

DANIEL FERNÁNDEZ VÁZQUEZ

**ESTRATEGIAS PARA LA MINIMIZACIÓN DE LA
FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA NO DESEADA EN
VINO ESPUMOSO D.O. CAVA**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

dirigido por

Joan Miquel Canals Bosch

Cristina Reguant Miranda

Fernando Zamora Marín

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

Facultad de Enología



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona
1 septiembre 2020

ESTRATEGIAS PARA LA MINIMIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA NO DESEADA EN VINO ESPUMOSO D.O. CAVA

Fernández, D., Canals, JM., Reguant, C., Zamora, F.

Direcció: Universitat Rovira i Virgili, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia.

C.P.: 43007, Tarragona, Catalunya, España.

e-mail: daniel.fernandezv@estudiants.urv.cat

Este trabajo final de máster ha sido resultado de la colaboración entre los grupos de investigación de *Biotecnologia Enològica, BE* y *Tecnologia Enològica, TECNENOL*.



Este trabajo final de master ha sido parte del trabajo llevado a cabo dentro del Proyecto Piloto de *Minimització de la fermentació malolàctica no volguda en vins escumosos, CAVA-NoFML*, del clúster del sector vitivinícola catalán INNOVI; con la colaboración de Castillo de Perelada S.A., Masia Vallformosa S.L., Codorniu S.A. y Lallemand Bio S.L., con financiación de fondos FEDER y Generalitat de Catalunya en la convocatoria 2017 de Grupos Operativos de la Asociación Europea para la Innovación (AEI) en materia de productividad y sostenibilidad agrícolas (2018-2020).



Generalitat de Catalunya
**Departament d'Agricultura,
Ramaderia, Pesca i Alimentació**



**Fons Europeu Agrícola
de Desenvolupament Rural:**
Europa inverteix en les zones rurals

RESUMEN

La fermentación maloláctica (FML) llevada a cabo por las bacterias acidolácticas (BAL) del vino, básicamente por *Oenococcus oeni*, comporta una serie de cambios en el producto final. En vinos espumosos de climas fríos la FML contribuye a reducir su elevada acidez. En cambio, en vinos espumosos de climas más cálidos, esta reducción de acidez puede comportar imprevistos que acaben en pérdidas para las empresas productoras.

Durante el proyecto se estudió la aparición de BAL en diferentes puntos del proceso productivo del cava en las bodegas participantes, y se realizaron experimentaciones con tratamientos para su control y minimizar su aparición. El estudio realizado permitió detectar y aislar cepas de *O. oeni* de muestras que habrían realizado la FML en cava. Se realizaron ensayos en condiciones de bodega con quitosano y ácido fumárico a diferentes concentraciones en diferentes etapas del proceso de elaboración. También se evaluó la adición de estos compuestos inhibidores en vino sintético con el fin de caracterizar las cepas aisladas de cava. La adición de 0,6 g/L y 0,3 g/L de ácido fumárico tanto en condiciones de bodega como en vino sintético, permitió reducir las poblaciones de BAL y evitar así el consumo de ácido L-málico. La adición de 0,2 g/L de quitosano no evitó la aparición de BAL en condiciones de bodega, pero sí que retrasó la FML en vino sintético.

Palabras clave: fermentación maloláctica, vino espumoso, cava, *Oenococcus oeni*, quitosano, ácido fumárico.

ABSTRACT

Malolactic fermentation (MLF) carried out by lactic acid bacteria (LAB) from wine is responsible from changes in the final product. MLF contributes to reduce acidity in sparkling wines from cool climates, but in the case of wines from warmer climates this reduction of acidity can due in economic losses for productors.

Presence of spoilage LAB in different steps of the production process was studied during the project. Experimentation was carried out with different treatments for control LAB populations and minimize its populations. The assay identified different strains of *Oenococcus oeni* from samples that had undergone through MLF in cava. Experimentation was realised at cellar conditions at different concentrations of fumaric acid and chitosan at different steps of the production process. Same products were tested at laboratory conditions in synthetic wine to characterize *O. oeni* strains isolated from cava. Fumaric acid addition at 0.3 g/L and 0.6 g/L showed in all conditions a reduction on LAB populations and maintained the fields of L-malic acid. Chitosan addition at 0.2 g/L didn't show a protective effect against FML at cellar conditions but retarded the malic acid consumption and LAB population growth in synthetic wine conditions.

Keywords: malolactic fermentation, sparkling wine, cava, *Oenococcus oeni*, chitosan, fumaric acid.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 D.O. Cava, producción y crianza.....	1
1.1.1 Datos del sector	1
1.1.2. Proceso productivo	1
1.1.3. Crianza y autólisis	3
1.2. FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA.....	4
1.2.1. Factores de influencia.....	4
1.2.2. Bacterias acidolácticas (BAL), <i>Oenococcus oeni</i>	5
1.2.3. Efectos en el cava y control.....	5
1.3. ADITIVOS ENOLÓGICOS UTILIZADOS	6
1.3.1. Ácido sulfuroso	6
1.3.2. Quitosano.....	7
1.3.3. Ácido fumárico	8
2. OBJETIVOS DEL PROYECTO	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Aislamientos de BAL en cava	10
3.2. Estudios de tratamientos inhibidores de la FML en cava.....	10
3.2.1. Estudios en bodega, campañas 2018 y 2019	10
3.2.2. Estudios en pie de cuba	12
3.2.3. Estudios en tiraje	12
3.2.4. Estudios en vino sintético	12
3.3. Analíticas generales vino.....	13
3.4. Análisis estadístico	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Aislamientos de BAL en cava	15
4.2. Estudios en bodega	15
4.3. Estudios en pie de cuba	20
4.4. Estudio en tiraje	21
4.5. Estudios en vino sintético	24
5. DISCUSIÓN	26
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	30
7. AGRADECIMIENTOS	30
8. REFERENCIAS	31
9. ANEXOS	II
Figuras anexadas	II
Tablas anexadas.....	II

1. INTRODUCCIÓN

1.1 D.O. Cava, producción y crianza

1.1.1 Datos del sector

Cuando hablamos de vino en general en España, nos vienen a la cabeza diferentes denominaciones de origen muy sonadas y de prestigio extendido en el mercado, D.O.C. Rioja, D.O. Ribera del Duero, D.O. Valdepeñas, etc. En la región catalana, D.O. Montsant y D.O.C. Priorat son también ejemplos. Pero si hablamos de vino espumoso, inevitablemente nos viene a la cabeza la D.O. Cava, produciéndose casi en su totalidad (95%) dentro de Catalunya, sobre todo en la región del Penedès.

Según datos oficiales de la D.O. Cava, en 2018 se recogieron un total de 325,7 M kg de uva y una producción de 244.472.340 botellas, un 3.2% inferior al año anterior. El mercado en total movió 1.146,8 M € (Cava, 2018). De cara al mercado interior, las ventas aumentaron un 0,3% respecto al año anterior, donde se redujeron un 12,1 % en el mercado interior y aumentaron un 1,8 % en el mercado exterior. Si miramos por categorías, el cava joven disminuyó un 3,1% de ventas con 212.959.767 botellas, el Reserva disminuyó 6,8% con 26.681.255 botellas, el Gran reserva aumentó un 18,2% con 4.700.650 botellas y el cava de Paraje calificado se produjeron 130.667 botellas.

A pesar de los datos, el sector no pasa por sus mejores momentos en los últimos cinco años. Actualmente las tres mayores empresas productoras de cava han vendido gran parte de sus inversiones a Grupo Henkell & Co. con Freixenet S.A., Carlyle Group con Codorniu S.A. y Grifols S.A. con Juvé i Camps S.A. (Jorro, 2019), (Barro, 2019). Aun así, el sector englobaba en el año 2018 a 224 empresas elaboradoras de cava y a 145 empresas elaboradoras de vino base para cava (Cava, 2018).

La problemática de la fermentación maloláctica en botella, afecta por desgracia a muchas de las empresas elaboradoras del cava de forma ocasional. Bien es cierto que no se dispone de datos concretos sobre la dimensión real de este problema, ya que difícilmente las bodegas elaboradoras informan de este tipo de incidencias. Sin embargo, algunas estimaciones consideran que puede afectar en mayor o menor grado a un 10 % de la producción y que implica pérdidas de unos 50 millones € cada año. Por consiguiente, se trata de una de las problemáticas que más preocupa a las empresas elaboradoras de cava (Fernández et al., 2020).

1.1.2. Proceso productivo

El cava se produce siguiendo el método tradicional. Este consiste en una primera fermentación alcohólica (FA) para producir el vino base, y posteriormente realizar una segunda fermentación

alcohólica (2FA) en botella. En el momento del embotellado, se introduce azúcar y levaduras en el tiraje. Las botellas se someten a un proceso de crianza y al finalizar, se ponen paulatinamente en punta, para clarificar el producto. Una vez en punta, se degüellan las botellas expulsando del interior las lías y dejando un producto limpio. Antes de tapar con el corcho definitivo, puede añadirse licor de expedición con un porcentaje de azúcar final.

En 1972 con la constitución del Consejo Regulador de los Vinos Espumosos y la promulgación de la Orden Ministerial 27, se establecieron las condiciones propias de la D.O. Cava. Estas condiciones aseguran que *“el cava es un vino espumoso de calidad, obtenido mediante la realización de una segunda fermentación alcohólica, en botella, del vino base, y cumpliendo el método tradicional.”* (Cava, 2016). Debe producirse dentro de la región amparada por la D.O. Cava y que *“el vino debe permanecer, al menos, nueve meses en contacto con las lías y en la misma botella en la que tuvo lugar la segunda fermentación”*. En el campo, la parcela debe tener una densidad de plantación entre 1500 a 3500 cepas. En el momento de la vendimia, las parcelas deben tener una producción como máximo de 12 toneladas de uva por hectárea, tanto en blanco como en tinto (Cava, 2016).

Para elaborar el vino base, están permitidas las variedades vitícolas blancas de macabeo, xarel·lo y parellada principalmente, malvasía, subirat parent y chardonnay; y las variedades tintas de garnacha tinta, monastrell, pinot noir y trepat. Únicamente se destinan las primeras fracciones del prensado, con rendimientos máximos de 1 hL de mosto por 150 Kg de uva, para evitar oxidación y un exceso de sólidos insolubles que afecten a la fermentación y la espumabilidad (Kemp, Alexandre, et al., 2015). Un vino base apto para cava cumple con las condiciones resumidas en la Tabla 1. Al final de la segunda fermentación, el vino no puede exceder una graduación de 12,8 % v/v.

A partir del vino base, se realiza una segunda fermentación en botella añadiendo azúcar exógeno. En el tiraje, el vino se embotella junto con el licor de tiraje, que contiene azúcar y levadura seca activa o en suspensión vínica. Las botellas fermentan en posición horizontal, en rima, durante el tiempo que dure su crianza en la cava, que será de un mínimo de 9 meses para la Denominación de Origen Cava, 15 para la calificación reserva y 30 para gran reserva. Durante este tiempo, las levaduras consumen el azúcar, se vuelve a producir etanol y CO₂ y se da la carbonatación natural del vino dentro de la botella. El aumento del grado alcohólico del vino no puede ser de más de 1,5 % v/v. Durante la fermentación, la presión dentro de la botella puede llegar hasta 7 atm, y la concentración normal de CO₂ después de la segunda fermentación ronda los 9 g/L (Kemp, Alexandre, et al., 2015).

Tabla 1. Parámetros generales para vino base y espumoso admitidos dentro de la D.O. Cava (Cava, 2016).

Parámetros	Vino Base	Vino espumoso
Graduación alcohólica	9,5 – 11,5 % v/v	10,8 – 12,8 % v/v
Acidez total	Mín. 5 g/L en ácido tartárico, o 66,6 miliequivalentes por litro	Mín. 5 g/L en ácido tartárico, o 66,6 miliequivalentes por litro
Acidez volátil real	Inferior a 0,60 g/L en ácido acético, o 10 miliequivalentes por litro	Inferior a 0,65 g/L en ácido acético, o 10,8 miliequivalentes por litro
Anhídrido sulfuroso total	Inferior a 140 mg/L	Inferior a 160 mg/L
pH	2,8 – 3,3	2,8 – 3,3
Sobrepresión	Mín. 3,5 Bar a 20 °C, o superior a 3 Bar a 20 °C en botellas con menos de 25 cL.	Mín. 3,5 Bar a 20 °C, o superior a 3 Bar a 20 °C en botellas con menos de 25 cL.

Incluso en estas condiciones hostiles, *Oenococcus oeni* puede sobrevivir y llevar a cabo la fermentación maloláctica. Con ello, subsiste el enzima maloláctico, que puede presentar actividad residual a presiones de 300 MPa durante 30 minutos, consumiendo ácido L-málico y modificando el producto final (Neto et al., 2016).

Cuando las levaduras resultantes de la 2FA entran en fase de senescencia, comienzan un proceso conocido como autólisis (Kemp, Alexandre, et al., 2015), donde aportan al vino final componentes intracelulares importantes para la estabilización de la espuma.

1.1.3. Crianza y autólisis

La crianza se desarrolla en la cava una vez acabada la segunda fermentación y dentro de la botella. Las botellas se apilan horizontalmente, aumentando la superficie de contacto entre el vino y las lías y favoreciendo el envejecimiento. Estas lías están compuestas por levaduras *Saccharomyces*, BAL y adyuvantes como la bentonita para facilitar su proceso de removido durante la puesta en punta y degüelle.

Las autólisis es un proceso irreversible catalizado por enzimas intracelulares, que no comienza hasta después de 2 a 4 meses que haya acabado la 2FA (Todd et al., 2000). La actividad proteolítica se ve reducida durante la fermentación en botella, pero aumenta después de 9 meses durante la crianza (Feuillat & Charpentier, 1982). En este proceso, se liberan aminoácidos y manoproteínas, componentes de la pared celular y polisacáridos con elevada concentración de arabinosa y galactosa (Torresi et al., 2014), que participan de la espumabilidad del vino. BAL como *Oenococcus oeni* puede catabolizar manoproteínas y liberar manosas para su adaptación al medio (Jamal et al., 2013), por lo que este proceso puede resultar fuente de energía y nutrientes para su supervivencia.

1.2. FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

La fermentación maloláctica en el vino es una fermentación secundaria, que suele ocurrir al final de la FA, aunque puede producirse simultáneamente en algunos casos. Es llevada a cabo por BAL, gracias al enzima maloláctico, que permite descarboxilar el ácido L-málico y producir así ácido L-láctico, CO₂ y ATP. Esta fermentación es deseada, por ejemplo, para suavizar la astringencia e incrementar la complejidad aromática de vinos tintos (Bordas et al., 2013), estabilizar el producto final biológicamente, evitando cambios a posteriori (Bartowsky, 2009) o para reducir la acidez de vinos espumosos de climas fríos como el *Champagne* en Francia, aunque durante la crianza pueda conllevar reducción (Auge et al., 2000). Las variedades en climas fríos pueden producir entre 2,0 a 5,0 g/L de ácido L-málico, mientras que en climas cálidos pueden producirse hasta 2,0 g/L (Zoecklein et al., 1999).

Así pues, los cambios fisicoquímicos que produce la FML en el vino son: la bajada de acidez por el consumo de ácido L-málico y la producción de ácido L-láctico y el aumento de pH entre 0,1 – 0,2 unidades (Bartowsky, 2005).

