També agrair el gran suport rebut diàriament i el treball en equip a Maria Isabel Araque, Núria Ferrando i Gabriel Thornes, sense els quals aquest treball no seria possible.

A més, voldria donar les gràcies als companys del grup de Tecnologia enològica (TecnEnol) Olga Pascual, Júlia Alegre, Jordi Gombau, Pere Pons, Marta Conde i Samanta Prat per l'ajuda i el suport rebut.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alexandre H, Costello PJ, Remize F, Guzzo J, Guilloux-Benatier M. (2004). Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni interactions in wine: Current knowledge and perspectives. *Int J Food Microbiol.* 93(2):141–54.
- Andorrà I, Berradre M, Mas A, Esteve-Zarzoso B, Guillamón JM. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT - Food Sci Technol.* 49(1):8–13.
- Arnink K, Henick-Kling T. (2005). Influence of Saccharomyces cerevisiae and Oenococcus oeni Strains on successful malolactic conversion in wine. *Am J Enol Vitic.* 56(3):228–37.
- Belda I, Navascués E, Marquina D, Santos A, Calderon F, Benito S. (2014). Dynamic analysis of physiological properties of Torulaspora delbrueckii in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(4):1911–22.
- Beltran G, Torija MJ, Novo M, Ferrer N, Poblet M, Guillamón JM, et al. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Syst Appl Microbiol.* 25(2):287–93.
- Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdieu D. (2008). Impact of mixed Torulaspora delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol.* 122(3):312–20.
- Carreté R, Vidal MT, Bordons A, Constantí M. (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of Oenococcus oeni. *FEMS Microbiol Lett.* 211(2):155–9.
- Ciani M, Maccarelli F. (1998). Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World J Microbiol Biotechnol.* 14(2):199–203.
- Clemente-Jimenez JM, Mingorance-Cazorla L, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-

- Vázquez FJ, Rodríguez-Vico F. (2005). Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int J Food Microbiol.* 98(3):301–8.
- Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, et al. (2010). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines. *Food Microbiol.* 44(5):15–23.
- Contreras A, Hidalgo C, Henschke PA, Chambers PJ, Curtin C, Varela C. (2014). Evaluation of non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Appl Environ Microbiol.* 80(5):1670–8.
- Diez L, Guadalupe Z, Ayestarán B, Ruiz-Larrea F. (2010). Effect of yeast mannoproteins and grape polysaccharides on the growth of wine lactic acid and acetic acid bacteria. *J Agric Food Chem.* 58(13):7731–9.
- Fleet GH. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol.* 86(1–2):11–22.
- Fleet GH. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8(7):979–95.
- Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS. (2006). The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. *South African J Enol Vitic.* 27(1):15–39.
- Liu SQ. (2002). Malolactic fermentation in wine - Beyond deacidification. *J Appl Microbiol.* 92:589–601.
- Lu Y, Chua JY, Huang D, Lee PR, Liu SQ. (2017). Chemical consequences of three commercial strains of *Oenococcus oeni* co-inoculated with *Torulaspora delbrueckii* in durian wine fermentation. *Food Chem.* 215:209–18.
- Medina K, Boido E, Fariña L, Dellacassa E, Carrau F. (2009). Non-Saccharomyces and Saccharomyces strains co-fermentation increases acetaldehyde accumulation: effect on anthocyanin-derived pigments in Tannat red wines. *Yeast.* 26(10):545–51.

