

PoI FIGUEROLA GATELL

**EFFECTE DE *LACHANCEA THERMOTOLERANS* I L'ÀCID L-LÀCTIC
SOBRE *OENOCOCCUS OENI* I LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA**

TREBALL FINAL DE MÀSTER

dirigit per Gemma Beltran i Cristina Reguant

Máster en BEGUDES FERMENTADES

Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

1 de setembre de 2020

EFFECTE DE *LACHANCEA THERMOTOLERANS* I L'ÀCID L-LÀCTIC SOBRE *OENOCOCCUS OENI* I LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA

Figuerola-Gatell, P., Beltran, G. i Reguant, C.

pol.figueroles@estudiants.urv.cat

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili,
Campus Sescelades, 43007 Tarragona, Espanya

Paraules clau: *Lachancea thermotolerans*, *Oenococcus oeni*, vi, àcid L-làctic, fermentació malolàctica, inoculació seqüencial.

Índex

Resum.....	3
Abstract	3
1. Introducció	4
1.1. <i>Lachancea thermotolerans</i>	6
2. Objectius.....	9
3. Materials i mètodes	10
3.1. Soques utilitzades	10
3.2. Plantejament experimental	10
3.3. Medis utilitzats.....	11
3.3.1. Most sintètic.....	11
3.3.2. Vi sintètic o <i>Wine Like Medium</i> (WLM)	12
3.3.3. Medis de cultiu	12
3.4. Fermentació Alcohòlica	13
3.4.1. Inoculació	13
3.4.2. Seguiment	13
3.4.3. Final	13
3.5. Fermentació Malolàctica	14
3.5.1. Inoculació	14
3.5.2. Seguiment	14
3.5.3. Final	14
3.6. PCR quantitativa (qPCR).....	14
3.7. Anàlisis químiques	15
3.8. Anàlisis estadístiques	15
4. Resultats	16
4.1. Fermentacions alcohòliques individuals.....	16
4.2. Fermentacions alcohòliques seqüencials	17
4.3. Fermentacions malolàctiques a partir de most sintètic fermentat	19
4.4. Fermentacions malolàctiques amb vi sintètic i diferents concentracions d'àcid L-làctic	21
5. Discussió	23
6. Conclusions i perspectives de futur	28
7. Bibliografia	29
Annex 1. Dades suplementàries.....	32

Resum

En els darrers anys, l'estudi i ús dels llevats no-*Saccharomyces* ha anat en augment, però els efectes d'aquests sobre els bacteris de l'àcid làctic (BAL) i la fermentació malolàctica (FML), en part, encara són desconeguts. *Lachancea thermotolerans* és un llevat que es caracteritza per la producció d'àcid L-làctic. En aquest estudi s'ha abordat l'efecte de l'àcid L-làctic sobre la FML. Es van estudiar 6 soques de *L. thermotolerans*, entre les quals una soca comercial, en fermentació alcohòlica (FAL) individual en most sintètic per a determinar la capacitat de producció d'àcid L-làctic. Algunes d'aquestes soques van ser seleccionades per a realitzar FAL en most sintètic, amb inoculació seqüencial de *Saccharomyces cerevisiae* a les 48 hores. Els vins resultants es van utilitzar per a realitzar FML, amb dues soques d'*Oenococcus oeni*. Per altra banda, es van realitzar FMLs amb vi sintètic, amb 3 condicions d'àcid L-làctic: 0 g/l, 2,5 g/l i 5 g/l. En aquests assajos també es van estudiar dues soques d'*O. oeni*. Tant en les FAL individuals com seqüencials, les soques de *L. thermotolerans* van produir nivells molt baixos d'àcid L-làctic, probablement degut a la composició del most, de manera que en les subseqüents FML no es va poder determinar l'efecte d'aquest compost. Malgrat això, les FML amb millor cinètica fermentativa eren les que es realitzaven en vins que havien estat fermentats amb *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae*, i no amb *S. cerevisiae* sol. Als assajos amb vi sintètic, la millor condició d'àcid L-làctic era a 0 g/l, i com més elevada més es dificultava el desenvolupament de la FML, tot i que la tolerància a àcid L-làctic era dependent de soca de BAL. A 5 g/l d'àcid L-làctic cap soca podia realitzar la FML. Així doncs, es va determinar que l'àcid L-làctic té un efecte potencialment inhibidor sobre els BAL i la FML en funció de la concentració, tot i que calen més estudis i més condicions per confirmar aquests resultats.

Abstract

In the last years, the study and use of non-*Saccharomyces* yeasts has increased, but the effects on lactic acid bacteria (LAB) and malolactic fermentation (MLF), in part, remain unknown. *Lachancea thermotolerans* is a yeast characterized by the production of L-lactic acid. The aim of this study is to address the effects of this compound on MLF. Six strains of *L. thermotolerans* were studied, including a commercial strain. To determine the production capacity of L-lactic acid, the strains were tested in individual alcoholic fermentation (AF) in synthetic must. Some of these strains were selected to perform AF in synthetic must, with sequential inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* at 48 hours. The resulting wines were used to perform MLF, using two strains of *Oenococcus oeni*. On the other hand, MLFs in synthetic wine were performed, studying 3 conditions of L-lactic acid: 0 g/L, 2.5 g/L and 5 g/L. Two strains of *O. oeni* were also studied in these trials. In both individual and sequential AF, strains of *L. thermotolerans* produced very low levels of L-lactic acid, probably due to the composition of the must. Therefore, the effect of L-lactic acid in subsequent MLFs could not be determined. Nevertheless, the best fermentative kinetics in MLF were observed in wines produced with *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae*, but not *S. cerevisiae* alone. In the trials with synthetic wine, the best condition of L-lactic acid was 0 g/L, and the higher the concentration, the more difficult the MLF development, although the tolerance to L-lactic acid was strain dependent. At 5 g/L of L-lactic acid none of the strains could perform MLF. Thus, L-lactic acid exhibited a potential inhibitory effect on BAL and MLF, depending on the concentration, but more studies and conditions are required to confirm these results.

1. Introducció

L'elaboració del vi té diferents etapes, entre les quals s'hi troben la fermentació alcohòlica (FAL) i la fermentació malolàctica (FML). La FAL és un procés microbiològic complex, en què els llevats juguen un paper determinant. *Saccharomyces cerevisiae* és l'espècie de llevat que lidera la FAL, i té un avantatge competitiu respecte altres llevats degut a l'alta capacitat fermentativa i resistència a condicions ambientals adverses (Albergaria *et al.*, 2016). De totes maneres, *S. cerevisiae* no és l'única espècie de llevat implicada amb la FAL, sinó que hi ha altres espècies agrupades sota el terme de no-*Saccharomyces* que també poden influir en el desenvolupament de la FAL, sobretot en els estadis inicials, tal i com passaria en una fermentació espontània (Padilla *et al.*, 2016; Du Plessis *et al.*, 2017; Balmaseda *et al.*, 2018; Benito, 2018).