1.2.1. Factores de influencia

En función de las características fisicoquímicas de cada vino, habrá más posibilidades para que se desarrolle la FML. Por tanto, es importante conocer los factores que la favorecen. En mayor cantidad en el vino tenemos el etanol. Se ha comprobado que en concentraciones habituales en el vino, sobre 12 – 15 % v/v, actúa como disruptor de la membrana celular (Graça Da Silveira et al., 2002). También influyen la disponibilidad de sustrato para la supervivencia, como el ácido L-málico como fuente de energía y un pH bajo. La FML puede darse sin problemas a pH 4,8 – 5,5, pero a pH de vino de 2,5 – 3,5 se ve reducido el crecimiento celular y la actividad del enzima maloláctico. (Tourdot-Maréchal et al., 1999).

La temperatura es un factor crítico. La temperatura óptima para el desarrollo de la FML es de 25 °C, aunque pueda darse más lentamente a menor temperatura (Fugelsang, 1997). Durante la crianza del vino, éste permanece en las salas de crianza a temperatura de bodega que ronda los 16 – 18 °C; y durante el proceso de distribución y almacenaje en supermercados pueden superarse estas temperaturas. Así pues, la FML podría llegar a darse en botellas con presencia de BAL hasta que lleguen al consumidor. La concentración de SO₂, producido por levaduras y añadido resulta inhibitorio a todas concentraciones, reduciendo la actividad ATPasa y la viabilidad celular (Carreté et al., 2002).

Se ha comprobado también que la producción de ciertos compuestos por parte de las levaduras que han llevado a cabo la FA, puede afectar a *O. oeni* y por tanto a la FML (Balmaseda et al., 2018).

1.2.2. Bacterias acidolácticas (BAL), *Oenococcus oeni*

La FML en el vino es llevada a cabo por BAL de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Pediococcus* (Du Plessis et al., 2004). Son bacterias del filo *Firmicutes*, Gram positivas, catalasa negativas, hetero y homofermentativas, con morfologías bacilares y cocáceas. Están presentes en la superficie de las pieles de las uvas en la vid, y pasan al vino durante el proceso de producción y fermentación. Suelen presentar poblaciones en mostos sanos de $10^2 - 10^3$ UFC/mL y reducen su población drásticamente durante la FA (Lonvaud-Funel, 1999). No obstante, una vez termina la FA y las levaduras entran en fase de senescencia, pueden aumentar su población y a partir de 10^5 UFC/mL pueden llevar a cabo la FML (Bordas et al., 2013).

De entre todas las BAL, *Oenococcus oeni* es el principal candidato para realizar la FML. *O. oeni*, además de las características generales de las BAL (Dicks et al., 1995), presenta elevada tolerancia al etanol hasta <15% v/v, pH hasta >2,9, tolerancia al SO₂, compuestos fenólicos del vino y bajas cantidades de nutrientes. (Bartowsky, 2005). También puede metabolizar ácido L-málico y ácido cítrico, y azúcares residuales no fermentados por levaduras para obtener energía (Beltramo et al., 2004).

1.2.3. Efectos en el cava y control

La FML puede producir compuestos no deseados si se ha llevado a cabo por especies de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Pueden producirse acroleína, que da sabor amargo, acetato de etilo con aroma a pegamento o 2,3-butanodiona (diacetilo) con aroma a mantequilla en concentraciones superiores a 4,0 mg/L (Bartowsky, 2009). También es remarcable la pérdida de acidez. *O. oeni* además, puede descarboxilar diferentes aminoácidos, pudiendo producir aminas biógenas con efectos perjudiciales para la salud como la histamina o la tiramina (Guerrini et al., 2002).

En cuanto a efectos sobre la espuma, se ha observado que el ácido L-málico afecta positivamente a la altura de la espuma pero negativamente a su estabilidad, mientras que el ácido L-láctico tiene el efecto contrario (Lopez-Barajas et al., 1998). Por tanto, la producción de ácido L-láctico puede producir espumas menores, pero más estables.

También, debido a la producción de CO₂ por la descarboxilación del ácido L-málico, puede haber un incremento de la presión en el interior de la botella que comporte problemas. Durante

el proceso productivo, la turbidez del vino puede aumentar y generarse problemas en el removido de las lías y la clarificación. Los cristales de tartrato cálcico son responsables del fenómeno conocido como *gushing*, la salida del vino de forma descontrolada por la liberación súbita del CO₂. Estos tartratos son altamente dependientes del pH, y un aumento del pH producido por la FML puede generar problemas de precipitación de estos tartratos (Kemp, Wiles, et al., 2015).

No hay que olvidar que todos los cambios fisicoquímicos que puede llevar a cabo la FML en vino espumoso, pueden comportar que no se cumplan los estándares de calidad exigidos en la D.O. y que por tanto, no se pueda amparar el producto bajo esa denominación de origen. Por ello, entre las estrategias para su control, podemos nombrar diversos tratamientos como la filtración para eliminar BAL físicamente, uso de SO₂ para inhibir su crecimiento, lisozima y bacteriocinas que actúan contra la pared celular y causan lisis celular, altas presiones causando daño citoplasmático e inactivación enzimática, ultrasonidos que crean radicales libres y poros en la membrana celular o radiación ultravioleta que afecta al ADN (Bartowsky, 2009).

1.3. ADITIVOS ENOLÓGICOS UTILIZADOS

1.3.1. Ácido sulfuroso

El ácido sulfuroso (H₂SO₃), en forma de anhídrido sulfuroso principalmente en vino (SO₂), se utiliza en la vinificación desde las primeras etapas del prensado, para evitar el pardeamiento y evitar un arranque de fermentación espontáneo (Abramovič et al., 2014), así como al final de fermentación para controlar el crecimiento poblacional y evitar posibles refermentaciones y acetificaciones. Sobre las BAL, el SO₂ afecta a la viabilidad celular y a la actividad ATPasa (Carreté et al., 2002). Durante la crianza en botella, puede perder eficiencia al combinarse con compuestos como el etanol, ácido pirúvico, y reducirse los niveles de SO₂ libre (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Sensorialmente produce aromas a azufre quemado y puede combinarse y formar otros compuestos como H₂S, que tiene un umbral de percepción bajo de 1,1 µg/L y da notas de reducción, olor a huevos podridos (Karagiannis & Lanaridis, 1999).

En la D.O. Cava está permitido el uso de SO₂ en concentraciones inferiores a 160 mg/L de SO₂ total. Socialmente, existe un rechazo por consumir en los alimentos SO₂, es decir, sulfitos. La normativa actual de etiquetado lleva a la inclusión de la cita “*contiene sulfitos*” en el vino, contribuyendo a esa mala percepción social, sumado al elevado contenido en etanol en el vino. También es cierto, que no se tiene en cuenta en este rechazo social ni el consumo medio de vino per cápita, ni la ingesta diaria admisible de SO₂ por el consumidor, que según la EFSA es de

0,7 mg/kg de peso (EFSA, 2016). Una persona de 70 kg debería tomar diariamente un tercio de una botella de vino a 160 mg/L de SO₂ para sufrir efectos perjudiciales por culpa del sulfuroso. Así pues, junto con el etanol, el SO₂ es uno de los elementos a reducir y en la medida de lo posible, sustituir, para contentar al comprador vinícola.

1.3.2. Quitosano

El quitosano es un biopolímero derivado de la quitina, formado por glucosamina y N-acetilglucosamina, unidas por enlace β-1,4 glucosídico (Figura 1. Estructura química del polímero de quitosano (Coma, 2013).) (OIV, 2009b) (Coma, 2013). Se encuentra de forma natural en algunos hongos y crisálidas de gusanos de seda (Rungsardthong et al., 2006). Su producción actualmente se da por la deacetilación (Coma, 2013) o la hidrólisis de la quinina de fuentes como conchas de cangrejos y gambas como residuos de marisco o, de hongos como *Agaricus bisporus* o *Aspergillus niger* (OIV, 2009b). Resulta un material muy insoluble y semicristalino, variando su composición en función de la fuente de origen y el tratamiento. Puede disolverse parcialmente en ácidos orgánicos como el fórmico, acético, láctico (Coma, 2013).

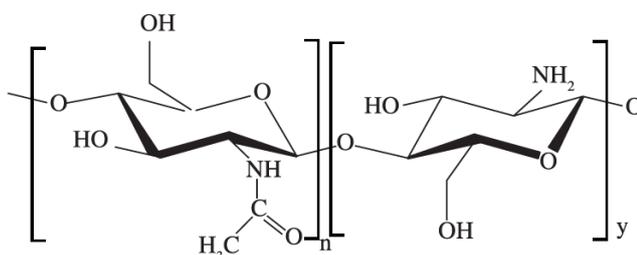


Figura 1. Estructura química del polímero de quitosano (Coma, 2013).

En función del origen, la solubilidad, la especie, el grado de acetilación se han descrito diferentes concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) del quitosano como agente para el control de microorganismos (Bağder Elmacı et al., 2015).

El quitosano se utiliza en el vino como agente clarificante, para reducir la turbidez y prevenir la rotura proteica (OIV, 2009a). Algunos de los productos de quitosano que se comercializan en el mercado por Lallemand Bio S.L. para controlar tanto bacterias como levaduras no deseadas son:

- Bactiless™: es un biopolímero de origen fúngico de *Aspergillus niger*, que permite controlar y reducir las poblaciones de BAL y acéticas, permitiendo reducir las cantidades de lisozima y SO₂ empleadas, sin afectar a las poblaciones de levadura (Lallemand Bio S.L., 2014). Dosis recomendadas de 20 g/hL a 50 g/hL.

- No Brett Inside®: es un polisacárido de quitosano insoluble no alergénico, también de origen fúngico *Aspergillus niger*, que interactúa con levaduras como *Brettanomyces bruxellensis* e impide su crecimiento (Lallemand Bio S.L., 2008). Dosis recomendadas de 4 g/hL. La dosis máxima permitida para el control de *B. bruxellensis* es de 10 g/hL(OIV, 2015).

1.3.3. Ácido fumárico

Es un ácido orgánico (C₄H₄O₄) autorizado y regulado en Europa por la *European Food Safety Authority*, bajo el número E-297, está autorizado como aditivo tecnológico para uso en toda especie animal como acidificante (Figura 2) (EFSA, 2013). Presenta muy baja solubilidad en agua, pero en etanol absoluto 95% v/v llega hasta 46 g/L. Está autorizado para niveles máximos de 4 g/kg en alimentos. El contacto con cristales de ácido fumárico puede provocar efectos irritantes al contacto con la piel, pero su consumo dentro de los alimentos no está considerado de riesgo para la salud (EFSA, 2013), (JECFA, 1999), (FDA, 2019). Es intermediario del ciclo de Krebs, se origina por la oxidación del succinato y se transforma en ácido málico (EFSA, 2013), y puede metabolizarse por levaduras para formar L-malato (Saayman et al., 2000).

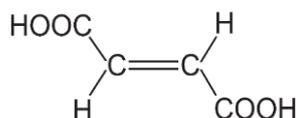


Figura 2. Estructura química de la molécula del ácido fumárico (EFSA, 2013).

El efecto bactericida del ácido fumárico se conoce desde hace años. En 1974 en variedad de vino tinto syrah, se observa un efecto bactericida del ácido fumárico en sinergia con el bajo pH del vino, a concentraciones de 1,5 g/L y pH 3,5, durante 41 semanas (Pilone et al., 1974). Recientemente se ha descrito como inhibidor parcial de la FML en vino tinto a concentraciones de 0,3 g/L, e inhibidor total a 0,6 g/L en poblaciones de *O. oeni* de 10⁷ UFC/mL durante 50 días (Morata et al., 2020).

2. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Como se ha comentado anteriormente, este Trabajo de fin de máster, se enmarca en el trabajo realizado en el Proyecto piloto *Minimització de la fermentació no volguda en vins escumosos*. Los objetivos de este proyecto se resumen con el estudio de la FML y su control, para evitar su aparición cuando no sea deseada en vinos espumosos. De este proyecto piloto, se desprende la obtención de un procedimiento a seguir, no existente hasta la fecha, que evite el desarrollo de la FML en vino espumoso; así como indirectamente aumentar la productividad de las empresas colaboradoras. Para ello se contemplan diferentes metodologías y experimentaciones que ayuden a solventar la problemática de la FML, entre ellas:

- Realizar muestreos de lotes de botellas donde haya aparecido la FML en diferentes bodegas, con la finalidad de hacer recuentos poblacionales y aislar e identificar cepas de BAL contaminantes recurrentes, adaptadas a la FML en cava.
- Realizar muestreos de la línea de producción de bodegas, identificando focos de contaminación, puntos críticos del proceso de producción.
- Provocar contaminaciones con BAL aisladas de FML en vino espumoso, para su seguimiento y evaluar su comportamiento en bodega.
- Testear la eficiencia de varios productos enológicos para inhibir la FML y en qué momento de todo el proceso productivo utilizarlos, tanto antes o después de fermentar, como en el tiraje durante la crianza.
- Confirmar que los tratamientos utilizados no reporten un impacto negativo en el producto final de cara al consumidor.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamientos de BAL en cava

Paralelamente a la realización de las experimentaciones incluidas en este trabajo, se realizaron diferentes muestreos en las empresas colaboradoras del proyecto. Se realizaron muestreos en diferentes puntos de la línea de producción y embotellado (vino antes y después de filtrado, pie de cuba, licor de tiraje) de las bodegas de Castillo de Perelada S.A. y de Masia Vallformosa S.L. Se cogieron botellas de los tirajes pertinentes, para realizar el seguimiento de la FML periódicamente. Por parte de las tres empresas del proyecto, se proporcionaron muestras susceptibles de haber realizado la FML para recuperar y tipificar cepas de BAL. Se filtró un volumen de 30 ml de muestra con un filtro estéril de 0,22 µm de poro, para recuperarlas y concentrarlas y se puso sobre placas de MRS según (de Man et al., 1960), con 55,0 g/L de BD Difco Lactobacilli MRS Broth (Fisher Scientific International, Inc.) Difco, 5,0 g/L de fructosa y ajustado a pH 5.0. Se centrifugaron volúmenes de 10 y 50 ml de muestra y se resuspendieron en MRS enriquecido con zumo de tomate a 100 ml/L y 0,5 g/L de L-cisteína. De estas muestras se recuperaron cepas de *O. oeni* utilizadas en las posteriores experimentaciones, con nomenclatura “CVP”. Se confirmaron por PCR específica de *O. oeni* (Zapparoli et al., 1998) y se realizaron curvas de crecimiento midiendo absorbancia a DO₆₀₀ y contando viables en placa.

3.2. Estudios de tratamientos inhibidores de la FML en cava

3.2.1. Estudios en bodega, campañas 2018 y 2019

Las experimentaciones realizadas en condiciones de bodega se llevaron a cabo en la *Finca experimental Mas dels Frares* de la *Universitat Rovira i Virgili* (URV), situada en el Lloc Mas dels Frares, Carrer del Col·legi Turó, 43120 Constantí.