- Mehlomakulu NN, Setati ME, Divol B. (2014). Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-Saccharomyces yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *Int J Food Microbiol.* 188:83–91.
- Mendoza LM, Merín MG, Morata VI, Farías ME. (2011). Characterization of wines produced by mixed culture of autochthonous yeasts and *Oenococcus oeni* from the northwest region of Argentina. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38(11):1777–85.
- Nehme N, Mathieu F, Taillandier P. (2008). Quantitative study of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35(7):685–93.
- Ramírez M, Velázquez R, Maqueda M, Zamora E, López-Piñeiro A, Hernández LM. (2016). Influence of the dominance of must fermentation by *Torulaspora delbrueckii* on the malolactic fermentation and organoleptic quality of red table wine. *Int J Food Microbiol.* 238:311–9.
- Viana F, Belloch C, Vallés S, Manzanares P. (2011). Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production. *Int J Food Microbiol.* 151(2):235–40.
- Viana F, Gil J V., Genovés S, Vallés S, Manzanares P. (2008). Rational selection of non-Saccharomyces wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol.* 25(6):778–85.
- Wang C, Esteve-Zarzoso B, Mas A. (2014). Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization. *Int J Food Microbiol.* 191:1–9.
- Whitener MEB, Stanstrup J, Carlin S, Divol B, Du Toit M, Vrhovsek U. (2017). Effect of non- *Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Aust J Grape Wine Res.*

ANNEX I. Cultius, solucions, reactius i procediments

CULTIUS

Medi Yeast-Peptone-Dextrose (YPD) líquid

Glucosa (Panreac, Ref. 131341,1211)	20 g/L
Peptona (Panreac, Ref. 403695.1210)	20 g/L
Extracte de llevat (Panreac, Ref. 403687.1210)	10 g/L

Hidratació amb aigua destil·lada. Després de la mescla homogènia de tots els components, el medi s'esterilitza a 121°C durant 20 min a l'autoclau. Conservació a temperatura ambient.

Medi Yeast-Peptone-Dextrose (YPD) sòlid

Glucosa (Panreac, Ref. 131341,1211)	20 g/L
Peptona (Panreac, Ref. 403695.1210)	20 g/L
Extracte de llevat (Panreac, Ref. 403687.1210)	10 g/L
Agar (Panreac, Ref. 402303,1210)	17 g/L

Hidratació amb aigua destil·lada. Es mesclen tots els components menys l'agar que s'afegeix quan el medi ja està hidratat. El medi s'esterilitza a 121°C durant 20 min a l'autoclau. Quan encara està calent es reparteix en plaques de petri (20 mL aprox.). Un cop solidificat es conserven les plaques a temperatura ambient.

Medi Man, Rogosa and Sharpe malic and fructose (MRS_{mf}) líquid modificat

MRS broth (Difco, Ref. 288130)	55 g/L
Àcid DL-Malic (Panreac, Ref. 142051,1211)	4 g/L
D-Fructosa (Panreac, Ref. 142728.1211)	5 g/L
Suc de tomàquet (1:10)	100 mL/L

L-Cisteïna	0,5 g/L
------------	---------

Hidratació amb aigua destil·lada. Es mesclen MRS broth, DL-màlic, D-Fructosa i el suc de tomàquet centrifugat i diluït 1:10, S'ajusta el pH a 5 mitjançant l'addició de NaOH. El medi s'esterilitza a 121°C durant 20 min. Un cop temperat s'afegeix la cisteïna mitjançant un filtre 0,45 nm.

Medi Man, Rogosa and Sharpe malic and fructose (MRS_{mf}) sòlid

MRS broth (Difco, Ref. 288130)	55 g/L
Àcid DL-Malic (Panreac, Ref. 142051,1211)	4 g/L
D-Fructosa (Panreac, Ref. 142728.1211)	5 g/L
Agar (Panreac, Ref. 402303,1210)	20 g/L

Hidratació amb aigua destil·lada. Es mesclen tots els components menys l'agar que s'afegeix quan el medi ja està hidratat. Abans d'afegir l'agar s'ajusta el pH a 5 mitjançant l'addició de NaOH. El medi s'esterilitza a 121°C durant 20 min a l'autoclau. Quan encara està calent es reparteix en plaques de petri (20 mL aprox.). Un cop solidificat es conserven les plaques a temperatura ambient.

Medi agar lisina (Lys)

Lysine medium (Oxoid, Ref. CM0191)	66 g/L
Solució Potassium L-lactate (Sigma, Ref. 60389)	5 mL/L
Àcid Lactic (Sigma, Ref. L6661)	2 mL/L

El Lysine medium es resuspen en aigua destil·lada, s'addiciona la solució de Potassium L-Lactate i es porta a ebullició fins a la dissolució completa. Es retira i es porta fins a aproximadament 50°C i finalment s'hi afegeix l'àcid làctic per a ajustar el pH. Per acabar es reparteix en plaques de petri (20 mL aprox.). Un cop solidificat es conserven les plaques a temperatura ambient.