En alguns vins, també es realitza la FML, que consisteix en la reacció enzimàtica de descarboxilació de l'àcid L-màlic a l'àcid L-làctic i CO₂. La FML sol dur-se a terme després de la FAL, i és realitzada pels bacteris de l'àcid làctic (BAL). L'objectiu de la FML és reduir l'acidesa (augment de pH) i propiciar una estabilitat microbiològica derivada del consum de substrats (Liu, 2002; Bartowsky, 2005). A més de realitzar la FML, els BAL també poden tenir un impacte en les propietats sensorials per la producció de metabòlits secundaris, com el glicerol (considerat positiu) i l'àcid acètic (considerat negatiu), i també produir compostos potencialment perillosos per a la salut humana com les amines biògenes i els precursors del carbamat d'etil (Bartowsky, 2005; Du Plessis *et al.*, 2017).

Els BAL que es troben al vi s'anomenen BAL autòctons i poden realitzar la FML de manera espontània. Aquests BAL pertanyen als gèneres de *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Oenococcus*. La principal espècie responsable de la FML és *Oenococcus oeni* (antigament *Leuconostoc oenos*), gràcies a la seva resistència a les condicions adverses del vi, i conseqüentment, és la que se selecciona per a realitzar FML inoculades (Liu, 2002; Bartowsky, 2005). En el cas de la FML espontània, els BAL autòctons creixen gràcies al consum de sucres residuals als estadis finals de la FAL (Lonvaud-Funel, 1999). Per altra banda, els BAL també poden ser inoculats, ja que així es pot seleccionar una soca concreta que tingui bona capacitat de producció de l'enzim malolàctic i asseguri l'inici de la FML. Existeixen dues estratègies d'inoculació de BAL: (a) inoculació simultània o coinoculació juntament amb els llevats, de manera que la FML es realitzarà amb la FAL, o (b) inoculació seqüencial, un cop ha acabat la FAL. La influència dels llevats sobre els BAL serà diferent en funció de l'estratègia d'inoculació (Du Plessis *et al.*, 2017).

En els darrers anys, el canvi climàtic està propiciant canvis d'algunes de les pràctiques enològiques degut a l'impacte que aquest té sobre la vinya. Aquests efectes inclouen l'augment del rendiment d'etanol i la disminució de l'acidesa total del raïm quan assoleix la maduresa. Aquest fet es dona principalment a les regions vitivinícoles més caloroses (Fleet, 2008; Gobbi *et al.*, 2013; Benito, 2018). Per tal de combatre aquests efectes, la recerca en el món de l'enologia ha anat orientada, en part, a l'ús simultani o seqüencial de *S. cerevisiae* amb llevats no-*Saccharomyces*, ja que en general disminueixen el rendiment d'alcohol (Du Plessis *et al.*, 2017; Vilela, 2019). Amb una selecció adequada de soques, els llevats no-*Saccharomyces* poden millorar el procés de producció i/o qualitat del vi. En general, aquests llevats no poden dur a terme fermentacions per si sols, però sí que, en alguns casos, poden regular el rendiment d'etanol ja que consumeixen part dels sucres, i per tant no poden ser utilitzats per *S. cerevisiae*.

A més, poden aportar diferents metabòlits, sobretot a les primeres hores de FAL (Jolly *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2016; Du Plessis *et al.*, 2017). Malgrat això, l'aportació de metabòlits no sempre es tradueix en un canvi a nivell sensorial. Algunes espècies de llevats no-*Saccharomyces* són *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bacillaris* (antigament *Candida zemplinina*), *Torulaspora delbrueckii* i *Lachancea thermotolerans*. Partint de que la FAL té un efecte sobre la FML i que els llevats no-*Saccharomyces* afecten la FAL, aquests també acaben tenint una repercussió sobre la FML (Du Plessis *et al.*, 2017; Balmaseda *et al.*, 2018). Com més requeriments nutricionals tinguin els llevats durant la FAL, tant *S. cerevisiae* com no-*Saccharomyces*, més dificultat tindran els BAL per a créixer, per tant hi haurà un efecte antagonista (Balmaseda *et al.*, 2018). A nivell de cinètica, la presència de les espècies *M. pulcherrima*, *S. bacillaris*, *T. delbrueckii* i *L. thermotolerans* en coinòcul amb *S. cerevisiae* escurça la durada de la FML seqüencial entre 5 i 13 dies respecte el control de *S. cerevisiae*, segons un estudi de Du Plessis *et al.* (2017). Pel que fa a altres paràmetres, hi poden haver diferències de pH, acidesa volàtil, àcid làctic i glicerol. De totes maneres, els resultats sempre són dependents de soca (Benito (Á.) *et al.*, 2015; Du Plessis *et al.*, 2017).

M. pulcherrima pot produir 2-feniletanol i tiols volàtils relacionats amb aromes de fruita tropical, fruita de la passió i fusta de boix, a més d'alliberar àcids grassos de cadena mitjana (AGCM) i manoproteïnes. També se sap que pot disminuir la producció d'etanol i els nivells d'àcid acètic respecte la fermentació de *S. cerevisiae* (Contreras *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Du Plessis *et al.*, 2017). Els efectes que *M. pulcherrima* pot tenir sobre la FML són la millora de l'adaptació dels BAL al medi gràcies a les manoproteïnes i l'augment de la velocitat de consum d'àcid L-màlic, tot i que la producció d'AGCM pot generar l'efecte contrari (Guilloux-Benatier *et al.*, 1998; Du Plessis *et al.*, 2017).

S. bacillaris es caracteritza per la preferència de consum de fructosa respecte la glucosa, i per l'alta capacitat fermentativa que li permet acabar la FAL per ella mateixa, fet que en fermentacions amb *S. cerevisiae* pot accelerar la cinètica fermentativa, però no modifica el rendiment d'etanol. Té una alta capacitat de produir glicerol, alcohols superiors, esters d'etil, àcids grassos de cadena curta, àcid cítric i 2-feniletanol, i disminuir l'àcid acètic (Andorrà *et al.*, 2010a; Jolly *et al.*, 2014; Balmaseda *et al.*, 2018). En un estudi de Du Plessis *et al.* (2017), els vins produïts per una FAL mixta de *S. cerevisiae* amb *S. bacillaris* van ser els que van tenir menor astringència. Els efectes que *S. bacillaris* pot tenir sobre la FML són l'augment de consum d'àcid L-màlic, encara que la presència d'àcid cítric i l'elevat consum de nutrients podrien tenir un efecte advers (Du Plessis *et al.*, 2017; Balmaseda *et al.*, 2018).

T. delbrueckii produeix baixes quantitats d'àcid acètic en comparació amb *S. cerevisiae*, fet que és d'interès en la producció de vins botrititzats (Bely *et al.*, 2008). *T. delbrueckii* també es caracteritza per ser una espècie productora d'àcid pirúvic, glicerol, esters, fenols volàtils, manoproteïnes i compostos sulfurosos, i baixes quantitats d'acetaldehid i alcohols superiors. També té activitat β -D-glucosidasa, que permet obtenir vins amb altes quantitats de terpens (Renault *et al.*, 2009; Belda *et al.*, 2015; Padilla *et al.*, 2016). Se sap que és poc tolerant a baixes concentracions d'oxigen, i que això té més efecte que la toxicitat del propi etanol, i de fet no és capaç d'acabar la FAL (Jolly *et al.*, 2014). Els efectes que *T. delbrueckii* pot tenir sobre la FML són l'augment de consum d'àcid L-màlic probablement gràcies a l'alliberament d'àcid pirúvic i manoproteïnes (Belda *et al.*, 2015, 2016).