En la campaña de setiembre de 2018, se llevaron a cabo fermentaciones por triplicado en tanques siemprellenos, en un volumen de 90 L de mosto parellada, proveído por Castillo de Perelada S.A. La temperatura de fermentación se mantuvo constante entre los 17-19 °C. Se realizaron tres fermentaciones diferentes: una control con *Saccharomyces cerevisiae bayanus* EC-1118 (Lallemand Bio S.L., 2018), otra con *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* ICV K1M (Lallemand Bio S.L., 1972) con factor killer y productora de elevada acidez; y una última con inoculación secuencial de EC1118 y *Lachancea thermotolerans* Laktia (Lallemand Bio S.L., 2017), productora de ácido L-láctico a concentraciones elevadas. Se añadieron 30,0 g/hL de Go-Ferm Protect (Lallemand Bio S.L., 2019) en 20 veces su peso en agua a 42 °C. Una vez descendió la temperatura 38 °C, se añadieron 20,0 g/hL de EC1118, ICV K1M y Laktia, por separado. Después de 20 minutos, se trasvasó al tanque con el mosto. En la condición de Laktia,

a las 24h se adicionó por el mismo procedimiento EC1118. Se hizo un tratamiento a cada condición con 0,2 g/L de quitosano Bactiless™ (Lallemand Inc., Montréal, Canada) y otro sin quitosano. Una vez acabada la FA, se sulfitó a 5,0 g/hL con metabisulfito Baktol® P (Martin Vialatte, Magenta) y se dejó reposar en los tanques para desliar durante 10 días. Los tanques se desinfectaron con P3-oxonia® active, a base de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peracético (ECOLAB®). Se hizo un segundo tratamiento con quitosano a 0,2 g/L y otro sin quitosano, y se pasó a tanques de 30 L, durante tres meses a temperatura de sala de crianza a 17 °C. Posteriormente se embotelló y después de un año y seis meses se realizó un muestreo. Durante la FA, se siguió periódicamente la densidad y temperatura del mosto mediante densímetro electrónico Densito 30PX (Mettler Toledo, Barcelona, España) y se contaron viables cada dos días en placas de Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD), Agar lisina y MRS tomate con extracto de zumo de tomate a 100 ml/L y 100 mg/L de nistatina. Las placas de MRS se sembraron con 40 µl de acida sódica y se incubaron a en incubador de CO₂ a 27 °C. Para el seguimiento de la FML, se tomó muestra semanalmente para recuento de viables y analíticas de ácido L-málico y ácido L-láctico. El seguimiento de la 2FA se realizó mediante el seguimiento de la presión de CO₂ en el espacio de cabeza de la botella por el medidor L. Sensor 500 CO₂ (FT SYSTEM S.R.L., Alseno, Italia). Las diferentes colonias de levaduras se identificaron por PCR ITS (Esteve-Zarzoso et al., 1999) y las diferentes BAL se identificaron por PCR 16S-ARDRA (Rodas et al., 2003).

En la campaña de setiembre de 2019, se llevaron a cabo fermentaciones en tanques siempre llenos en volumen de 60 L de mosto parellada, proporcionado por Codorniu S.A. La temperatura de fermentación se mantuvo constante entre los 17-19 °C. Se realizaron fermentaciones con *S. cerevisiae bayanus* QA23 (Lallemand Bio S.L., 2000). Por disponibilidad de mosto, se fermentaron por triplicado las condiciones con ácido fumárico (MilliporeSigma) a 0,3 g/L y quitosano Bactiless™ a 0,2 g/L; y se fermentaron por duplicado las condiciones con sulfuroso a 3,0 g/L y a 6,0 g/L. Todas las condiciones se ajustaron a un mínimo de 3,0 g/L de sulfuroso. Se añadió un inóculo con el aislado CVP4.6 a 10² UFC/mL, para simular niveles bajos de contaminación de BAL en el mosto. El inóculo se creció en medio líquido MRS durante 6 días. Acabada la 1ª FA, se volvió a sulfitar con 2,5 g/hL se dejó desliar durante 11 días. Posteriormente se trasegó el vino a tanques de 30 L durante un mes a 17 °C, para observar si se iniciaba o no la FML. Se hizo estabilización en frío a 4 °C. Por motivos relativos a la situación global de pandemia, la experimentación se vio interrumpida y no se pudo realizar el pertinente tiraje, ya que los vinos se mantuvieron durante seis meses en pequeño

volumen favoreciendo su mal estado debido a la oxidación y la baja temperatura, afectando a la viabilidad celular.

3.2.2. Estudios en pie de cuba

En mayo de 2019, se realizaron ensayos para evaluar el efecto de la contaminación por BAL en el pie de cuba. Se preparó un pie de cuba en un volumen final de 2L a partir de vino de la variedad parellada proporcionada por la bodega Vallformosa, que se suplementó a 2 g/L de ácido L-málico. El primer día se mezclaron 47 mL de vino y 267 mL de H₂O, y se añadieron 33,0 g de azúcar y 1,3 g de fosfato amónico como activador de fermentación. Se calentó la mezcla hasta 40 °C para disolver los componentes y cuando bajó la T^a a 35 °C, se añadieron 0,7 g de *S. cerevisiae* EC1118. A las 24h, se añadió el volumen de vino restante, 1,61 L, y 100 g de azúcar más. A los 5 días, se transfirió a tubos de 50 mL, donde se inoculó la cepa aislada de cava CVP4.6 a 10², 10⁴ y 10⁶ UFC/mL. Paralelamente se realizó un tratamiento con quitosano a 0,20 g/L y otro con ácido fumárico a 0,30 g/L. Se hizo un seguimiento de la fermentación por pesada y se dio por finalizada la fermentación cuando el peso fue constante durante dos días, y los azúcares residuales fueron inferiores a 1 g/L.

3.2.3. Estudios en tiraje

En mayo de 2019, se realizó un tiraje con vino de la variedad parellada proporcionado por Vallformosa. Se utilizó como inóculo de *O. oeni* el aislado CVP4.5 a concentraciones de 10², 10⁴ y 10⁶ UFC/mL, para simular diferentes niveles de contaminaciones en botella durante la 2FA. El inóculo se creció en medio líquido MRS durante 6 días y 24 horas antes de inocularse, se adaptó a MRS a pH 4 y 10% etanol v/v. Al mismo tiempo se realizaron tratamientos con quitosano Bactiless™ a 0,2 g/L y otro con ácido fumárico Sigma-Aldrich a 0,3 g/L. El seguimiento de la 2FA y la FML se realizó como ya se ha comentado anteriormente. A los 4 y 15 meses de crianza, se realizó un muestreo para ver si las botellas habían realizado la FML. Durante la crianza, las botellas se mantuvieron a temperatura constante de 17 °C. Finalmente, se realizó un análisis sensorial con las condiciones control.

3.2.4. Estudios en vino sintético

Se fermentó en tubos falcon en volumen de 50 ml de Wine Like Medium (WLM) (Bordas et al., 2013) al 12% etanol v/v, inoculando 1 ml de *O. oeni* PSU-1 (Collection, 2019) y aislado de cava CVP4.6 a una concentración final en el medio de 10⁷ UFC/ml. Se realizaron tratamientos a dos concentraciones de ácido fumárico Sigma-Aldrich (0,3 y 0,6 g/L), quitosano (0,2 y 0,5 g/L) y SO₂ (0,03 y 0,06 g/L). Se prepararon soluciones stock concentradas: Ácido fumárico,

sol. stock a 30 g/L en etanol Abs al 96% v/v, quitosano Bactiless™, sol. stock a 20 g/L en WLM y finalmente SO₂, sol. stock a 6 g/L. Antes de la adición del inóculo, se compensó cada falcon añadiendo hasta 1 ml de etanol puro hasta obtener una concentración final de 12% v/v en el medio. El seguimiento de la FML se realizó como se ha comentado anteriormente. El análisis sensorial se llevó a cabo en la sala de cata de la *Facultat d'Enologia* en Tarragona, que fue diseñada según la UNE-EN ISO 8589:2010 (AENOR, 2010). Todos los vinos se cataron por un grupo de 9 catadores expertos de la Universitat Rovira i Virgili. Se llevó a cabo una cata para los diferentes tratamientos con ácido fumárico, quitosano y el control; sin adición de inóculo de *O. oeni*. Las copas se sirvieron de forma anónima y se puntuó el color, tamaño y estabilidad, estado de reducción u oxidación, integración del CO₂, untuosidad y acidez.

3.3. Analíticas generales vino

Los diferentes parámetros del vino se determinaron por las técnicas mencionadas a continuación. La DO₆₀₀ para recuentos poblacionales se determinó por espectrofotometría mediante el espectrofotómetro Evolution 60S UV-Visible (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Las coordenadas CIELab se determinaron según la metodología de (Ayala et al., 1997), y los datos fueron procesados por el programa MSCV® (Ayala, 2012). Las analíticas de ácido L-málico, ácido L-láctico, Glucosa/Fructosa, se determinaron mediante kit enzimático (Tecnología Difusión Ibérica S.L., Gavà, España), y el equipo Miura One (I.S.E. Group, I.S.E. S.r.l, Roma, Italia). El grado alcohólico (% v/v) se determinó mediante ebullometría (GAB SISTEMATICA ANALITICA S.L., Barcelona, España). El pH se determinó con el pHímetro electrónico Micro pHímetro 2002 (Crison S.L., Barcelona, España). La Acidez total se determinó por valoración con NaOH 0,1 N hasta pH 7, medido con el mismo pHímetro mencionado. La acidez volátil se determinó mediante volatímetro eléctrico (GAB SISTEMATICA ANALITICA S.L., Barcelona, España), según el método García-Tena (García Barceló, 1976). El SO₂ libre y total se determinaron mediante kit enzimático (GAB Systems, 1980) (GAB SISTEMATICA ANALITICA S.L., Barcelona, España), según la metodología de Maximillian Ripper (Ripper, 1892). Las propiedades espumantes, altura máxima (Hm) y altura estable (Hs) se determinaron mediante el uso de equipo Mosalux (Station Oenotechnique de Champagne, Epernay, France), según la metodología descrita de Mosalux (Maujean et al., 1990). Las muestras de vino base o cava se aatemperaron a 17 °C durante 24 horas antes del análisis.

3.4. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de todos los datos experimentales se llevó a cabo mediante las herramientas ANOVA y Análisis de Componentes Principales, del programa estadístico XLSTAT de Microsoft Excel. Para establecer diferencias significativas, se consideró un intervalo de confianza del 95% y un $p < 0,05$ según el test de Tukey. Todas las figuras fueron generadas con el programa GraphPad Prism[®] version 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como la media \pm DS de triplicados, excepto que se indique lo contrario en cada figura.

4. RESULTADOS

4.1. Aislamientos de BAL en cava

Con el objetivo de caracterizar las BAL que se desarrollan en cava se realizaron aislamientos de muestras proporcionadas por las bodegas participantes en el proyecto. Tanto Perelada, como Vallformosa como Codorniu proporcionaron un total de 35 muestras de vino que podían haber realizado la FML. Se desconoce la trazabilidad de las muestras, ni las variedades de uva que han fermentado, ni su estado de fermentación. Las siembras de los filtros en placas de MRS no resultaron puesto que falló el antifúngico utilizado, probablemente debido a la elevada concentración de levaduras en las muestras. Por tanto, no se pudieron realizar conteos sobre poblaciones reales de BAL en las muestras. En cuanto a los aislamientos a partir del crecimiento de las muestras inoculadas en medio enriquecido, se pudieron recuperar colonias de BAL, concretamente de *O. oeni*, que fueron nombrados bajo la nomenclatura “CVP”. De estos aislados, se utilizaron dos para los posteriores experimentos, CVP4.5 y CVP4.6. Estas cepas aisladas, comparadas con otras comerciales como PSU-1 presentan un crecimiento más lento (Figura A 1, Anexos). Mientras que las cepas comerciales pueden tardar entre 5 y 6 días en ser visibles en placa de MRS a 27 °C y un flujo de CO₂ de 10 %, las cepas aisladas de cava pueden comenzar a ser visibles a partir de 10 días.

En los muestreos en la línea de producción de Perelada y Vallformosa, se pudo observar la presencia de BAL en todos los puntos de la línea de producción en ambas bodegas (Tabla A 1, Anexos). Si bien los niveles poblacionales en ambas bodegas no representaban niveles capaces de llevar a cabo la FML, sobre 10² - 10³ UFC/mL; durante el tiempo de crianza las poblaciones de BAL aumentaron. En el muestreo en Perelada, el consumo de ácido L-málico se observó desde el muestreo a 3 Bar de presión, y después de 16 meses de crianza se completó la FML. En el muestreo en Vallformosa, no se observó un consumo de ácido L-málico durante la 2FA, pero sí que después de 13 meses de crianza se completó la FML. En ambos muestreos se recuperaron colonias de BAL que han llevado a cabo la FML. Actualmente se están identificando, por la técnica PCR VNTR (Claisse & Lonvaud-Funel, 2014) las diferentes cepas de *O. oeni*.

4.2. Estudios en bodega

En las vinificaciones de 2018 se evaluó el potencial efecto inhibitor del quitosano y de la levadura *L. thermotolerans*, cuyo carácter inhibitor se basa en la producción de ácido L-láctico. En referencia al tratamiento prefermentativo con quitosano, podemos observar que a final de la FA hubo una reducción significativa de ácido L-málico en todas las condiciones con adición de

quitosano respecto a su condición sin quitosano. La condición con la levadura que más ácido L-málico consumió fue ICV K1M, siendo más de 1 g/L; mientras que el resto de condiciones consumieron casi 0,30 g/L. Como se aprecia en la Tabla 2, este consumo no supuso un aumento en la concentración de ácido L-láctico. Ni siquiera en la condición de *L. thermotolerans*, donde se produjeron solamente $0,05 \pm 0,02$ g/L con quitosano y $0,09 \pm 0,05$ g/L sin quitosano. En cuanto a la acidez volátil, se produjeron 0,20 g/L de ácido acético, salvo en las condiciones con ICV K1M, donde se produjeron cantidades significativamente menores con $0,12 \pm 0,06$ g/L y $0,05 \pm 0,01$ g/L, con quitosano y sin quitosano, respectivamente. En todas las condiciones con quitosano, la producción de SO₂ total fue 5 mg/L significativamente mayor respecto a su control sin quitosano, excepto en las condiciones con Laktia.

Tabla 2. Efectos de los diferentes tratamientos sobre los parámetros generales de los vinos base de la campaña de 2018. Las letras en superíndice indican diferencias significativas entre diferentes levaduras. Los asteriscos en superíndice indican diferencias del tratamiento con quitosano respecto a su control sin quitosano.