Medi per a les plaques de difusió

Àcid L-Tartàric	2 g/L
-----------------	-------

Àcid L-Màlic	2 g/L
Acetat de Sodi	0,28 g/L
Àcid Cítric	0,50 g/L
Peptona	1 g/L
Casa aminoàcids	1 g/L
KH_2PO_4	0,6 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,13 g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,03 g/L
CaCl	0,13 g/L
KCl	0,45 g/L
Fructosa	0,4 g/L
Trehalosa	0,25 g/L
L-cisteïna	0,5 g/L
Agar	30 g/L

Es mesclen el reactius amb aigua MilliQ excepte els sucres i L-cisteïna i s'ajusta el pH a 4, Es posa a l'autoclau 121°C 20 min. En el moment de repartir en les plaques s'afegeixen els reactius restants.

SOLUCIONS

Solució salina de conservació

NaCl	0,84%
------	-------

Aigua destil·lada

La solució, un cop preparada, s'esterilitza a 121°C durant 20 min en l'autoclau. Conservació a temperatura ambient. Manipulació en alíquotes per evitar al màxim la contaminació.

Solució dimethyl dicarbonat (Velcorin®)

Sigma, Ref. D5520

Conservació a 4°C. Manipulació a la campana d'extracció de gasos i amb la utilització de guants protectors.

PROCEDIMENTS

Determinació de manoprteïnes

S'analitza mitjançant una determinació enzimàtica.

Preparació de mostra:

- 5 mL de vi + 25 mL de etanol 95%
- Vòrtex energètic
- Precipitació a 4°C/aprox 12 h
- Centrifugar (4,700 rpm 5 min 4°C)
- Descartar sobrenedant i afegir 10 mL etanol 95%
- Centrifugar (4,700 rpm 5 min 4°C)
- Pellet a hidròlisi àcida

Hidròlisi àcida:

- Resuspendre el pellet en 1 mL de H₂SO₄ 5 M
- Escalfar la mostra en un bany a 100°C/30 min
- Refredar en gel
- Deixar temperar a temperatura ambient
- Afegir 1mL de NaOH 10 M

- Mesclar per inversió delicadament
- Centrifugar (1,500g 10 min Temperatura ambient)
- Determinació per Kit D Manosa, D fructosa, i D Glucosa de Megazyme. (K-Mangl 02/15)

Un cop arribat a aquest punt es segueixen les indicacions del kit. Es mesuren les absorbàncies a 340 nm en intervals diferents d'incubació. Mitjançant l'aplicació dels diferents càlculs indicats pel fabricant obtenim el valor de concentració de D-glucosa, D-manosa i D-fructosa.

Solucions	Blanc	Mostra
Aigua MilliQ	1,05 mL	1,0 mL
Mostra	-	50 µL
Solució 1 (tampó)	100 µL	100 µL
Solució 2 (NADP+/ATP)	100 µL	100 µL
Mix i incubació 3 min		A₁
Solució 3 (HK/G-6-PDH)	10 µL	10 µL
Mix i incubació 5 min		A₂
Solució 4 i 5 (PGI+PMI)	20 µL	20 µL
Mix i incubació 20 min		A₄