1.1. *Lachancea thermotolerans*

L. thermotolerans es caracteritza per realitzar tant la fermentació làctica, com l'alcohòlica. Degut a aquest metabolisme, el consum de sucres no només es focalitza a la producció d'etanol, sinó que l'àcid L-làctic és produït en elevades quantitats, amb variacions en funció de les soques i del most (Zhu *et al.*, 2020). L'elevada producció d'àcid làctic té un efecte sobre el pH, causant una disminució d'aquest (Morata *et al.*, 2018; Porter *et al.*, 2019). A més de l'àcid L-làctic, *L. thermotolerans* pot produir glicerol, àcid pirúvic, 2-feniletanol, i la baixa producció d'acidesa volàtil i alcohols superiors (exceptuant el 2-feniletanol), entre d'altres metabòlits (Vilela-Moura *et al.*, 2008; Gobbi *et al.*, 2013; Benito, 2018; Porter *et al.*, 2019). De la mateixa manera que *T. delbrueckii*, és poc tolerant a baixes concentracions d'oxigen (Jolly *et al.*, 2014). Els efectes sensorials de *L. thermotolerans* sobre el vi final es mostren a la Figura 1. Els vins produïts en un estudi de Gobbi *et al.* (2013) amb coinòculs de *S. cerevisiae*/*L. thermotolerans* van ser qualificats com a vins picants i àcids, mentre que en el cas de Benito *et al.* (2016b) la percepció va ser de dolçor i millora de l'acidesa sense valorar-ho com un defecte. Tan els paràmetres químics com sensorials depenen de la soca de la que es tracta, del temps d'inoculació de *S. cerevisiae*, les proporcions dels inòculs inicials i la temperatura de FAL (20°C és la temperatura òptima en molts estudis) (Gobbi *et al.*, 2013; Jolly *et al.*, 2014; Porter *et al.*, 2019). Per exemple, la producció de glicerol es veu augmentada si hi ha més temps fins a la inoculació de *S. cerevisiae* i també si la temperatura és de 20°C i hi ha més grau d'oxigenació. Aquest efecte no es va observar en cultius purs, sinó que com a efecte sinèrgic entre *S. cerevisiae* i *L. thermotolerans* (Gobbi *et al.*, 2013).

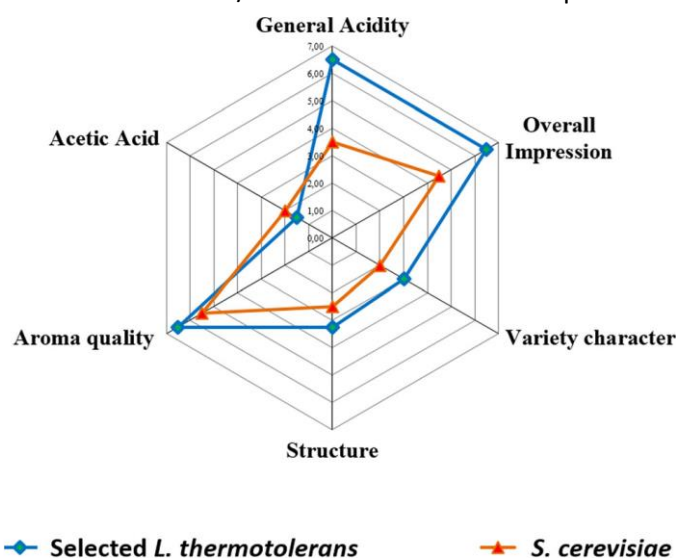


Figura 1. Resum de la influència de *L. thermotolerans* en la percepció sensorial de productes fermentats comparada amb fermentacions típiques de *S. cerevisiae*. Font: Benito (2018).

L. thermotolerans no té capacitat per acabar la FAL, pel que deixa sucres residuals, tot i que en alguns estudis s'ha descrit que, en funció de les soques estudiades, pot arribar a més de 10 % (v/v) d'etanol (Gobbi *et al.*, 2013; Du Plessis *et al.*, 2017; Porter *et al.*, 2019), o fins i tot acabar la FAL en most sintètic (Roca-Mesa *et al.*, 2020). En condicions de coinòcul amb *S. cerevisiae*, la producció d'etanol i el ritme de la FAL poden disminuir entre 0,2 i 0,4 % (v/v) i entre 2 i 4 dies respectivament (Gobbi *et al.*, 2013; Benito *et al.*, 2016a). Això pot ser degut al consum de nutrients per part de *L. thermotolerans*, que en alguns casos, depenent de les soques utilitzades, pot comportar una parada de FAL abans que es consumeixin tots els sucres. Per altra banda, la viabilitat cel·lular i la producció d'àcid L-làctic de *L. thermotolerans* disminueixen al moment en que s'inocula *S. cerevisiae*, per tant, com més temps es tardi a inocular *S. cerevisiae*, més àcid L-làctic serà produït (Kapsopoulou *et al.*, 2007; Benito, 2018; Porter *et al.*, 2019). La naturalesa del most utilitzat (natural, sintètic...) també poden afectar la dominància de *L. thermotolerans* o *S. cerevisiae* (Gobbi *et al.*, 2013; Roca-Mesa *et al.*, 2020). En alguns casos,

en funció de la soca s'ha vist que *L. thermotolerans* pot consumir petites quantitats d'àcid L-màlic (Kapsopoulou *et al.*, 2005; Gobbi *et al.*, 2013). La viabilitat de *L. thermotolerans* es veu afectada a final de FAL, a excepció d'algunes soques. Les causes de la disminució de la viabilitat són les condicions d'altres temperatures, manca d'oxigenació, contacte cel·lular amb *S. cerevisiae* i producció de compostos tòxics per part d'aquesta última (Nissen *et al.*, 2003; Gobbi *et al.*, 2013; Shekhawat *et al.*, 2016).

Diversos estudis (Comitini *et al.*, 2011; Balıkcı *et al.*, 2016) demostren que la formació d'alcohols superiors per part de *L. thermotolerans* és variable. Aquesta diversitat de resultats pot ser explicada per la heterogeneïtat de soques que es van utilitzar i també a les condicions d'oxigenació. La heterogeneïtat també es dona en el cas de formació d'esters d'etil i d'àcids grassos (Benito (S.) *et al.*, 2015; Escribano *et al.*, 2018). *L. thermotolerans* també es relaciona amb un augment de la intensitat de color, degut a que la producció d'àcid L-làctic disminueix el pH del vi, de manera que augmenta la coloració de les antocianines. Aquest fet és degut a que l'absorció d'antocianines per part de *L. thermotolerans* és menor en comparació amb *S. cerevisiae* (Benito *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Escott *et al.*, 2018). Pel que fa al nitrogen assimilable (YAN), algunes soques de *L. thermotolerans* en consumeixen menors quantitats que *S. cerevisiae* en cultiu pur, pel que a final de FAL poden quedar alguns aminoàcids disponibles, fet que podria beneficiar una posterior FML (Benito, 2018; Escribano *et al.*, 2018; Morata *et al.*, 2018; Roca-Mesa *et al.*, 2020). A l'estudi d'Escribano *et al.* (2018) es va detectar un augmentat del YAN a final de FAL, i algunes explicacions podrien ser que no van completar la FAL i per tant no van necessitar tants nutrients; o perquè van produir menys alcohols superiors, dels quals els aminoàcids en són els precursors. A l'estudi de Roca-Mesa *et al.* (2020) es va determinar que la font preferent de nitrogen per a *L. thermotolerans* era l'amoni (NH_4^+), tot i que a final de FAL també hi havia consum d'aminoàcids en totes les condicions estudiades. En alguns estudis s'ha observat que quan *L. thermotolerans* és present a la FAL, els aminoàcids precursors d'amines biògenes poden ésser augmentats a final de FAL respecte controls de *S. cerevisiae*. De totes maneres, en els vins finals no es van detectar diferències en els nivells d'amines biògenes (Benito (S.) *et al.*, 2015; Benito *et al.*, 2016b; Benito, 2018).