Vino Base	EC1118 Quitosano	EC1118	ICV K1M Quitosano	ICV K1M	Laktia Quitosano	Laktia
Grado alcohólico % (v/v)	11,27 ± 0,12	11,27 ± 0,31	11,40 ± 0,20	11,20 ± 0,10	11,27 ± 0,12	11,33 ± 0,12
Acidez total (g/L ácido tartárico)	5,90 ± 0,17 ^{b*}	6,10 ± 0,23 ^b	5,60 ± 0,09 ^{ab*}	7,05 ± 0,26 ^{ab}	6,45 ± 0,15 [*]	7,10 ± 0,38
Ácido acético (g/L)	0,28 ± 0,06	0,19 ± 0,01 [*]	0,12 ± 0,06 ^b	0,05 ± 0,01 ^{b*}	0,23 ± 0,01	0,24 ± 0,03 [*]
SO ₂ libre (mg/L)	1,67 ± 0,21	2,07 ± 0,12	1,93 ± 0,12	1,97 ± 0,25	1,53 ± 0,15 ^b	1,60 ± 0,17 ^b
SO ₂ total (mg/L)	30,67 ± 1,53	25,33 ± 1,15 [*]	31,67 ± 5,86	25,33 ± 2,52 [*]	23,33 ± 3,06	24,00 ± 2,65 [*]
pH	3,31 ± 0,02	3,28 ± 0,01 [*]	3,28 ± 0,03 ^b	3,18 ± 0,03 ^{b*}	3,27 ± 0,02 ^{ab}	3,23 ± 0,06 ^{ab*}
Glucosa + Fructosa (g/L)	0,34 ± 0,13 ^{ab}	0,07 ± 0,05 ^{ab}	0,16 ± 0,05 ^b	0,00 ± 0,01 ^b	0,26 ± 0,14 ^a	0,44 ± 0,14 ^a
Ácido L-málico (g/L)	2,34 ± 0,03 [*]	2,57 ± 0,04	1,79 ± 0,10 [*]	2,91 ± 0,02	2,03 ± 0,06 [*]	2,26 ± 0,26
Ácido L-láctico (g/L)	0,02 ± 0,01 ^b	0,02 ± 0,02 ^b	0,01 ± 0,01 ^b	0,02 ± 0,01 ^b	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,05

Una vez acabada la FA, se volvió a realizar un tratamiento postfermentativo con quitosano y se pasó a tanques de 30 L. Como se observa en la Figura 3, el comportamiento de las 3 condiciones en función de la levadura utilizada fue diferente. En las condiciones inoculadas con EC1118 no se observó ninguna diferencia respecto al consumo de ácido L-málico entre los diferentes grupos y hasta el momento del tiraje se mantuvieron los niveles prácticamente igual. En el caso de las condiciones con ICV K1M, la adición de quitosano ya durante la FA produjo un consumo de ácido L-málico de 0,5 g/L de media respecto a la condición sin quitosano. Durante el tiempo de reposo, se consumieron hasta 0,6 g/L de ácido L-málico en las condiciones con adición prefermentativa, mientras que en las condiciones sin tratamiento se mantuvieron prácticamente

igual. No se observaron diferencias entre condiciones con el tratamiento postfermentativo en ningún caso. En las fermentaciones con Laktia, la condición control sin ningún tratamiento de quitosano completó la FML a los 68 días, mientras que el resto de condiciones se mantuvieron a niveles de media de $1,66 \pm 0,40$ g/L de ácido L-málico al mismo tiempo. La condición con quitosano prefermentativo finalizó prácticamente la FML a los 110 días. Con el tratamiento postfermentativo no se observaron diferencias hasta antes de realizar el trasvase a tanques, donde se vio una pequeña reducción del ácido L-málico en la condición con solamente la segunda adición frente a la doble adición de quitosano. Por estos resultados, se decidió no realizar el tiraje posterior de las condiciones con Laktia. En ninguna de las condiciones se pudieron recuperar viables en placa, durante el seguimiento de la FML en tanques.

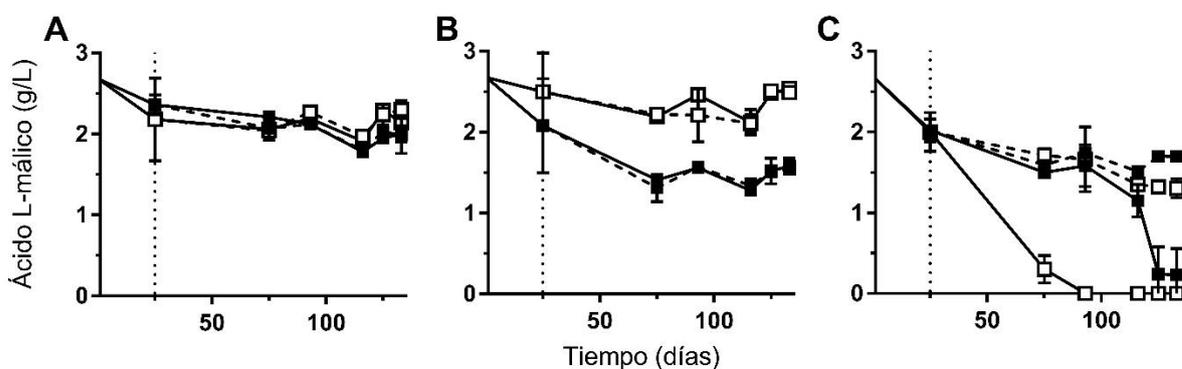


Figura 3. Niveles de ácido L-málico durante la FA y durante el tiempo en reposo en tanques de acero inox, antes de realizarse el tiraje. A) Fermentaciones con EC1118, B) fermentaciones con ICV K1M, C) fermentaciones con Laktia. ■, □; Indican condiciones con y sin tratamiento prefermentativo con quitosano respectivamente. ···, - Indican condiciones con y sin tratamiento postfermentativo con quitosano, respectivamente. La línea punteada a los 25 días indica el fin de la FA y el trasvase a los tanques.

Después de 16 meses de crianza se realizó un muestreo y se observó que todas las condiciones habían realizado la FML. Ninguna de las condiciones con diferentes levaduras presentó diferencias significativas entre sí. En todas las condiciones con EC1118, se produjeron cerca de 1,50 g/L de ácido L-láctico, mientras que con ICV K1M se produjeron cerca de 1,15 g/L en las condiciones con tratamiento de quitosano prefermentativo y cerca de 1,65 g/L sin quitosano. En cuanto a la espumabilidad se observó una mayor altura de espuma (Hm) en las condiciones con ICV K1M respecto a las condiciones con EC1118, pero no se observaron diferencias significativas (Tabla 3). Tampoco se pudo ver un efecto claro del tratamiento pre y post fermentativo sobre la espuma. El tiempo en crianza también produjo una reducción media en la acidez total de 1,50 g/L en las condiciones con EC1118 y de 1,80 g/L en las condiciones con ICV K1M.

Tabla 3. Efectos de los diferentes tratamientos sobre los parámetros generales de los vinos espumoso de la campaña de 2018. Las letras en superíndice indican diferencias significativas entre diferentes levaduras. Los asteriscos en superíndice indican diferencias del tratamiento con quitosano respecto a su control sin.

Vino espumoso	EC1118 QQ	EC1118 oQ	EC1118 Qo	EC1118 oo
Grado alcohólico % (v/v)	11,93 ± 0,12	11,75 ± 0,09 *	11,80 ± 0,01	11,70 ± 0,09 *
Acidez total (g/L ácido tartárico)	4,25 ± 0,09	4,60 ± 0,17	4,68 ± 0,11 *	4,75 ± 0,16
Ácido acético (g/L)	0,37 ± 0,05	0,37 ± 0,03	0,21 ± 0,03 *	0,21 ± 0,03 *
SO2 libre (mg/L)	3,96 ± 0,36	4,38 ± 0,63	3,54 ± 0,36	4,58 ± 0,36
SO2 total (mg/L)	33,13 ± 0,63	30,63 ± 2,25	26,25 ± 2,50	28,13 ± 0,62 *
pH	3,39 ± 0,04	3,41 ± 0,03	3,41 ± 0,01	3,37 ± 0,04
Glucosa + Fructosa (g/L)	0,35 ± 0,11	0,15 ± 0,02	0,08 ± 0,07	0,15 ± 0,03
Ácido L-málico (g/L)	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,03
Ácido L-láctico (g/L)	1,45 ± 0,05 *	1,40 ± 0,20	1,51 ± 0,06 *	1,62 ± 0,04
Hm (mm)	39,00 ± 7,94	34,33 ± 6,51	35,00 ± 6,08	34,33 ± 4,93
Hs (mm)	34,33 ± 6,66	29,33 ± 5,51	30,67 ± 4,73	29,67 ± 4,73
Vino espumoso	K1V QQ	K1V oQ	K1V Qo	K1V oo
Grado alcohólico % (v/v)	11,87 ± 0,12	11,75 ± 0,09 *	12,00 ± 0,10	11,80 ± 0,10 *
Acidez total (g/L ácido tartárico)	4,65 ± 0,52	4,63 ± 0,04	3,85 ± 0,23 *	4,88 ± 0,08
Ácido acético (g/L)	0,16 ± 0,05 ^b	0,16 ± 0,04 ^b	0,16 ± 0,02 ^{b*}	0,12 ± 0,02 ^{b*}
SO2 libre (mg/L)	4,58 ± 0,72	4,33 ± 0,63	6,25 ± 1,25	3,33 ± 1,44
SO2 total (mg/L)	30,00 ± 1,25 ^b	23,33 ± 3,82 ^b	30,42 ± 2,89 ^b	20,83 ± 0,72 ^{b*}
pH	3,42 ± 0,09	3,35 ± 0,02	3,41 ± 0,01	3,32 ± 0,05
Glucosa + Fructosa (g/L)	0,02 ± 0,01 ^b	0,04 ± 0,01 ^b	0,04 ± 0,03 ^b	0,08 ± 0,03 ^b
Ácido L-málico (g/L)	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,06 ± 0,05	0,04 ± 0,01
Ácido L-láctico (g/L)	1,14 ± 0,18 *	1,66 ± 0,03	1,19 ± 0,11 *	1,68 ± 0,02
Hm (mm)	44,00 ± 2,83	44,50 ± 2,12	39,33 ± 8,50	37,00 ± 5,29
Hs (mm)	33,00 ± 7,07	40,00 ± 1,41	33,67 ± 5,69	31,00 ± 7,21

En base a los resultados obtenidos en la vinificación de 2018, en 2019 se realizaron nuevamente ensayos añadiendo ácido fumárico y SO₂, ambos potenciales inhibidores de la FML. Durante la FA a pesar de que no hubo diferencias significativas, se apreció un efecto sobre la velocidad de fermentación. Las condiciones con quitosano llegaron a una densidad de 994 puntos dos días antes que el control, mientras que las condiciones con ácido fumárico fueron ligeramente las más lentas de todas (Figura A 2, Anexos). En todas las condiciones el inóculo inicial de CVP4.6 a 10² UFC/mL retrasó hasta en 1 punto de densidad la FA, excepto en la condición de quitosano, donde fue hasta 1,5 puntos más rápido.

En esta experimentación, la FML comenzó antes de que se finalizase la FA para las condiciones de quitosano, donde a los 10 días de fermentación se consumió hasta 0,6 g/L de ácido L-málico (Figura 4). Al final de la FA la condición con quitosano e inóculo prácticamente consumió todo el ácido L-málico. Al final del tiempo de reposo en tanques de 30 L, la condición con

quitosano acabó con 0,25 g/L de ácido L-málico. Las poblaciones de todas las condiciones indican una concentración inicial de BAL en el mosto de 10^3 UFC/mL, que con la adición del inóculo llegaron al día siguiente a 10^4 UFC/mL. A partir de entonces, las poblaciones decrecieron hasta situarse a $10^2 - 10^3$ UFC/mL durante la FA, excepto en las dos condiciones con quitosano donde llegaron a 10^5 UFC/mL. Las condiciones con ácido fumárico consumieron 0,2 g/L de ácido L-málico y el resto de condiciones con SO_2 consumieron hasta 0,5 g/L. Las poblaciones en estos casos aumentaron paulatinamente durante el tiempo de reposo y alcanzaron concentraciones de 10^6 UFC/mL excepto en la condición con ácido fumárico que se mantuvo sobre 10^4 UFC/mL.

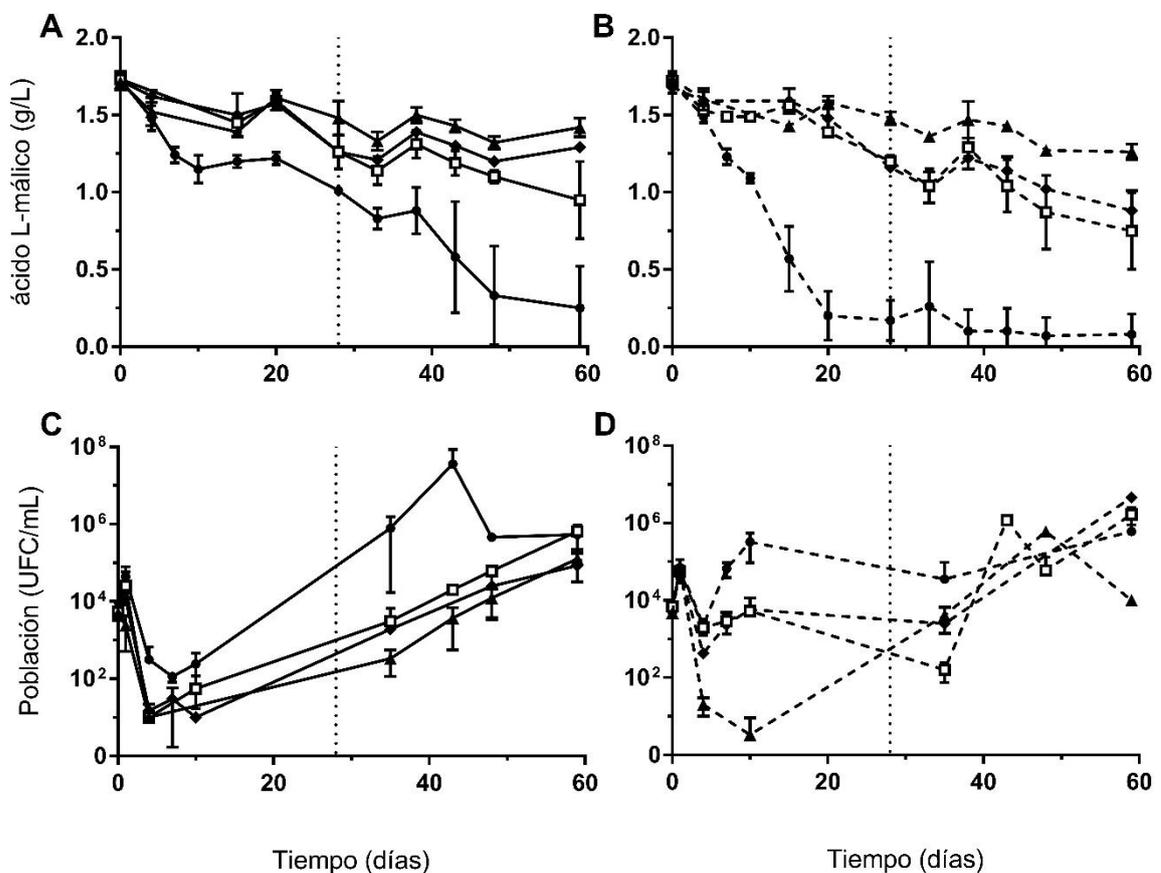


Figura 4. A, B) Niveles de ácido L-málico durante la FA y durante el tiempo en reposo en tanques de acero inox, antes de realizarse el tiraje. C y D) Niveles de población de BAL durante la FA y durante el tiempo en reposo en tanques de acero inox. (fumárico (Δ , \blacktriangle ; 0,3 g/L), quitosano (\circ , \bullet ; 0,2 g/L), SO_2 (\diamond , \blacklozenge ; 60 mg/L; \square , control con SO_2 a 30 mg/L) e inóculo CVP4.6 (\cdots con, $-$ sin; 10^2 UFC/mL)). La línea punteada en el eje horizontal en el día 28 indica el trasvase a los tanques.

En cuanto al resto de parámetros generales, las condiciones con quitosano presentaron una acidez significativamente inferior, llegando a menos de 5,0 g/L (Tabla 4). También produjeron una concentración de ácido acético superior respecto al resto de condiciones. En cuanto al pH, las condiciones con ácido fumárico presentaron un pH significativamente inferior respecto al control, de 2,98 de media.

Tabla 4. Efectos de los diferentes tratamientos sobre los parámetros generales de los vinos base de la campaña de 2019. Las letras en superíndice indican diferencias significativas entre diferentes tratamientos. Los asteriscos en superíndice indican diferencias del tratamiento con adición de inóculo de *O. oeni* respecto a su control sin. Los valores se muestran como media \pm DS de triplicados, excepto las condiciones control y con SO₂, que se realizaron por duplicado.