ANNEX II. Taules d'anàlisi ANOVA d'*Oenococcus oeni*

Annex II. Taula 1 Taula resum de l'anàlisi ANOVA de la soca 13W1

13w1	Vel L-màlic (g/L/h)	NH4 (mg/L)	N2 (mg/L)	pH	àcid L-làctic	àcid cítric	Acetaldehid (mg/L)	àcid acètic (g/L)
13130	0,007 b	14,000 ab	14,120 a	3,504 a	0,610 a	0,267 a	39,667 a	1,060 a
10389	0,007 b	54,000 a	17,447 a	3,685 a	0,963 a	0,200 ab	17,000 a	1,003 a
TO25A	0,022 ab	0,000 ab	0,000 a	3,734 a	0,915 a	0,115 ab	2,000 a	0,795 ab
1471	0,022 ab	0,000 ab	25,025 a	3,805 a	0,900 a	0,030 b	49,500 a	0,620 ab
QA23	0,027 a	0,000 b	0,000 a	3,572 a	1,077 a	0,040 b	8,667 a	0,210 b
Pr > F	0,022	0,040	0,117	0,257	0,194	0,011	0,070	0,012
Significatiu	Sí	Sí	No	No	No	Sí	No	Sí

Annex II. Taula 2 Taula resum de l'anàlisi ANOVA de la soca PSU-1

PSU-1	Vel L-màlic (g/L/h)	NH4 (mg/L)	N2 (mg/L)	pH	àcid L-làctic	àcid cítric	Acetaldehid (mg/L)	àcid acètic (g/L)
13130	0,020 b	13,437 a	11,616 a	3,633 a	1,017 a	0,106 a	38,171 b	1,082 a
10389	0,021 b	39,558 a	34,164 a	3,711 a	1,034 a	0,100 a	33,234 b	0,988 a
TO25A	0,051 a	-0,064 a	-0,037 a	3,742 a	0,885 a	0,075 a	10,746 b	0,818 ab
1471	0,034 ab	-0,240 a	14,412 a	3,813 a	0,875 a	0,045 a	49,342 b	0,549 ab
QA23	0,027 b	0,541 a	6,272 a	3,590 a	1,012 a	0,048 a	113,869 a	0,179 b
Pr > F	0,005	0,167	0,467	0,254	0,098	0,363	0,000	0,006
Significatiu	Sí	No	No	No	No	No	Sí	Sí

Annex II. Taula 3 Taula resum de l'anàlisi ANOVA de la soca VP41

VP41	Vel L-màlic (g/L/h)	NH4 (mg/L)	N2 (mg/L)	pH	àcid L-làctic	àcid cítric	Acetaldehid (mg/L)	àcid acètic (g/L)
13130	0,008 a	16,333 a	15,577 a	3,563 a	0,763 a	0,203 a	36,333 a	0,990 a
10389	0,010 a	41,000 a	25,367 a	3,690 a	0,973 a	0,180 a	23,333 a	0,970 a
TO25A	0,022 a	0,000 a	1,090 a	3,740 a	0,900 a	0,055 a	0,000 a	0,820 ab
1471	0,022 a	1,500 a	25,840 a	3,814 a	0,885 a	0,065 a	46,500 a	0,545 ab
QA23	0,027 a	0,000 a	0,000 a	3,585 a	1,077 a	0,097 a	31,667 a	0,193 b
Pr > F	0,085	0,203	0,257	0,188	0,362	0,121	0,106	0,008
Significatiu	No	No	No	No	No	No	No	Sí

Annex II. Taula 4 Taula resum de l'anàlisi ANOVA de la soca CH11

CH11	Vel L-màlic (g/L/h)	NH4 (mg/L)	N2 (mg/L)	pH	àcid L-làctic	àcid cítric	Acetaldehid (mg/L)	àcid acètic (g/L)
13130	0,019 a	13,000 a	29,770 a	3,552 a	0,683 a	0,233 a	32,333 a	1,020 a
10389	0,010 a	31,667 a	17,243 a	3,695 a	0,983 a	0,160 a	24,667 a	0,930 a
TO25A	0,022 a	0,000 a	1,430 a	3,730 a	0,890 a	0,005 a	6,000 a	0,830 a
1471	0,022 a	1,500 a	32,240 a	3,801 a	0,880 a	0,025 a	51,500 a	0,550 ab
QA23	0,033 a	0,000 a	0,000 a	3,667 a	1,103 a	0,090 a	24,667 a	0,223 b
Pr > F	0,437	0,165	0,202	0,370	0,362	0,092	0,219	0,005
Significatiu	No	No	No	No	No	No	No	Sí