Resumint el que s'ha exposat anteriorment, les contribucions de *L. thermotolerans* poden ser tan positives com negatives sobre la FML, depenent de diferents variables. Els efectes positius que poden promoure la FML són la producció d'àcid pirúvic o la baixa producció d'AGCM (Balmaseda *et al.*, 2018), mentre que l'esgotament de les fonts de nitrogen poden tenir un paper inhibitori. A més d'aquests efectes, en un article de Morata *et al.* (2018) s'afirma que per damunt dels 4 g/l d'àcid L-làctic s'inhibeix el creixement dels BAL. Així doncs, en perspectiva a una FML seqüencial, *L. thermotolerans* podria ser inhibidora pel fet que algunes soques poden esgotar les fonts de nitrogen i produir quantitats d'àcid L-làctic que inhibeixin el creixement dels BAL. Morata *et al.* (2018) proposa una coinoculació de llevats i BAL per tal que la FAL i la FML siguin simultànies i evitar aquest efecte inhibitori. Per altra banda, a l'estudi de Du Plessis *et al.* (2017) es van estudiar dues soques de *L. thermotolerans*, i els assajos van ser FAL + FML seqüencial i simultània amb *S. cerevisiae* (FAL) + *L. thermotolerans* (FAL) i *O. oeni* (FML). En tots els assajos la FML va ser exitosa, exceptuant un cas en què la soca de *L. thermotolerans* va alentir la FML simultània. Finalment, Benito *et al.* (2016b) en un experiment va comparar FAL + FML de *S. cerevisiae* i *S. cerevisiae* + *L. thermotolerans*: quan *L. thermotolerans* intervenia, hi havia nivells

més elevats d'àcid L-làctic, glicerol i isobutanol, i menys grau alcohòlic, glicina i intensitat colorant, entre altres variacions de paràmetres.

Una altra aplicació de *L. thermotolerans* és l'ús combinat amb *Schizosaccharomyces pombe* com a alternativa a la FML dels BAL i *O. oeni*, estudiada en diferents treballs (Benito (Á.) *et al.*, 2015; Benito *et al.*, 2016a; Benito, 2018). L'objectiu era evitar la producció d'àcid acètic per part de *S. cerevisiae* i els BAL, i amines biògenes i etil carbamat per part dels BAL. *S. pombe* actua com a fermentador fort, consumint àcid L-màlic per la via maloalcohòlica deixant sense substrat els BAL. Per la seva banda, *L. thermotolerans* compensa la pèrdua d'acidesa amb la producció d'àcid L-làctic. D'aquesta manera es produeix vi amb microorganismes que no presenten problemes pel que fa a acidesa volàtil, amines biògenes i precursors d'etil carbamat. A més, el vi obtingut tenia un grau alcohòlic moderat (respecte el que es va obtenir amb el control de *S. cerevisiae*) del 14 % (v/v), caràcter fruital i més intensitat de color.

Així doncs, *L. thermotolerans* podria ser una bona eina microbiològica per a pal·liar els efectes del canvi climàtic, que comporten un augment del grau alcohòlic probable i una disminució de l'acidesa, ja que disminueix el rendiment alcohòlic de la FAL i produeix àcid L-làctic, augmentant l'acidesa del vi (Padilla *et al.*, 2016; Benito, 2018; Vilela, 2019). Per altra banda, amb el suposat efecte inhibitori sobre la FML, es pot plantejar l'ús de *L. thermotolerans* per evitar la FML en vins blancs o vins base per a cava als que no es vulgui realitzar (Morata *et al.*, 2018). A més d'aquests efectes principals, en aquest mateix apartat s'han explicat altres característiques que fan a *L. thermotolerans* vàlida per a la producció de vins de qualitat juntament amb *S. cerevisiae*. De totes maneres, la bibliografia sobre l'efecte de *L. thermotolerans* sobre la FML és limitada, i els resultats publicats són diversos, pel que calen més estudis amb diferents soques i condicions per ampliar el coneixement en aquest àmbit.

2. Objectius

La hipòtesi de treball era que l'àcid L-làctic produït per part de *Lachancea thermotolerans* durant la fermentació alcohòlica té un efecte inhibitori sobre la fermentació malolàctica.

Per aquest motiu, l'objectiu principal d'aquest estudi era determinar l'efecte de l'àcid L-làctic produït per *L. thermotolerans* sobre *O. oeni*, des de la perspectiva de si pot inhibir o frenar la fermentació malolàctica.

Objectius específics:

- Determinar la capacitat de producció d'àcid L-làctic per part de diferents soques de *L. thermotolerans*.
- Realitzar fermentacions alcohòliques amb inoculació de *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae* a les 48 hores, i determinar la producció d'àcid L-làctic, i posterior fermentació malolàctica amb *O. oeni* per determinar l'efecte de *L. thermotolerans*.
- Estudiar l'efecte de diferents concentracions d'àcid L-làctic sobre diferents soques d'*O. oeni* realitzant fermentació malolàctica en vi sintètic.
- Analitzar els metabòlits a final de les FAL i les FML.

3. Materials i mètodes

3.1. Soques utilitzades

Per a aquest estudi es van realitzar un total de 47 FAL amb llevats de les espècies *S. cerevisiae* (Sc) i *L. thermotolerans* (Lt), i 54 FML amb BAL de l'espècie *O. oeni*. Es van estudiar 6 soques de Lt: CW78 (de la col·lecció ICVV de Logronyo, ICVV1331), CW79 (ICVV1132), CW80 (ICVV1133), CW81 (Agrovin S.A.), Lt1 (Agrovin S.A.) i Laktia (de la casa comercial Lallemand S.L.); 1 soca de Sc: QA23 (Lallemand); i 2 soques d'*O. oeni*: PSU-1 (ATCC BAA-331 de la "American Type Culture Collection") i CH11 (Viniflora CH11, de la casa comercial Chr Hansen).