Vino Base	Fumárico	Fumárico + BAL	Control	Control + BAL
Grado alcohólico % (v/v)	9,83 \pm 0,23	10,12 \pm 0,06	10,10 \pm 0,07	10,13 \pm 0,11
Acidez total (g/L ácido tartárico)	5,45 \pm 0,41	5,65 \pm 0,46	5,29 \pm 0,05	5,44 \pm 0,05
Ácido acético (g/L)	0,29 \pm 0,13	0,23 \pm 0,04	0,23 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01
SO ₂ libre (mg/L)	3,17 \pm 0,76 ^{ab}	2,50 \pm 0,01 ^{ab}	2,25 \pm 0,35 ^b	2,50 \pm 0,01 ^b
SO ₂ total (mg/L)	39,58 \pm 0,72 ^c	40,00 \pm 2,17 ^c	49,00 \pm 1,41 ^b	48,75 \pm 5,30 ^b
pH	2,96 \pm 0,03 ^b	2,99 \pm 0,01 ^b	3,01 \pm 0,01 ^a	3,01 \pm 0,01 ^a
Glucosa + Fructosa (g/L)	0,12 \pm 0,02	0,27 \pm 0,03	0,14 \pm 0,06	0,20 \pm 0,21
Ácido L-málico (g/L)	1,48 \pm 0,08	1,48 \pm 0,04 [*]	1,26 \pm 0,11	1,20 \pm 0,04 [*]
Ácido L-láctico (g/L)	0,04 \pm 0,02 ^{b*}	0,03 \pm 0,04 ^b	0,08 \pm 0,11 ^{ab*}	0,15 \pm 0,01 ^{ab}
Vino Base	SO ₂	SO ₂ + BAL	Quitosano	Quitosano + BAL
Grado alcohólico % (v/v)	10,10 \pm 0,07	9,78 \pm 0,11	10,12 \pm 0,06	10,05 \pm 0,10
Acidez total (g/L ácido tartárico)	5,29 \pm 0,16	5,40 \pm 0,42	4,88 \pm 0,13 ^b	4,78 \pm 0,11 ^b
Ácido acético (g/L)	0,32 \pm 0,09	0,26 \pm 0,09	0,33 \pm 0,02	0,46 \pm 0,12
SO ₂ libre (mg/L)	4,00 \pm 0,71 ^a	3,00 \pm 0,01 ^a	3,50 \pm 0,50 ^a	3,50 \pm 0,50 ^a
SO ₂ total (mg/L)	73,75 \pm 7,07 ^c	64,38 \pm 0,88 ^c	37,08 \pm 2,60 ^a	35,92 \pm 4,40 ^a
pH	3,00 \pm 0,01 ^{ab}	3,01 \pm 0,01 ^{ab}	3,02 \pm 0,01 ^a	3,02 \pm 0,02 ^a
Glucosa + Fructosa (g/L)	0,22 \pm 0,07	0,05 \pm 0,03	0,12 \pm 0,02	0,09 \pm 0,03
Ácido L-málico (g/L)	1,26 \pm 0,01	1,16 \pm 0,03 [*]	0,98 \pm 0,04 ^b	0,02 \pm 0,02 ^{b*}
Ácido L-láctico (g/L)	0,08 \pm 0,01 ^{ab*}	0,19 \pm 0,03 ^{ab}	0,08 \pm 0,05 ^{a*}	0,67 \pm 0,10 ^a

4.3. Estudios en pie de cuba

Como siguiente paso del proceso productivo del cava, se puso el punto de mira en el pie de cuba para evaluar el crecimiento de BAL. El experimento con vino base presentó los siguientes resultados. En todos los casos, las condiciones con ácido fumárico fueron más lentas respecto al control, excepto en la condición con adición de inóculo de 10⁶ UFC/mL (Figura 5). A los 10 días de fermentación, la concentración de azúcares de todas las condiciones con ácido fumárico fue de 3,0 – 3,5 g/L, similares a las condiciones control, sobre 2,9 – 3,6 g/L (datos no mostrados). Sin embargo, en las condiciones con quitosano la concentración de azúcares fue significativamente inferior, de 1,0 g/L. A final de fermentación todas las condiciones experimentales llegaron a menos de 1,0 g/L de azúcares residuales. No se detectaron poblaciones en las condiciones con ácido fumárico desde los dos días (datos no mostrados). En cuanto al control, solamente se detectaron poblaciones en las condiciones con inóculo de 10⁴ y

10^6 UFC/mL, que fueron de 10^1 y $4 \cdot 10^2$ UFC/mL respectivamente. A final de fermentación aumentaron hasta $1,30 \cdot 10^1$ y $2,60 \cdot 10^3$ UFC/mL. En cuanto al quitosano, se detectaron poblaciones a los dos días en las condiciones con inóculo de 10^4 y 10^6 UFC/mL, que fueron de $1,7 \cdot 10^2$ y $1,2 \cdot 10^4$ UFC/mL. A final de fermentación a los 21 días, las poblaciones aumentaron hasta $3,7 \cdot 10^2$ y $4,33 \cdot 10^4$ UFC/mL. En ninguna condición se observó un consumo significativo de ácido L-málico ni producción de ácido L-láctico.

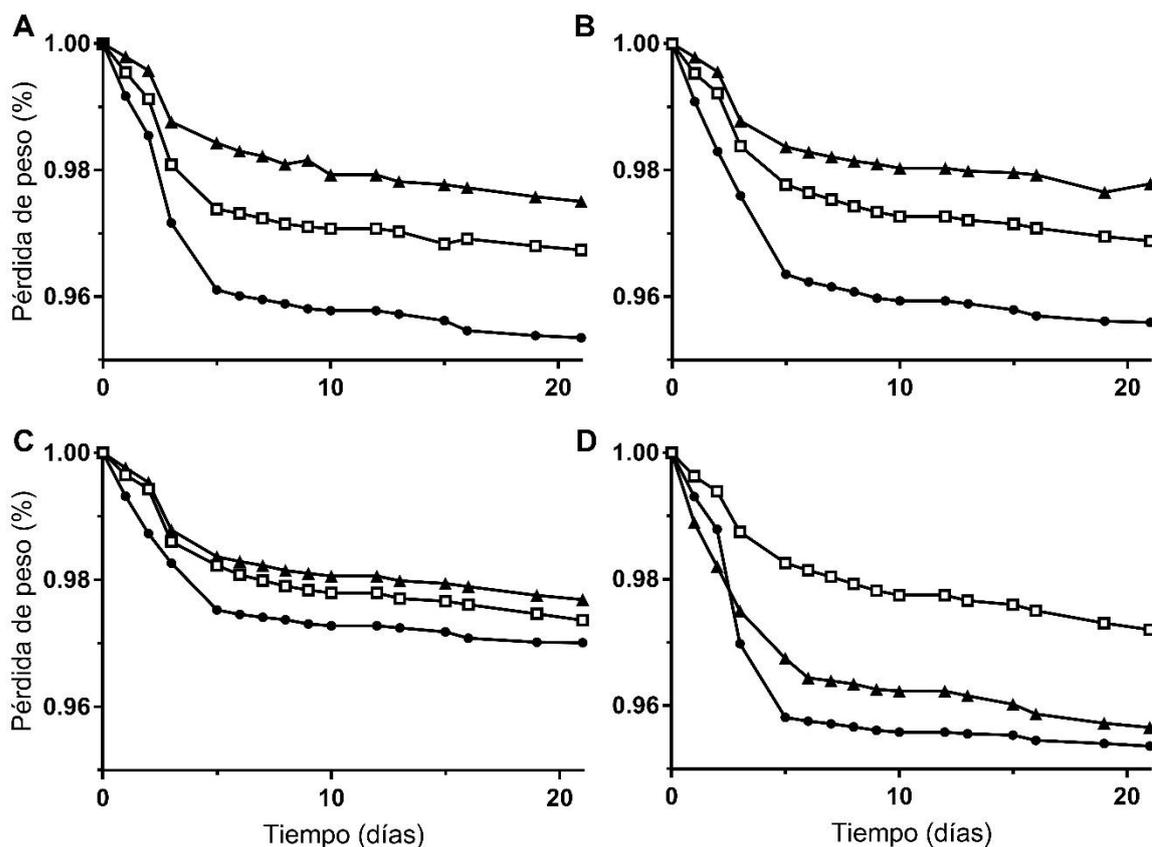


Figura 5. Efecto de diferentes tratamientos (\square control, \bullet quitosano 0,2 g/L y \blacktriangle ácido fumárico 0,3 g/L) sobre el consumo de azúcares en un pie de cuba para vino espumoso. Se añadieron diferentes concentraciones crecientes de aislado CVP4.6 (*O. oeni*) a diferentes concentraciones (A) sin adición, B) 10^2 UFC/mL, C) 10^4 UFC/mL y D) 10^6 UFC/mL. La fermentación se representa como el porcentaje de consumo de azúcares de cada grupo, normalizado sobre un total de 1.

4.4. Estudio en tiraje

Paralelamente a la campaña de 2018, se realizó un tiraje para evaluar el potencial inhibidor de la FML del ácido fumárico durante el periodo de crianza en rima, además del quitosano. Todas las condiciones con quitosano presentaron las 2FAs más lentas de todas las condiciones, además de alcanzar una presión final inferior dentro de la botella de 6 Bar respecto a las condiciones control y con ácido fumárico, que llegaron hasta 7 Bar (Figura 6). También se observó el efecto producido por el inóculo CVP4.5, puesto que, a mayor concentración de bacterias, mayor ha sido la ralentización de la 2FA. No ha sucedido lo mismo con el tratamiento con ácido fumárico,

que no ha presentado diferencias significativas respecto al control, ni en función de la población inoculada de CVP4.5.

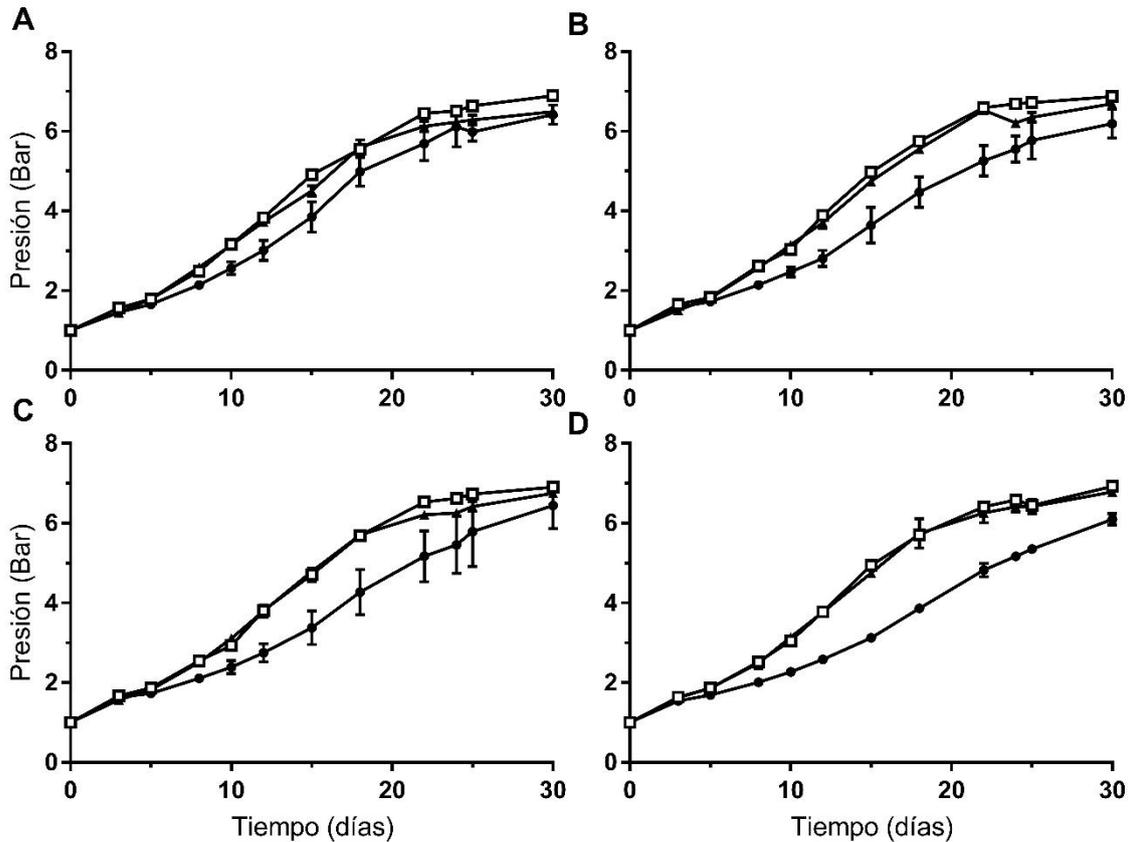


Figura 6. Seguimiento de la 2FA en botella del tiraje con diferentes tratamientos (\square control, \bullet quitosano 0,2 g/L y \blacktriangle ácido fumárico 0,3 g/L). Se añadieron diferentes concentraciones crecientes de aislado CVP4.5 (*O. oeni*) a diferentes concentraciones (A) sin adición, B) 10^2 UFC/mL, C) 10^4 UFC/mL y D) 10^6 UFC/mL).

En un primer muestreo realizado 97 días después, todas las condiciones con quitosano presentaron la menor concentración de ácido L-málico, significativamente inferior a las condiciones control y a la condición con quitosano. En ninguna condición excepto la condición control con quitosano, se pudieron recuperar viables en placa (Tabla 5). En un último muestreo 14 meses después, se observó que las diferentes condiciones habían realizado parcialmente la FML, habiendo diferencias significativas entre los grupos. Ninguna de las condiciones con ácido fumárico desarrolló la FML aunque sí se detectó un pequeño consumo de ácido L-málico en la condición inoculada con 10^6 UFC/mL de CVP4.5. Las condiciones de quitosano son las que más consumieron ácido L-málico, incluso más que las condiciones control, donde no se pudo apreciar una tendencia clara en función de la concentración creciente de inóculo de *O. oeni* añadido.

Tabla 5. Niveles de ácido L-málico, ácido L-láctico y poblaciones de BAL después de 97 y 412 días (A y B, respectivamente). Las letras en superíndice indican diferencias significativas entre diferentes tratamientos ($P < 0.05$) según Test de Tukey. Antes del tiraje, se suplementó el vino a 2 g/L de ácido L-málico.