3.2. Plantejament experimental

Les FAL es van dividir en individuals i seqüencials. A les FAL individuals només s'inoculava una soca de llevat Lt o Sc, i s'estudiava el perfil fermentatiu i la producció d'àcid L-làctic a dia 2 i final de FAL. A les FAL seqüencials s'inoculava primer una soca de Lt, i a les 48 hores de FAL s'inoculava Sc, en alguns casos amb suplement de nitrogen. A les FAL seqüencials també s'estudiava el perfil fermentatiu i la producció d'àcid L-làctic a dia 2 i final de FAL. Algunes de les FAL seqüencials finalitzades es van utilitzar per a realitzar FML amb *O. oeni*. Durant les FAL individuals i seqüencials, es van realitzar controls amb inoculació de Sc individual. Les soques estudiades en FAL individual i seqüencial es mostren a la Taula 1.

Taula 1. Diferents fermentacions alcohòliques (FAL) realitzades al llarg de l'estudi, tant individuals com seqüencials, i amb el seu codi.

FAL Individual				
Espècie	Soca	Codi	Rèpliques	
<i>L. thermotolerans</i>	CW78	Lt.CW78	3	
<i>L. thermotolerans</i>	CW79	Lt.CW79	3	
<i>L. thermotolerans</i>	CW80	Lt.CW80	3	
<i>L. thermotolerans</i>	CW81	Lt.CW81	6	
<i>L. thermotolerans</i>	Lt1	Lt.1	3	
<i>L. thermotolerans</i>	Laktia	Lt.Laktia	3	
<i>S. cerevisiae</i>	QA23	Sc.QA23 (.1 .2)	5	
FAL Seqüencial				
Espècie	Soca	Codi	Rèpliques	Suplement de N
<i>L. thermotolerans</i>	CW78	Seq.CW78	3	No
<i>L. thermotolerans</i>	CW81	Seq.CW81.1	3	Sí
<i>L. thermotolerans</i>	CW81	Seq.CW81.2	3	Sí
<i>L. thermotolerans</i>	Lt1	Seq.Lt1	3	Sí
<i>L. thermotolerans</i>	Laktia	Seq.Laktia	3	No
<i>S. cerevisiae</i>	QA23	Sc (.1 .2 .3)	6	No

Les FML es van dividir en dos blocs: (a) assaig en vi sintètic (o WLM) i (b) FML dels vins procedents del most sintètic fermentat amb FAL seqüencial (d'ara en endavant, FML procedents de FAL). Les FML dels assajos en vi sintètic partien amb 3 concentracions d'àcid L-làctic: 0 g/l, 2,5 g/l i 5 g/l. Aquestes concentracions d'àcid L-làctic van ser escollides en base la literatura publicada, considerant que eren representatives de la producció d'àcid L-làctic per part de Lt en la majoria

de casos (Benito *et al.*, 2016b; Morata *et al.*, 2018). Les dues soques d'*O. oeni* (PSU-1 i CH11) es van estudiar per separat, i per cada condició es van fer triplicats. A les FML procedents de FAL, per cada vi es van inocular les soques PSU-1 i CH11 per separat, i per cada condició es van fer triplicats. A la Taula 2 es mostren totes les FML realitzades.

Taula 2. Fermentacions malolàctiques (FML) realitzades al llarg de l'estudi, amb les diferents condicions de vi i el seu codi.

FML en vi sintètic				
Condicció de vi	Espècie	Soca	Codi	Rèpliques
WLM - 0 g/l àcid L-làctic	<i>O. oeni</i>	PSU-1	PSU-1.0	3
	<i>O. oeni</i>	CH11	CH11.0	3
WLM - 2,5 g/l àcid L-làctic	<i>O. oeni</i>	PSU-1	PSU-1.2,5	3
	<i>O. oeni</i>	CH11	CH11.2,5	3
WLM - 5 g/l àcid L-làctic	<i>O. oeni</i>	PSU-1	PSU-1.5	3
	<i>O. oeni</i>	CH11	CH11.5	3
FML procedent de FAL				
Condicció de vi	Espècie	Soca	Codi	Rèpliques
Vi de la FAL Seq.CW78	<i>O. oeni</i>	PSU-1	P_CW78	3
	<i>O. oeni</i>	CH11	C_CW78	3
Vi de la FAL Seq.CW81.1	<i>O. oeni</i>	PSU-1	P_CW81	3
	<i>O. oeni</i>	CH11	C_CW81	3
Vi de la FAL Seq.Laktia	<i>O. oeni</i>	PSU-1	P_Laktia	3
	<i>O. oeni</i>	CH11	C_Laktia	3
Vi de la FAL Sc.1	<i>O. oeni</i>	PSU-1	P_Sc.1	3
	<i>O. oeni</i>	CH11	C_Sc.1	3
Vi de la FAL Sc.2	<i>O. oeni</i>	PSU-1	P_Sc.2	3
	<i>O. oeni</i>	CH11	C_Sc.2	3
Vi de la FAL Sc.3	<i>O. oeni</i>	PSU-1	P_Sc.3	3
	<i>O. oeni</i>	CH11	C_Sc.3	3

3.3. Medis utilitzats

3.3.1. Most sintètic

Les FAL es van realitzar en most sintètic, la composició del qual es mostra a la Taula 3. La preparació del most consistia en dissoldre en aigua destil·lada glucosa (Panreac, Barcelona, Espanya), fructosa (Panreac), àcid L-tartàric (Panreac), àcid L-màlic (SigmaAldrich, Barcelona, Espanya), àcid cítric (Panreac) i YNB (*Yeast Nitrogen Base*) sense aminoàcids (Panreac). Després d'esterilitzar la solució per autoclau, s'afegia NH₄Cl (Panreac) i la solució preparada d'aminoàcids (veure el detall de la composició a la Taula S1). Finalment, s'ajustava el pH a 3,5, mitjançant NaOH, i el volum, i es filtrava a 0,22 µm. El YAN (*Yeast Assimilable Nitrogen*) del most era de 206,51 mg N / l.

Taula 3. Composició del most sintètic.

Compost	Concentració
Glucosa	110 g/l
Fructosa	110 g/l
Àcid L-tartàric	5 g/l
Àcid L-màlic	2 g/l
Àcid Cítric	0,5 g/l
YNB ("Yeast Nitrogen Base") sense aminoàcids	1,7 g/l
NH ₄ Cl	50 mg/l
Preparació d'aminoàcids (veure composició als annexos)	10 ml/l

3.3.2. Vi sintètic o *Wine Like Medium* (WLM)

El vi sintètic o WLM va ser utilitzat per realitzar les FML dels assajos en vi sintètic, a les quals es van estudiar 3 concentracions d'àcid L-làctic: 0 g/l, 2,5 g/l i 5 g/l. La composició del WLM es mostra a la Taula 4.

Taula 4. Reactius necessaris per a la preparació de vi sintètic.

Reactiu	Concentració	Reactiu	Concentració
Àcid L-tartàric	2 g/l	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,03 g/l
Àcid L-màlic	2 g/l	CaCl	0,13 g/l
Acetat de sodi	0,28 g/l	KCl	0,45 g/l
Àcid cítric	0,50 g/l	Glicerol	5 g/l
Peptona	2,5 g/l	Fructosa	2 g/l
Casamino àcids	2,5 g/l	Trehalosa	0,25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,6 g/l	L-cisteïna-HCl	0,50 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,13 g/l	pH	3,4
Àcid L-làctic	variable	Etanol	12% (v/v)

Tots els reactius es barrejaven en aigua destil·lada, exceptuant l'etanol. Aleshores, s'ajustava el pH a 3,4 i el volum d'aigua destil·lada a un 88% del volum final, i seguidament s'autoclavava. Finalment, s'afegia l'etanol 100% (Panreac) a un 12% del volum final.

3.3.3. Medis de cultiu

Per al cultiu líquid de llevats Lt i Sc es va utilitzar medi ric YPD (*Yeast extract, Peptone, Glucose*; 20 g/l de glucosa (Panreac), 20 g/l de peptona (Panreac) i 10 g/l d'extracte de llevat (Panreac)) a 28 °C de temperatura. Per al creixement de llevats Lt i Sc en medi sòlid es va utilitzar el medi diferencial WLN amb agar (Wallerstein; 80 g/l de WLN (Difco WL Medium, Le Pont de Claix, França) i 17 g/l d'agar (Panreac)) a 28 °C de temperatura. El medi WLN permet diferenciar les colònies de Lt (color verd) de les Sc (color blanc), tal i com es mostra a la Figura S1.

Per al cultiu líquid i sòlid de BAL es va utilitzar el medi MRS (Man Rogosa i Sharpe; 55 g/l MRS (Scharlau, Barcelona, Espanya), suplementat amb 4 g/l d'àcid D,L-màlic (SigmaAldrich), 5 g/l de fructosa (Panreac) i 17 g/l d'agar (Panreac), en el cas de medi sòlid) a 28 °C de temperatura en anaerobiosi (incubador 10% CO₂).

3.4. Fermentació Alcohòlica

3.4.1. Inoculació

Per a la inoculació dels llevats a la FAL es van repartir 240 ml de most sintètic estèril en fermentadors estèrils (ampolles de vidre de 250 ml). A cada fermentador es va inocular una concentració de 2×10^6 cèl/ml de la soca desitjada (població inicial), que s'havien fet créixer en medi YPD líquid 24 hores abans (precultiu). Per a calcular el volum necessari per a inocular 2×10^6 cèl/ml, es feia recompte de cèl·lules del precultiu en càmera de Neubauer, i amb la concentració del precultiu es realitzava el càlcul del volum a inocular. Després de realitzar la inoculació, es prenia 100 µl de mostra per a fer dilucions seriades i sembrar en medi WLN sòlid, a una dilució de 10^{-4} . Finalment, els fermentadors es van deixar en agitació (120 rpm) i a temperatura ambient ($\approx 19^\circ\text{C}$). Durant la FAL, el tap blau es deixava una mica desenroscat per permetre la sortida del CO_2 produït.

En el cas de les inoculacions seqüencials a 48h de FAL, el procés era el mateix: s'inoculava una concentració de 2×10^6 cèl/ml de Sc (població inicial), que s'havien fet créixer en medi YPD líquid 24 hores abans. Després de la inoculació, se sembrava una placa de WLN amb una dilució de 10^{-4} , i es guardava una mostra de sobrenedant i pellet a -20°C . En el cas de les inoculacions amb suplement de nitrogen, es van afegir 60 mg N / l amb fosfat de diamoni (DAP; Panreac).

3.4.2. Seguiment

El seguiment de la FAL es realitzava cada 2 dies, i consistia en prendre 5 ml de mostra per tal de: (a) mesurar la densitat amb el densímetre electrònic (Mettler Toledo, Barcelona, Espanya); (b) mesurar la densitat òptica (OD) a 600 nm amb l'espectrofotòmetre Ultrospec 2100 pro (Biochrom, Cambridge, Regne Unit), amb la dilució necessària per a obtenir valors d'absorbància inferiors a 1,000; i (c) sembrar en medi WLN sòlid per a fer recompte de llevats viables, amb dilucions de 10^{-5} i 10^{-6} . En el cas dels dies 2 i 6, de manera addicional, també es prenia una mostra de 1 ml que se centrifugava per a obtenir pellet i sobrenedant, que es congelaven a -20°C per separat. La mostra de sobrenedant serviria per a l'anàlisi d'àcid L-làctic, i la mostra de pellet per a població total mitjançant PCR quantitativa (qPCR).

3.4.3. Final

La FAL es donava per acabada quan els nivells de sucres residuals (D-glucosa + D-fructosa) eren inferiors a 2 g/l. Si no hi havia baixada de densitat, i conseqüentment no es consumien sucres, la FAL s'havia estancat i es considerava punt final.

Només 15 FAL amb inoculació seqüencial van seguir amb FML. La resta de FAL seqüencials no van acabar a temps per poder inocular els BAL. En el cas de les 32 FAL que no van acabar, es va guardar mostra (precipitat i sobrenedant) per als anàlisis de final de FAL i per a possibles estudis futurs. Per a les 15 FAL que van seguir amb FML, es va guardar mostra per als anàlisis de final de FAL, i es van homogeneïtzar les rèpliques d'una mateixa condició. Seguidament, es van filtrar a $0,22\ \mu\text{m}$ i es van repartir en els fermentadors necessaris per a les FML.

3.5. Fermentació Malolàctica

3.5.1. Inoculació

Per a la inoculació dels BAL a la FML es van repartir 50 ml de vi en tubs Falcon de 50 ml estèrils, que servien de fermentadors. En el cas de les FML en WLM el vi es preparava seguint el protocol, mentre que en el cas de les FML provinents de FAL el vi era most sintètic fermentat. A cada fermentador es van inocular 2×10^7 cèl/ml de la soca desitjada d'*O. oeni* (població inicial), que s'havien fet créixer en medi MRS líquid durant 48 hores (precultiu). El volum a inocular es va calcular mesurant la OD del precultiu a 600 nm, i mitjançant una recta patró es va relacionar la OD a 600 nm amb la població cel·lular. El volum calculat es va centrifugar i se'n va eliminar el sobrenedant. Seguidament, es van resuspendre les cèl·lules amb el mateix vi on s'inocularen, evitant el pas de nutrients del medi de creixement al fermentador. Els fermentadors es van incubar a 20 °C.

Finalment, al cap d'una hora després de la inoculació, es van prendre 100 µl de mostra, per fer dilucions seriades amb solució salina estèril al 0,9% (p/v) i es va sembrar en medi MRS sòlid a una dilució de 10^{-5} , per tal de determinar la població viable inicial.

3.5.2. Seguiment

El seguiment de la FML es realitzava cada dia, analitzant el consum d'àcid L-màlic amb l'autoanalitzador Miura One (TDI, Gavà, Espanya).

3.5.3. Final

La FML es donava per acabada quan els nivells d'àcid L-màlic eren inferiors a 0,1 g/l o quan la fermentació s'havia estancat. Degut a la situació del coronavirus, no hi va haver temps per veure finalitzar algunes de les FML provinents de FAL, i es van aturar l'últim dia de pràctiques, tot i que encara eren actives. El protocol per aturar les FML consistia en: (a) sembrar en medi MRS sòlid a una dilució de 10^{-5} per tal de determinar la població viable final; (b) guardar mostra per als anàlisis finals de FML; (c) guardar mostra a -20 °C per a futurs anàlisis; i (d) guardar les cèl·lules centrifugades a -80 °C per a futurs anàlisis.