	Inóculo (UFC/mL)	Ácido L-málico (g/L)	Ácido L-láctico (g/L)	Población (UFC/mL)		
A)	Vino base	-	1,17 ± 0,02	0,01 ± 0,01	ND	
	Control	-	1,86 ± 0,02 ^a	0,01 ± 0,02 ^a	ND	
		10 ²	1,81 ± 0,04 ^a	0,02 ± 0,02 ^a	ND	
		10 ⁴	1,77 ± 1,02 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	ND	
		10 ⁶	1,81 ± 1,04 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	ND	
	Ácido fumárico	-	1,89 ± 0,06 ^b	0,01 ± 0,01 ^b	ND	
		10 ²	1,91 ± 0,04 ^b	0,01 ± 0,01 ^b	ND	
		10 ⁴	1,92 ± 0,01 ^b	0,01 ± 0,01 ^b	ND	
		10 ⁶	1,95 ± 0,02 ^b	0,01 ± 0,01 ^b	ND	
	Quitosano	-	1,57 ± 0,12 ^c	0,09 ± 0,06 ^b	2,95E+03 ± 1,34E+03	
		10 ²	1,63 ± 0,15 ^c	0,02 ± 0,02 ^b	ND	
		10 ⁴	1,74 ± 0,03 ^c	0,13 ± 0,01 ^b	ND	
		10 ⁶	1,67 ± 0,12 ^c	0,02 ± 0,02 ^b	ND	
	B)	Control	-	0,76 ± 0,08 ^a	1,43 ± 0,18 ^a	ND
			10 ²	1,15 ± 0,72 ^a	1,27 ± 1,15 ^a	ND
			10 ⁴	0,71 ± 0,06 ^a	1,25 ± 0,30 ^a	ND
10 ⁶			1,19 ± 0,41 ^a	1,07 ± 0,29 ^a	7,55E+04 ± 7,99E+04	
Ácido fumárico		-	1,98 ± 0,19 ^b	0,10 ± 0,08 ^b	ND	
		10 ²	1,90 ± 0,04 ^b	0,04 ± 0,01 ^b	ND	
		10 ⁴	1,84 ± 0,01 ^b	0,17 ± 0,11 ^b	ND	
		10 ⁶	1,88 ± 0,16 ^b	0,04 ± 0,01 ^b	ND	
Quitosano		-	0,53 ± 0,05 ^c	1,48 ± 0,22 ^a	3,00E+01 ± 2,83E+01	
		10 ²	0,48 ± 0,03 ^c	1,49 ± 0,27 ^a	ND	
		10 ⁴	0,62 ± 0,22 ^c	1,45 ± 0,32 ^a	ND	
		10 ⁶	0,49 ± 0,08 ^c	1,64 ± 0,29 ^a	ND	

En cuanto a las analíticas de los vinos finales, se observó una concentración final de azúcares residuales, significativamente mayores en las condiciones con quitosano y ácido fumárico que el control (Tabla 6). También se observaron diferencias significativas en cuanto a la acidez, donde las condiciones con ácido fumárico se mantuvieron en una media de 6,0 g/L. En cuanto al pH, la condición con quitosano aumentó significativamente hasta 3,4 en todas las condiciones. Finalmente, la estabilidad de la espuma (Hs) de la condición con quitosano fue significativamente mayor respecto al control, con una media de 44,9 mm, mientras que la condición con ácido fumárico presentó una Hs significativamente inferior al control, con una media de 27,5 mm.

Tabla 6. Parámetros generales de los diferentes vinos espumosos con los diferentes tratamientos de ácido fumárico y quitosano. Las letras en superíndice indican diferencias significativas entre diferentes tratamientos. Los valores se muestran como media \pm DS de triplicados, excepto las condiciones control y con SO₂, que se realizaron por duplicado.

Inóculo (UFC/mL)	Glu+Fru (g/L)	Acidez total (g/L)	Ácido acético (g/L)	pH	% etOH (v/v)	Hm (mm)	Hs (mm)	
Control	-	1,16 \pm 0,08	4,99 \pm 0,05 ^a	0,26 \pm 0,06	3,31 \pm 0,01	11,65 \pm 0,01	98,00 \pm 16,97	40,00 \pm 16,97 ^a
	10 ²	1,17 \pm 0,13	5,25 \pm 0,64 ^a	0,22 \pm 0,12	3,34 \pm 0,03	11,80 \pm 0,01	66,00 \pm 14,14	33,50 \pm 2,12 ^a
	10 ⁴	1,23 \pm 0,10	5,10 \pm 0,01 ^a	0,27 \pm 0,11	3,36 \pm 0,05	11,93 \pm 0,39	81,00 \pm 9,90	32,50 \pm 0,71 ^a
	10 ⁶	1,30 \pm 0,24	4,80 \pm 0,01 ^a	0,22 \pm 0,04	3,36 \pm 0,07	11,83 \pm 0,25	81,00 \pm 18,38	29,50 \pm 0,71 ^a
Ácido fumárico	-	2,06 \pm 0,37 ^b	6,08 \pm 0,11 ^b	0,17 \pm 0,04	3,31 \pm 0,01	11,73 \pm 0,11	97,50 \pm 6,36	32,00 \pm 1,41 ^b
	10 ²	2,20 \pm 0,19 ^b	6,19 \pm 0,05 ^b	0,13 \pm 0,01	3,32 \pm 0,03	11,65 \pm 0,01	86,00 \pm 12,73	26,50 \pm 2,12 ^b
	10 ⁴	2,31 \pm 0,10 ^b	6,15 \pm 0,21 ^b	0,42 \pm 0,13	3,34 \pm 0,01	11,83 \pm 0,25	80,00 \pm 2,83	31,00 \pm 11,31 ^b
	10 ⁶	2,47 \pm 0,11 ^b	6,08 \pm 0,11 ^b	0,24 \pm 0,08	3,34 \pm 0,01	11,15 \pm 0,07	91,00 \pm 12,73	21,00 \pm 0,01 ^b
Quitosano	-	0,84 \pm 0,36 ^b	5,18 \pm 0,32 ^c	0,28 \pm 0,01	3,41 \pm 0,01 ^b	11,38 \pm 0,39	107,50 \pm 10,61	49,75 \pm 1,77 ^c
	10 ²	1,88 \pm 0,11 ^b	4,88 \pm 0,11 ^c	0,22 \pm 0,02	3,40 \pm 0,06 ^b	11,53 \pm 0,18	66,50 \pm 2,12	46,00 \pm 5,66 ^c
	10 ⁴	2,80 \pm 0,79 ^b	4,58 \pm 0,11 ^c	0,24 \pm 0,01	3,42 \pm 0,01 ^b	11,65 \pm 0,01	64,00 \pm 5,66	43,00 \pm 4,24 ^c
	10 ⁶	3,05 \pm 1,51 ^b	4,20 \pm 0,01 ^c	0,36 \pm 0,03	3,42 \pm 0,01 ^b	11,40 \pm 0,01	85,00 \pm 21,21	41,00 \pm 1,41 ^c

Con el análisis sensorial, no se han podido obtener diferencias significativas, pero sí se observan tendencias. En cuanto al control con quitosano, este sigue un perfil similar al control sin tratamiento. Los catadores lo identificaron como de burbujas más grandes y menos estables, formando menos corona en la copa, además de ser estas más agresivas en boca (Figura A 3, Anexos). Se calificó como ligeramente más oxidado que el control y con menor acidez. En cambio, el control con ácido fumárico se calificó como de burbuja pequeña y estable como el control sin tratamiento, pero mejor integrado el CO₂. Se calificó como el más joven en cuanto a crianza y el más oxidado, por encima del control sin tratamiento y con quitosano. La adición de ácido fumárico no supuso un aumento en la sensación de acidez respecto al control.

4.5. Estudios en vino sintético

Se realizaron estudios en vino sintético de algunas de las cepas aisladas de cava con el fin de caracterizar su resistencia a diferentes tratamientos inhibidores. Debido a la crisis sanitaria por la Covid-19 el estudio quedó interrumpido y sólo se pudieron evaluar un aislado de cava (*O. oeni* CVP4.6) y una cepa de referencia (*O. oeni* PSU-1). Los resultados de los diferentes tratamientos en vino sintético (WLM) muestran diferentes comportamientos en las dos cepas de *O. oeni* estudiadas. En el caso de la cepa de referencia PSU-1 la única condición que realizó la FML fue la condición control, que la completó en 7 días (Figura 7). De una población inicial de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL, disminuyó a los 2 días hasta $1,21 \cdot 10^5$ UFC/mL, pero volvió a poblaciones de $9,90 \cdot 10^6$ UCF/mL a los 5 días, dándose la FML (datos no mostrados). El resto de condiciones no presentaron un consumo de ácido L-málico, ni tampoco un crecimiento poblacional, por lo que no se llevó a cabo la FML durante 15 días. A los dos días, las poblaciones cayeron a niveles

de hasta 10^3 UFC/mL excepto en la condición con ácido fumárico a 0,3 g/L, donde se mantuvieron igual que el control (Tabla 7). En la condición con ácido fumárico a 0,6 g/L, no se detectaron poblaciones superiores a 10^3 UFC/mL desde el segundo día. A los 10 días se detectaron poblaciones del orden de 10^2 UFC/mL en todas las condiciones, excepto en la condición de ácido fumárico a 0,6 g/L y SO_2 a 0,03 g/L, donde no se detectaron (Tabla 7).

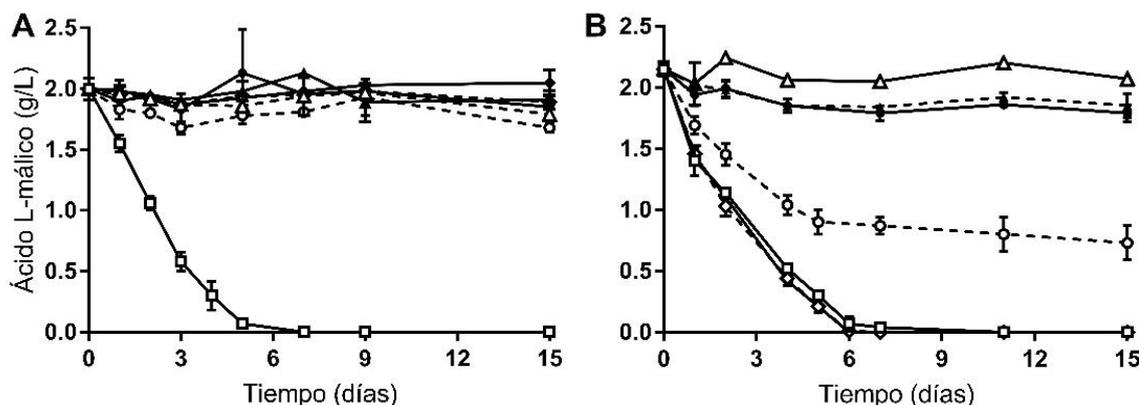


Figura 7. Efecto de diferentes tratamientos de ácido fumárico (Δ , \blacktriangle ; 0,3 y 0,6 g/L), quitosano (\circ , \bullet ; 0,2 y 0,5 g/L) y SO_2 (\diamond , \blacklozenge ; 15 y 30 mg/L; \square - control) sobre el consumo de ácido L-málico en vino sintético (WLM), para *O. oeni* PSU-1 (A) y CVP4.6 (B).

En el caso del aislado CVP4.6, tanto la condición control como las dos condiciones con SO_2 terminaron la FML en 7 días (Figura 7). Las condiciones de ácido fumárico a 0,30 g/L, 0,60 g/L y quitosano a 0,50 g/L evitaron el desarrollo de la FML. Al día siguiente de inocular, las poblaciones en la condición con ácido fumárico a 0,30 g/L, fue de $3,67 \cdot 10^5 \pm 2,89 \cdot 10^5$ UFC/mL, y a los 10 días no se detectaron viables en placa. En la condición con ácido fumárico a 0,60 g/L la población descendió hasta 10^4 UFC/mL a las 2 horas de inocularse (datos no mostrados), y a partir del día siguiente ya no se detectaron poblaciones. La condición con quitosano a 0,20 g/L no evitó la FML, pero sí que la retrasó parcialmente. A los 10 días, los niveles de ácido L-málico fueron de $0,73 \pm 0,14$ g/L y la población se mantuvo hasta $4,50 \cdot 10^2 \pm 7,07 \cdot 10^1$ UFC/mL.

Tabla 7. Evolución de las poblaciones de *O. oeni* PSU-1 y CVP4.6, con diferentes tratamientos (Δ , \blacktriangle ; 0,3 y 0,6 g/L), quitosano (\circ , \bullet ; 0,2 y 0,5 g/L) y SO_2 (\diamond , \blacklozenge ; 15 y 30 mg/L; \square - control) en vino sintético. En el punto 0 se indica el inóculo inicial para cada experimentación. En el punto 10 se indica el tiempo que tardaron aquellas fermentaciones que finalizaron la FML.

Tiempo (días)	PSU-1 (UFC/mL)		CVP4.6 (UFC/mL)	
	2	10	1	10
Inóculo (0)	$1,54\text{E}+08 \pm 7,28\text{E}+07$	-	$5,95\text{E}+08 \pm 3,89\text{E}+08$	-
Control	$1,21\text{E}+05 \pm 8,49\text{E}+03$	6 días	$4,50\text{E}+06 \pm 9,71\text{E}+05$	7 días
Ácido fumárico (0,3g/L)	$1,28\text{E}+05 \pm 1,12\text{E}+05$	$3,80\text{E}+02 \pm 2,83\text{E}+01$	$3,67\text{E}+05 \pm 2,89\text{E}+05$	ND
Ácido fumárico (0,6 g/L)	$<10^3$	ND	ND	ND
Quitosano (0,2 g/L)	$1,16\text{E}+05 \pm 2,55\text{E}+04$	$3,75\text{E}+02 \pm 2,12\text{E}+01$	$4,93\text{E}+06 \pm 1,15\text{E}+05$	$4,50\text{E}+02 \pm 7,07\text{E}+01$
Quitosano (0,5 g/L)	$8,50\text{E}+03 \pm 4,95\text{E}+03$	$1,15\text{E}+02 \pm 4,95\text{E}+01$	$9,00\text{E}+05 \pm 4,58\text{E}+05$	$<10^3$
SO_2 (0,015 g/L)	$1,10\text{E}+04 \pm 1,41\text{E}+04$	ND	$9,23\text{E}+06 \pm 1,31\text{E}+06$	7 días
SO_2 (0,03 g/L)	$1,70\text{E}+03 \pm 9,90\text{E}+02$	ND	$6,37\text{E}+06 \pm 6,66\text{E}+05$	7 días

5. DISCUSIÓN

La problemática que se plantea como motivo para iniciar el proyecto se ha visto reflejada en la experimentación llevada a cabo. Como se ha comentado, la aparición de la FML espontánea ha sido una realidad en ambos muestreos realizados en bodegas, pudiendo haber afectado al lote completo de forma heterogénea y repercutiendo sobre la productividad de ambas bodegas. Con los muestreos realizados, se ha observado que la presencia de BAL es frecuente en todos los puntos del proceso de producción desde las primeras etapas. El filtrado del vino no elimina por completo las bacterias, y el pie de cuba puede ser nuevamente un foco de contaminación de las botellas. En el caso de la bodega Castillo de Perelada, se detectaron ya en el vino niveles de ácido L-málico muy bajos ($0,86 \pm 0,01$ g/L) y la presencia de ácido L-láctico ($0,66 \pm 0,01$ g/L), por lo que se sugiere que la FML habría comenzado durante la FA, y habría acabado de darse durante el tiempo de crianza en rima. No es habitual que ambas fermentaciones coincidan en el tiempo por el aumento del etanol, la reducción de nutrientes y la producción de CO₂ que afectan a las BAL, pero pueden llegar a darse (Jussier et al., 2006). En el caso de la bodega de Vallformosa, el pie de cuba que se utiliza para el tiraje se prepara con 10 días de antelación. En caso de haber poblaciones de BAL, pueden sobrevivir y aumentar durante la crianza. Hay algunas bodegas que mantienen el pie de cuba durante tiempos superiores, pero en estos casos suelen utilizar lisozima (EC 3.2.1.17), agente descrito como bactericida para evitar la proliferación de BAL (Kemp, Alexandre, et al., 2015). Con relación a las cepas de *O. oeni* aisladas de cava, están adaptadas a condiciones duras de pocos nutrientes en el medio, etanol elevado, pH bajos y se ha visto que crecen a un ritmo más lento y no llegan a tanta densidad poblacional como las cepas comerciales. Además, se ha observado que el consumo de ácido L-málico puede iniciarse aunque no haya poblaciones de 10^5 UFC/mL como se ha descrito (Reguant et al., 2005).