3.6. PCR quantitativa (qPCR)

Per a realitzar la qPCR es partia de les mostres de cèl·lules de llevat de les FAL seqüencials dels dies 2, 6 i final de FAL. Primer de tot, es va realitzar una extracció d'ADN mitjançant el kit comercial "DNeasy Plant Mini Kit" (Quiagen, Hilden, Alemanya). El producte de l'extracció eren 100 µl d'ADN. Seguidament, es va realitzar la qPCR de regions específiques de l'ADN de Lt i Sc, amb el termociclador QuantStudio™ (Thermo Fisher Scientific, Alcobendas, Espanya). Els encebadors utilitzats per a Lt van ser "Lt forward" (5'-CGCTCCTTGTGGGTGGGGAT-3') i "Lt reverse" (5'-CTGGGCTATAACGCTTCTCC-3') (García *et al.*, 2017). Els encebadors utilitzats per a Sc van ser "Sc forward" (5'-ATCGAATTTTGAACGCACATTG-3') i "Sc reverse" (5'-CGCAGAGAAACCTCTCTTTGGA-3') (Hierro *et al.*, 2007). El mix per a la PCR contenia encebador "forward" [0,4 µM], encebador "reverse" [0,4 µM], agent fluorescent ROX_{II} 1X i TB Green Taq 1X (Takara, Göteborg, Suècia). Finalment s'afegien 2 µl de mostra d'ADN. Per cada mostra analitzada es va realitzar un triplicat analític. Els cicles de temperatura de la qPCR eren els següents: desnaturalització inicial a 95 °C durant 1 minut; 40 cicles d'elongació a 95 °C durant 5

segons i 60 °C durant 35 segons; 95 °C durant 15 segons; 60 °C durant 1 minut i finalment 95 °C durant 1 segon.

Per a poder relacionar els resultats de Ct amb població, es va dissenyar una recta patró de Lt i Sc respectivament, de 10^8 cèl·lules fins a 10^2 cèl·lules, que anava baixant per cada ordre de magnitud. Els anàlisis per relacionar fluorescència, Ct i número de còpies es van realitzar amb el software online “*Standard Curve, qPCR*” (AppConnect, ThermoFisher).

3.7. Anàlisis químiques

Durant les FAL es van realitzar anàlisis d'àcid L-làctic L-Milchsäure (R-biopharm, Darmstadt, Alemanya) a dia 2 i a temps final, de totes les rèpliques. Pel que fa al temps final de les FAL seqüencials, a totes les rèpliques (triplicats, duplicats per als controls) també es va analitzar el pH i sucres residuals (D-glucosa i D-fructosa), així com el grau alcohòlic, àcid acètic i àcid L-màlic de les mostres un cop homogeneïtzades per a realitzar FML (una rèplica). Per altra banda, la determinació de la concentració de DAP per al suplement de nitrogen d'algunes de les FAL seqüencials es va realitzar analitzant el nitrogen amoniacal (NH_4).

En el marc de les FML, tant en les rèpliques de l'assaig amb WLM com en les FML provinents de FAL es van fer els mateixos anàlisis a inici i final. Les determinacions van ser d'àcid L-làctic (Miura), àcid L-màlic, pH, àcid acètic, àcid cítric i sucres (D-glucosa + D-fructosa). A més, es feia el seguiment diari de l'àcid L-màlic.

La majoria d'anàlisis químiques es van realitzar amb l'autoanalitzador Miura One (TDI), i incloïen: àcid L-màlic, sucres (D-glucosa + D-fructosa), àcid acètic, àcid cítric i nitrogen amoniacal (NH_4). Tots els kits eren enzimàtics i de la mateixa marca que l'analitzador: “Tecnologia y Difusión Iberica”. El grau alcohòlic es va determinar amb ebuliòmetre (GAB Sistemàtica Analítica S.L., Moja-Olèrdola, Espanya). L'anàlisi d'àcid L-làctic es va realitzar tan amb el kit enzimàtic manual L-Milchsäure (R-biopharm) com per kit per al Miura (TDI). El pH es va determinar amb el pHmetre (Crison, Hospitalet de Llobregat, Espanya).

3.8. Anàlisis estadístiques

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

4. Resultats

4.1. Fermentacions alcohòliques individuals

El seguiment de les FAL individuals de *L. thermotolerans* (Lt) i *S. cerevisiae* (Sc) es va fer mitjançant la mesura de la densitat del most i el recompte de llevats viables en placa de cultiu WLN, tal i com s'observa als exemples de la Figura 2 (A i B) (la resta de gràfics es troben a la Figura S2). A la Figura 2 C es representa la comparativa de baixada de densitat entre les FAL realitzades amb les diferents soques de Lt (que s'estanquen a partir del dia 3) i Sc (que tarda 13 dies en acabar la FAL).

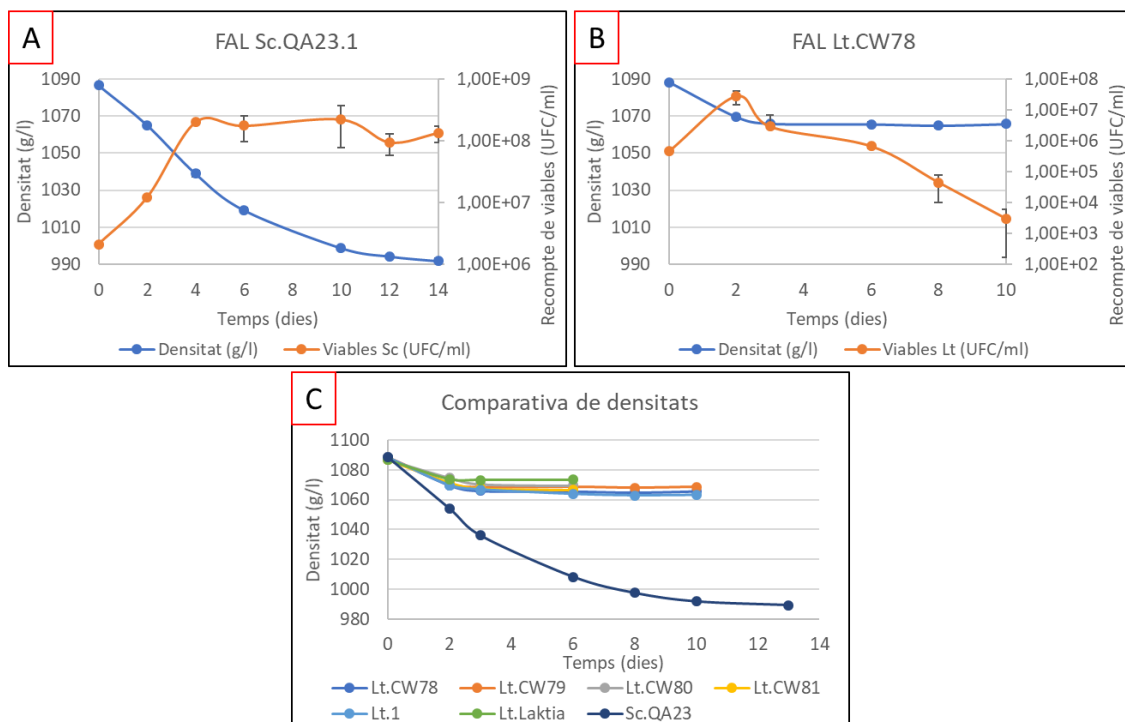


Figura 2. Seguiment de les fermentacions alcohòliques (FAL) individuals amb baixada de densitat (g/l) i recompte de cèl·lules viables en placa de cultiu WLN (UFC/ml). A: *S. cerevisiae* (soca QA23); B: *L. thermotolerans* (soca CW78); C: comparativa de densitats de *S. cerevisiae* (QA23) i *L. thermotolerans* (Lt.CW78, Lt.CW79, Lt.CW80, Lt.CW81, Lt.1, Lt.Laktia).