Con el objetivo de establecer un protocolo para inhibir el crecimiento de BAL en el vino, se realizaron los tratamientos pre y postfermentativos con quitosano, durante la campaña de 2018. Ambos tratamientos tuvieron diferentes resultados en función de la levadura utilizada. En la condición con EC1118 no se observaron diferencias significativas con ningún tratamiento. Con la levadura ICV K1M, el tratamiento prefermentativo con quitosano no resultó beneficioso y no hubo diferencias en el tratamiento postfermentativo. Se ha descrito a esta cepa como capaz de retrasar la FML (Deltei, 2003). Su potencial radica en la producción de vinos a final de FA con una mayor acidez total, causada probablemente por una mayor producción de ácido succínico, inhibidor de la FML. En esta experiencia la condición con ICV K1M y con adición

de quitosano, no produjo una mayor acidez total que las otras levaduras, pero sí que se evitó el desarrollo de la FML. Además, a final de FA se consumió más ácido L-málico que en su control sin quitosano. Se ha descrito además como poco productora de espuma (Lallemand Bio S.L., 1972), pero tampoco se apreció una menor Hm y Hs significativa respecto al control con EC1118. En la condición con Laktia se esperaba que el ácido L-láctico a concentraciones superiores a 4 g/L produjese un efecto inhibitorio sobre las BAL (Morata et al., 2018). Algunos estudios han descrito que esta cepa en coinóculo con *S. cerevisiae* con niveles de etanol <6% v/v donde es competitiva, puede llegar a producir en 6 días en la elaboración de vino tinto hasta 5 g/L de ácido L-láctico, pero en esta experiencia, a partir de mosto de uva blanca, no hubo una producción significativa (Morata et al., 2018). Se puede observar cómo el tratamiento prefermentativo con quitosano supuso un retraso en la FML de 70 días frente al control sin quitosano, aunque finalmente terminó por tener lugar 25 días más después. La condición con tratamiento pre y post fermentativo, evitó que se diese la FML; igual que la condición con tratamiento solamente postfermentativo. Por tanto, la adición de quitosano a 0,20 g/L después de la FA sí resultó eficaz para frenar la FML hasta 100 días. El quitosano puede interactuar con componentes de vino como pectinas y proteínas, que afecten a su estructura policatiónica (Aider, 2010), por lo que más analíticas serían necesarias. En la experiencia se observa que el quitosano tiene mayor efectividad si se usa como tratamiento postfermentativo. En tratamiento prefermentativo, se observó una producción de SO₂ mayor en todas las condiciones, pero según otros autores no es suficiente como para asociarse a una mayor protección frente a la FML (Bağder Elmacı et al., 2015). Aunque durante el seguimiento de la FML se observó el consumo de ácido L-málico, no se pudieron detectar colonias en placa. Esto pudo ser debido a que el muestreo se realizó en superficie, homogeneizando los tanques de 30 L. Al estar los tanques en reposo las BAL pueden precipitar, sumado a que una homogeneización adecuada de tanques de 30 L resulta tarea compleja. También podría deberse a que las células se encontrasen en estado de viables no cultivables. A pesar los resultados en el seguimiento de la FML, no se observó un efecto negativo significativo sobre la espumabilidad derivado de los tratamientos con quitosano en ninguno de los casos, por lo que su uso no repercute en la calidad del producto final.

En la experiencia del año 2019, a parte del tratamiento prefermentativo con quitosano, se probaron otros tratamientos. De todos ellos, el del ácido fumárico a 0,3 g/L y el SO₂ a 0,06 g/L fueron los que mejores resultados proporcionaron. Durante el periodo de reposo en tanques, no permitieron un crecimiento poblacional superior a 10⁵ UFC/mL y por tanto no se inició la FML. En otros estudios, el ácido fumárico presenta un efecto bactericida a 0,3 g/L (Morata et al.,

2020). En concentraciones de 10^7 UFC/mL es capaz de detener la FML en marcha en el momento, puesto que acaba con las poblaciones de BAL. En la experimentación, no se observó este efecto bactericida total ya que las poblaciones continuaron aumentando paulatinamente hasta alcanzar 10^5 UFC/mL, pero sí que permitió controlar la FML hasta 30 días antes de llevar los tanques a estabilizar en frío a 4 °C. Aún desinfectando los tanques de inox, el trasvase del vino de tanques siempre llenos donde se fermentó, con el equipamiento de la bodega pudo haber comportado una contaminación. Si bien el quitosano influye sobre la actividad de las BAL, puede reducir sus poblaciones hasta 3 órdenes de magnitud, pero no las elimina por completo (Lallemand Bio S.L., 2014). Se detectó la producción de ácido L-láctico asociada al consumo de ácido L-málico durante la FA (datos no mostrados). Se produjo en todas las condiciones, incluso en la condición con ácido fumárico, donde se consumieron 0,3 g/L de ácido L-málico y se produjeron $0,23 \pm 0,13$ g/L. La condición de quitosano produjo $0,66 \pm 0,11$ y $0,80 \pm 0,01$ g/L de ácido L-láctico, en las condiciones sin y con inóculo respectivamente. Este aumento en la condición con ácido fumárico podría deberse a la enzima fumarasa (EC. 4.2.1.2) que está activa en BAL, y cataboliza el paso de ácido fumárico a ácido L-málico. Por tanto, el ácido fumárico podría llegar a degradarse a ácido málico y posteriormente metabolizarse a ácido L-láctico (Pilone et al., 1974). La experimentación se vio interrumpida y no se pudo realizar el tiraje por la situación de confinamiento, pero de cara a la campaña de vendimia de 2020, se prevé realizar la experimentación nuevamente en función de los resultados y realizar el tiraje.

En el experimento de tiraje realizado en mayo de 2019 se pudieron evaluar los efectos del ácido fumárico y del quitosano durante el tiempo de crianza. Partiendo de un vino base filtrado proporcionado por Vallformosa, se inoculó una de las cepas aisladas de cava que había desarrollado la FML. Claramente se puede ver que el ácido fumárico resultó mejor opción que el quitosano para evitar la maloláctica en botella hasta 14 meses; a diferencia del quitosano que a los 3 meses ya se había iniciado el consumo del ácido L-málico. Aunque no se pudieron hacer muestreos periódicos para ver la evolución de poblaciones por falta de número de botellas, no se detectaron poblaciones desde el primer muestreo a los 3 meses. Estos resultados concuerdan con el trabajo publicado sobre el ácido fumárico y su efecto sobre las poblaciones (Morata et al., 2020). No se puede comentar lo mismo del quitosano, que propició significativamente el consumo de ácido L-málico respecto al control a todas las concentraciones. La efectividad del quitosano depende en parte de su origen, ya que eso influye en su estructura policatiónica que depende del pH y del grado de deacetilación (Kong et al., 2010). En estudios con quitosano sobre *O. oeni* Lalvin VP41 en vino blanco, a dosis de 0,2 g/L no se vieron efectos sobre sus

poblaciones de 10^6 UFC/mL durante 4 días (Bağder Elmacı et al., 2015). Sí que se apreció inhibición de su crecimiento a dosis de quitosano 0,6 g/L + 40 mg/L de SO_2 . En el análisis sensorial realizado, se observó que el ácido fumárico no implica a 0,3 g/L un impacto sensorial de mayor acidez respecto al control, acorde con otros trabajos (Morata et al., 2020). El quitosano se puntuó como el menos ácido, por la mayor presencia de ácido L-láctico respecto al control.

Según estudios previos, la adición de quitosano no ralentiza la FA al no tener un efecto inhibitorio sobre levaduras *Saccharomyces*, (Bağder Elmacı et al., 2015). En la experiencia del pie de cuba, las condiciones con quitosano no solamente no ralentizaron la FA, sino que favorecieron una mayor velocidad de fermentación y un mayor consumo de azúcares a final de fermentación respecto al control. Por los resultados de esta experiencia, se observó que la adición de quitosano durante el pie de cuba no evitó el aumento de las poblaciones de BAL en concentraciones de 10^4 UFC/mL a los 21 días, y que durante el tiraje podrían llevar a cabo la FML.

En la experiencia con vino sintético se pudieron apreciar distintos comportamientos en función de la cepa de *O. oeni* inoculada. Se hace patente que la tolerancia de las cepas a los diferentes tratamientos influye directamente en la capacidad protectora del ácido fumárico y el quitosano para evitar la FML. Durante la crianza, la combinación del sulfuroso libre con compuestos como el etanol, azúcares y compuestos fenólicos provoca que pierda su efectividad contra *O. oeni*, y por tanto el vino quede desprotegido contra la FML (Ribéreau-Gayon et al., 2006). En este estudio, *O. oeni* CVP4.6, aislada de cava presenta una tolerancia mayor al SO_2 que PSU-1, cepa de referencia aislada de vino; por lo que las dosis necesarias para controlarla deberán ser mayores. También presenta una tolerancia mayor que las cepas comerciales al quitosano a las dosis recomendadas. Como ya se ha comentado, la actividad del quitosano depende de factores como el pH debido a su composición, así que a dosis de 0,20 g/L y pH 3,4 puede que no presente su mayor actividad frente a esta cepa. Otros autores han visto tolerancias similares con cepas comerciales de *O. oeni* como Lalvin VP41 a 0,20 y hasta 0,40 g/L de quitosano (Bağder Elmacı et al., 2015). Como en estudios anteriores, se inoculó en ambas experiencias una concentración de *O. oeni* de 10^8 UFC/mL, y el ácido fumárico fue capaz de evitar la FML (Morata et al., 2020).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como conclusiones del trabajo llevado a cabo en este proyecto, se desprenden las siguientes conclusiones.

- La problemática de la FML no deseada empieza en las bodegas desde las primeras etapas del proceso, ya que las BAL se detectan en todas las etapas.
- Las cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de cava, presentan mayor adaptabilidad que la cepa de referencia PSU-1, a las condiciones de la 2FA y los tratamientos con SO₂ y con quitosano.
- Se confirma el uso del ácido fumárico como el mejor tratamiento para prevenir la FML o pararla, tanto antes como después de la FA y durante el tiraje.
- No se puede apreciar un efecto negativo significativo sobre la espumabilidad derivado de los tratamientos tanto con ácido fumárico como con quitosano.

Por estos motivos, este trabajo presenta indicaciones sobre el potencial del ácido fumárico como mejor tratamiento para la prevención de la aparición de la FML no deseada en vino espumoso. También se observa el comportamiento del quitosano Bactiless™, cuyo potencial para frenar la FML puede radicar en la tolerancia de las cepas que fermenten el vino en cuestión. En todo caso, según los resultados de la campaña de 2018 sería aconsejable su uso a 0,20 g/L una vez acabada la FA y no previamente, puesto que se observó que puede favorecer el arranque de la FML dentro de botella. Para evitarlo, un último tratamiento antes del tiraje a la dosis mínima utilizada en este trabajo con ácido fumárico sería recomendable.

7. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo, esfuerzo desde mi vuelta de la Universidad de León y la entrada en los laboratorios de mi propia Universitat Rovira i Virgili, no puede darse por finalizado sin los debidos agradecimientos a todos los mencionados a continuación.

A mis padres, por el apoyo durante estos dos últimos años, por la paciencia, por creer en mí y ayudarme en todo cuanto he necesitado. A Cristina Reguant, Joan Miquel Canals y Fernando Zamora, por pensar en mí para emprender este proyecto, así como a las empresas colaboradoras. A Aitor Balmaseda, por todo lo aprendido dentro y fuera del laboratorio. Eskerrik asko lagun. A Adeline Vignault, por el tiempo compartido en Tarragona y tus consejos. Merci beaucoup. A Albert Bordons por sus correcciones del manuscrito y consejos. A los operarios de la Finca Experimental Mas dels Frares, por enseñarme el trabajo duro de la bodega durante la vendimia. A los amigos enólogos, que un día aceptaron a un biotecnólogo en su finca; Jan, Rafa, Ari, Natàlia, Cori, Pol, Ainhoa. A los compañeros de laboratorio. To my Wintour little family, who helped me and taught me so much during their brief staying at Tarragona; Tinatin, Tamta, Yusif, Ani, Lyka, Veronica, Ana, Melissa. Al café por las mañanas.

A todos ellos, gracias.

Daniel Fernández Vázquez

8. REFERENCIAS

- Abramovič, H., Košmerl, T., Ulrih, N. P. & Cigic, B. (2014). Contribution of SO₂ to antioxidant potential of white wine. *Food Chemistry*, 174, 147–153.
- AENOR. (2010). AENOR: Norma UNE-EN ISO 8589:2010/A1:2014. In *Análisis sensorial. Guía general para el diseño de una sala de cata*. AENOR. <https://www.aenor.com/normas-y-libros/buscador-de-normas/une?c=N0053610>.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 837–842.
- Auge, D., Valade, M., Epernay, D. M.-V. C., & 2000, U. (2000). Acidity of Champagne wines: use of malolactic fermentation? *Vign. Champen. Epernay*, 121, 44–56.
- Ayala, F. (2012). *Departamento de Química. Universidad de La Rioja*. <http://www.unirioja.es/color/descargas.shtml>.
- Ayala, F., Echávarri, J. F., & Negeruela, a I. (1997). A New Simplified Method for Measuring the Color of Wines. I. Red and Rosé Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3), 357–363. <http://www.ajevonline.org/content/48/3/357.abstract>.
- Bağder Elmacı, S., Gülgör, G., Tokatlı, M., Erten, H., İsci, A., & Özçelik, F. (2015). Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 107(3), 675–686.
- Balmaseda, A., Bordons, A., Reguant, C., & Bautista-Gallego, J. (2018). *Non-Saccharomyces* in wine: Effect upon *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 9(534), 1–8.
- Barro, D. (2019). *Cava: Situación de las nueve bodegas de Corpinnat que abandonan la D.O.* <https://blogs.imf-formacion.com/blog/corporativo/prl/cava-bodegas-corpinnat/>.
- Bartowsky, E. J. (2005). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation - Moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 174–187.
- Bartowsky, E. J. (2009). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*, 48(2), 149–156.
- Beltramo, C., Grandvalet, C., Pierre, F., & Guzzo, J. (2004). Evidence for Multiple Levels of Regulation of *Oenococcus oeni* clpP-clpL Locus Expression in Response to Stress. *Journal of Bacteriology*, 186(7), 2200–2205.
- Bordas, M., Araque, I., Alegret, J. O., El Khoury, M., Lucas, P., Rozès, N., Reguant, C., & Bordons, A. (2013). Isolation, selection, and characterization of highly ethanol-tolerant strains of *Oenococcus oeni* from south Catalonia. *International Microbiology*, 16(2), 113–123.
- Carreté, R., Vidal, M. T., Bordons, A., & Constantí, M. (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*.
- Cava, C. R. (2016). *Pliego de condiciones denominación de origen protegida "cava."* <http://www.docava.es/wp-content/uploads/2018/12/PLIEGO-CONDICIONES-2016-DO-CAVA.pdf>
- Cava, C. R. (2018). *Dossier datos económicos D.O.Cava 2018*. <http://www.docava.es/wp-content/uploads/2019/06/Dossier-datos-2018.pdf>.
- Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. (2014). Multiplex variable number of tandem repeats for *Oenococcus oeni* and applications. *Food Microbiology*, 38, 80 - 86.
- Collection, A. T. C. (2019). *Ficha técnica PSU-1, ATCC® BAA-331TM* (Vol. 40, Issue 16). www.atcc.org
- Coma, V. (2013). Polysaccharide-based biomaterials with antimicrobial and antioxidant properties. *Polimeros*, 23(3), 287–297.
- de Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, E. M. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135.
- Delteil, D. (2003) Yeast-Bacteria Interaction. Practical aspects in Mediterranean and Rhone red wines. *Australian and New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 481, 58 -61.
- Dicks, L. M. T., Dellaglio, F., & Collins, M. D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(2), 395–397.
- Du Plessis, H. W., Dicks, L. M. T., Pretorius, I. S., Lambrechts, M. G., & Du Toit, M. (2004). Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 19–29.
- EFSA. (2013). Scientific Opinion on the safety and efficacy of fumaric acid as a feed additive for all animal species. *EFSA Journal*, 11(2), 3102.
- EFSA. (2016). Scientific Opinion on the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite. *EFSA Journal*, 14(4).
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1), 329–337.
- FDA. (2019). *CFR - Code of Federal Regulations, Title 21, Volume 3, Fumaric acid and salts of fumaric acid*. [https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.350&SearchTerm=fumaric acid](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.350&SearchTerm=fumaric%20acid)
- Fernández, D., Reguant, C., Canals, J. M., & Bordons, A. (2020). La fermentación maloláctica en botella de los vinos espumosos; ¿Qué problemas genera y cómo se pueden evitar? *ACEenología*.
- Feuillat, M., & Charpentier, C. (1982). Autolysis of yeasts in champagne. *American Journal of Enology and Viticulture*, 33(1), 6–13. <https://europepmc.org/article/AGR/IND82059489>
- Fugelsang, K. C. (1997). The Lactic Acid Bacteria. In *Wine Microbiology* (pp. 3–47). Springer US.
- GAB Systems. (1980). *Kit enzimático análisis sulfuroso GAB Systems*. http://shop.gabsystem.com/data/descargas/InstSulphurDioxidePackSO2A5_En.pdf.
- García Barceló, J. (1976). *Metodología de Análisis de Vinos y Derivados* (Sepsa (Ed.)). http://shop.gabsystem.com/data/descargas/acidez_volatil_Garcia-Tena.pdf.
- Graça Da Silveira, M., Vitória, M., Romão, S., Loureiro-Dias, M. C., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2002). Flow Cytometric Assessment of Membrane Integrity of Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6087–6093.
- Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L., & Vincenzini, M. (2002). Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*, 44(5), 374–378.
- Jamal, Z., Miot-Sertier, C., Thibau, F., Dutilh, L., Lonvaud-Funel, A., Ballestra, P., Le Marrec, C., & Dols-Lafargue, M. (2013). Distribution and Functions of Phosphotransferase System Genes in the Genome of the Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(11), 3371–3379.

- JECFA. (1999). Considerations about fumaric acid by Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FNP, Compendium of Food Additives Specifications*, 52(955).
- Jorro, I. (2019). *Grifols inyecta 61 millones en Juvé & Camps para el* 76%. https://cronicaglobal.espanol.com/business/grifols-juve-camps_224214_102.html.
- Jussier, D., Mornéau, A. D., & Mira De Orduña, R. (2006). Effect of Simultaneous Inoculation with Yeast and Bacteria on Fermentation Kinetics and Key Wine Parameters of Cool-Climate Chardonnay. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 221–227.
- Karagiannis, S., & Lanaridis, P. (1999). *The Effect of Various Vinification Parameters on the Development of Several Volatile Sulfur Compounds in Greek White Wines of the Cultivars Batiki and Muscat of Hamburg*.
- Kemp, B., Alexandre, H., Robillard, B., & Marchal, R. (2015). Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(1), 19–38.
- Kemp, B., Wiles, B., & Inglis, D. (2015). Gushing of Sparkling Wine at Disgorging. *Practical Winery and Vineyard*, October, 58–63.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51–63.
- Lallemend Bio S.L. (1972). *Ficha técnica ICV K1Marquée*. <https://catalogapp.lallemendwine.com/uploads/yeasts/docs/57dc61cb45d8634ea8c1bfeb9447d728357d8b71.pdf>.
- Lallemend Bio S.L. (2000). *Ficha técnica QA23*. <https://catalogapp.lallemendwine.com/uploads/yeasts/docs/c2ca8ab180e1ae329ffe5f9913b21068c39acbe7.pdf>.
- Lallemend Bio S.L. (2008). *Ficha técnica No Brett Inside*. <https://catalogapp.lallemendwine.com/uploads/chitosan/docs/b2cab80381fd66b4c5e5222acd571f3d355b352c.pdf>.
- Lallemend Bio S.L. (2014). *Ficha técnica Bactiless™*. <https://catalogapp.lallemendwine.com/uploads/chitosan/docs/c52375d7e83d171f13c16b8df026d19aba99f3c0.pdf>.
- Lallemend Bio S.L. (2017). *Ficha técnica Laktia™*. <https://catalogapp.lallemendwine.com/uploads/yeasts/docs/b21357bf2fae1a0bf29fd909f16e74b67264fbf9.pdf>.
- Lallemend Bio S.L. (2018). *Ficha técnica EC-1118*. <https://catalogapp.lallemendwine.com/uploads/yeasts/docs/5f38a7ff1bf234c66ba6f57f5812b05593556124.pdf>.
- Lallemend Bio S.L. (2019). *Ficha técnica Go-Ferm Protect*. <https://catalogapp.lallemendwine.com/uploads/nutrient/docs/cafcabe49689eb1592a0aee3299b32ef7090c5ea.pdf>.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76(1–4), 317–331.
- Lopez-Barajas, M., Lopez-Tamames, E., Buxaderas, S., De, M. C., Torre-Boronat, L. A., & Bromatologia, N. Y. (1998). *Effect of Vinification and Variety on Foam Capacity of Wine Acknowledgements: We are grateful to Segura Viudas SA, Castellblanch SA, and Freixenet*.
- Maujean, A., Poinssaut, P., Dantan, H., Brissonnet, F., & Cossiez, E. (1990). Etude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents. II: Mise au point d'une technique de mesure de la moussabilité de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bulletin de l'OIV*, 63, 711–712.
- Morata, A., Bañuelos, M. A., López, C., Song, C., Vejarano, R., Loira, I., Palomero, F., & Suarez Lepe, J. A. (2020). Use of fumaric acid to control pH and inhibit malolactic fermentation in wines. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 37(2), 228–238.
- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M. A., González, C., & Suárez Lepe, J. A. (2018). *Lachancea thermotolerans* applications in wine technology. *Fermentation*, 4(3).
- Neto, R., Mota, M. J., Lopes, R. P., Delgado, I., & Saraiva, J. A. (2016). Growth and metabolism of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation under pressure. *Letters in Applied Microbiology*, 63(6), 426–433.
- OIV. (2015). *International Code of Oenological Practices*. 2012, 1–17.
- OIV. (2009a). International Code of Oenological Practices - OIV - OENO 337A/2009. *OIV Code Sheet*, 2015/01, 2–15. <http://www.oiv.int/public/medias/3486/e-code-ii-3212.pdf>
- OIV. (2009b). International Oenological Codex Chitosan. *International Oenological Codex*. <http://www.oiv.int/public/medias/4066/e-coei-1-chitos.pdf>
- Pilone, G. J., Rankine, B. C., & Pilone, D. A. (1974). *Inhibiting malo-lactic fermentation in australian red wines by adding fumaric acid*. 5064.
- Reguant, C., Carreté, R., Constantí, M., & Bordons, A. (2005). Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain. *FEMS Microbiology Letters*, 246(1), 111–117.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications* (2 nd). John Wiley & Sons, Ltd.
- Ripper, M. (1892). Die schweflige Saure im Weine und deren Bestimmung. *Journal Fuer Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung*, 46, 428.
- Rodas, A. M., Ferrer, S., & Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3), 412–422.
- Rungsardthong, V., Wongvuttanakul, N., Kongpien, N., & Chotiwaranon, P. (2006). Application of fungal chitosan for clarification of apple juice. *Process Biochemistry*, 41, 589–593.
- Saayman, M., Van Vuuren, H. J. J., Van Zyl, W. H., & Viljoen-Bloom, M. (2000). Differential uptake of fumarate by *Candida utilis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6), 792–798.
- Todd, B., Fleet, G. H., & Henschke, P. A. (2000). Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: Potential application in sparkling wine production. *Am. J. Enol. Vitic.*, 51, 65–72.
- Torresi, S., Frangipane, M. T., Massantini, R., Frangipane, M. T., Garzillo, A. M. V., & Contini, M. (2014). Effects of a β -glucanase enzymatic preparation on yeast lysis during aging of traditional sparkling wine. *Food Research International*, 55, 83–92.
- Tourdot-Maréchal, R., Fortier, L.-C., Guzzo, J., Lee, B., & Divie, C. (1999). Acid sensitivity of neomycin-resistant mutants of *Oenococcus oeni*: a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. *FEMS Microbiology Letters*, 178, 319–326.
- Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P., & Dellaglio, F. (1998). Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in Applied Microbiology*, 27(5), 243–246.
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1999). Wine Analysis and Production. In *Wine Analysis and Production*. Springer US.

9. ANEXOS

Figuras anexas

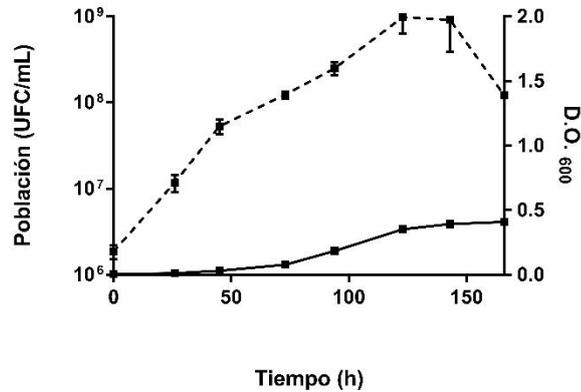


Figura A 1. Curva de crecimiento de aislado de cava CVP4.6, del muestreo de botellas susceptibles de haber realizado la FML por parte de empresa. La línea punteada representa la población en UFC/mL y la línea continua la DO₆₀₀.

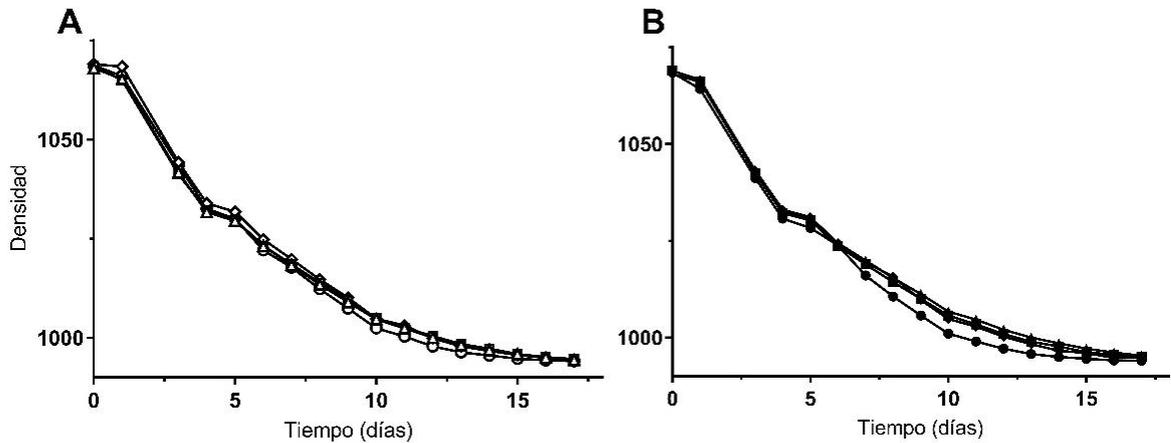


Figura A 2. Efecto de los diferentes tratamientos (fumárico (Δ, ▲; 0,3 g/L), quitosano (○, ●; 0,2 g/L), SO₂ (◊, ◆; 60 mg/L; □, ■; control con SO₂ a 30 mg/L) e inóculo CVP4.6 (A) sin inóculo y B) con inóculo) en la velocidad de fermentación de la FA.

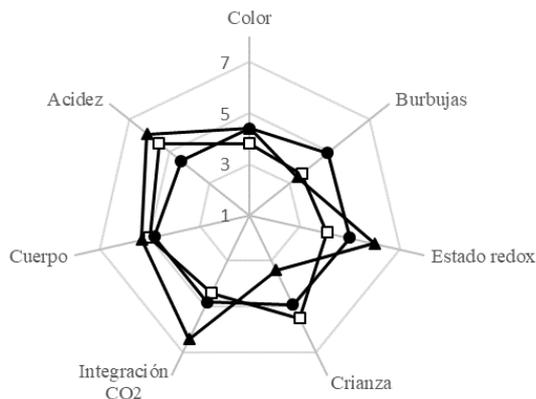


Figura A 3. Resultados del análisis sensorial de las diferentes condiciones (□ control, ▲ ácido fumárico y ● quitosano). En el centro del gráfico confluyen los atributos de color verdoso, burbujas pequeñas y redondas, reducido, joven, agresivo, ligero y plano; mientras que en los extremos confluyen el color dorado, burbujas grandes y efímeras, oxidado, exceso de tostados, cremoso, pesado y acerbo; para los atributos de color, burbujas, estado redox, notas de crianza, integración del CO₂, cuerpo y acidez, respectivamente.

Tablas anexadas

Tabla A 1. Conteo de poblaciones en los diferentes muestreos de los diferentes puntos del proceso de producción de las bodegas colaboradoras y seguimiento de la 2FA de ambos tirajes.

Muestreo Castillo de Perelada			
Muestreo	Ácido L-málico (g/L)	Ácido L-láctico (g/L)	(UFC/mL)
Vino sin filtrar	0,86 ± 0,01	0,66 ± 0,01	1,82E+03 ± 5,13E+01
Vino filtrado	0,87 ± 0,01	0,66 ± 0,01	4,17E+02 ± 1,25E+02
Pie de cuba	0,69 ± 0,03	0,06 ± 0,03	ND
Licor de Tiraje	0,68 ± 0,01	0,54 ± 0,01	1,77E+02 ± 4,93E+01
Tiraje - 06/03/19	0,81 ± 0,01	0,61 ± 0,01	2,67E+02 ± 4,04E+01
Muestreo a 3 Bar - 13/03/19	0,75 ± 0,02	0,63 ± 0,02	3,67E+02 ± 2,11E+02
Muestreo a 8 Bar - 23/04/19	0,68 ± 0,02	0,69 ± 0,02	6,67E+02 ± 1,36E+02
Muestreo final 2FA - 10/06/19	0,56 ± 0,01	0,56 ± 0,01	1,15E+03 ± 4,19E+02
Muestreo final FML - 21/07/20	0,02 ± 0,01	1,14 ± 0,01	4,45E+02 ± 4,17E+02
Muestreo Vallformosa			
Muestreo	Ácido L-málico (g/L)	Ácido L-láctico (g/L)	(UFC/mL)
Vino sin filtrar	1,34 ± 0,01	0,01 ± 0,01	2,05E+03 ± 3,56E+02
Vino filtrado	1,36 ± 0,04	0,01 ± 0,01	9,27E+02 ± 1,38E+02
Pie de cuba mañana	1,04 ± 0,02	0,01 ± 0,01	4,17E+02 ± 1,12E+02
Pie de cuba tarde	1,01 ± 0,03	0,01 ± 0,01	4,80E+02 ± 8,19E+01
Pie de cuba siguiente	0,57 ± 0,01	0,01 ± 0,01	5,22E+03 ± 1,08E+03
Licor de Tiraje	0,82 ± 0,04	0,03 ± 0,01	2,03E+02 ± 4,16E+01
Tiraje - 14/06/19	1,25 ± 0,02	0,01 ± 0,02	9,00E+01 ± 1,41E+01
Muestreo a 3 Bar - 28/06/19	1,25 ± 0,03	0,01 ± 0,01	1,50E+02 ± 3,00E+01
Muestreo a 8 Bar - 03/09/19	1,26 ± 0,01	0,01 ± 0,01	ND
Muestreo final FML - 21/07/20	0,01 ± 0,01	0,85 ± 0,01	1,26E+03 ± 9,69E+02