El resum dels paràmetres de les FAL individuals es mostra a la Taula S2. Totes les soques de Lt s'estaquen al voltant dels 1060 g/l de densitat (al voltant del dia 2 o 3 de FAL), pel que no acaben la FAL. En canvi, Sc acaba la FAL amb uns 14 dies. Pel que fa a la producció d'àcid L-làctic, les diferències entre dia 2 i final de FAL per a cada mostra es representen a la Figura 3. En tots els casos, la major producció d'àcid L-làctic es dona als dos primers dies de FAL, i aquests valors no varien significativament dels valors obtinguts a final de FAL en les soques de Lt. Només el cas de Sc, els valors d'àcid L-làctic disminueixen significativament al final de FAL. Així doncs, a partir del dia 2, tan la baixada de densitat com la producció d'àcid L-làctic s'estanquen en totes les soques analitzades de Lt. La soca de CW79 de Lt va ser la que va produir més quantitat d'àcid L-làctic, al voltant de 0,4 g/l, amb diferències significatives amb la resta de soques, excepte de la Laktia. Per altra banda, Sc és el llevat que va produir menys àcid L-làctic, tant al dia 2 com a final de FAL, en què la concentració era pràcticament 0 g/l.

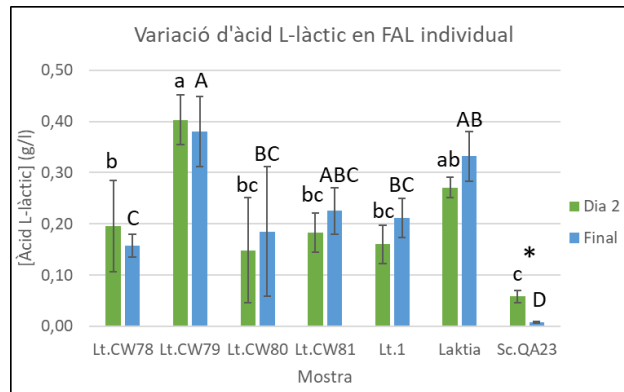


Figura 3. Concentració d'àcid L-làctic en fermentació alcohòlica (FAL) amb inoculació individual, a dia 2 (verd) i final de fermentació (blau). Fermentacions de Lt (*L. thermotolerans*), soques CW78, CW79, CW80, CW81, Lt.1 i Laktia, i de Sc (*S. cerevisiae*), soca QA23. Les columnes marcades amb * indiquen diferències significatives entre els valors d'àcid L-làctic a dia 2 i dia final, segons el test Tukey (HSD) amb $p < 0,05$. Les lletres diferents a damunt de cada columna indiquen diferències significatives entre les mostres a un mateix dia (dia 2, minúscules; dia final, MAJÚSCULES), segons el test Tukey (HSD) amb $p < 0,05$.

4.2. Fermentacions alcohòliques seqüencials

En les FAL seqüencials el most va ser inoculat amb una soca de Lt, i a les 48 hores s'hi va afegir Sc. El seguiment de les FAL seqüencials es va fer per pèrdua de densitat del most i recompte de llevats viables, tal i com s'observa als exemples de la Figura 4 (la resta de gràfics es troben a la Figura S3). Es pot observar com Sc, que s'inocula a les 48h de FAL, s'imposa a la Lt, i un cop la població de Sc és significativament més alta, la baixada de densitat és més ràpida. Les primeres FAL seqüencials que es van realitzar (Seq.CW78 i Seq.Laktia), semblava que s'havien estancat entre els dies 3 i 5. Per aquest motiu, a la resta de FAL posteriors es va afegir un suplement de 60 mg N / l, amb DAP, per mirar de potenciar la capacitat fermentativa de Sc. Malgrat aquest suplement, totes les FAL seqüencials van presentar un perfil fermentatiu similar, amb un alentiment de la baixada de densitat coincidint amb la disminució de la població de Lt, i acceleració de la baixada de densitat quan la població de Sc augmentava. Aquest fet era independent al suplement de nitrogen. Totes les inoculacions seqüencials van acabar la fermentació, tardant entre 16 i 21 dies (Taula 5).

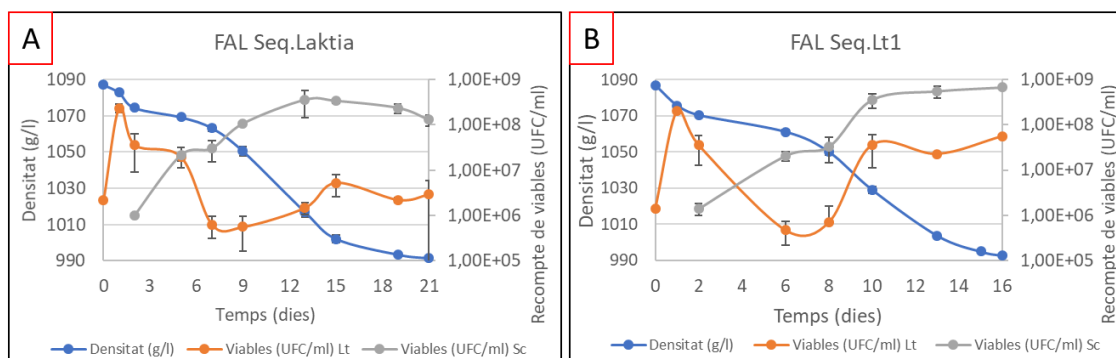


Figura 4. Seguiment de les fermentacions alcohòliques (FAL) amb inoculació seqüencial, amb baixada de densitat (g/l, blau) i recompte de cèl·lules viables en placa de cultiu WLN (UFC/ml): *L. thermotolerans* (Lt, taronja) i *S. cerevisiae* (Sc, gris). A: FAL de *L. thermotolerans* (soca comercial Laktia) i Sc.QA23 (inoculada a les 48 hores); B: FAL de *L. thermotolerans* (soca Lt.1) i Sc.QA23 (inoculada a les 48 hores).

A la Figura 5 es representen els valors d'àcid L-làctic a dia 2 i dia final. A diferència de les FAL individuals, en les FAL seqüencials la concentració d'àcid L-làctic va disminuir entre el dia 2 i final, de manera significativa en totes les condicions excepte Seq.Lt1 i els controls de Sc.2 i Sc.3, tot i que també s'observa la mateixa tendència. La producció fins al dia 2 era similar a la de les FAL individuals, exceptuant la condició amb la soca comercial Laktia. La soca que va produir significativament més àcid L-làctic va ser la Lt1, que alhora va ser de les que va produir menys grau alcohòlic (Taula 5). També és destacable que tots els controls de Sc van produir quantitats similars a les soques de Lt a dia 2.

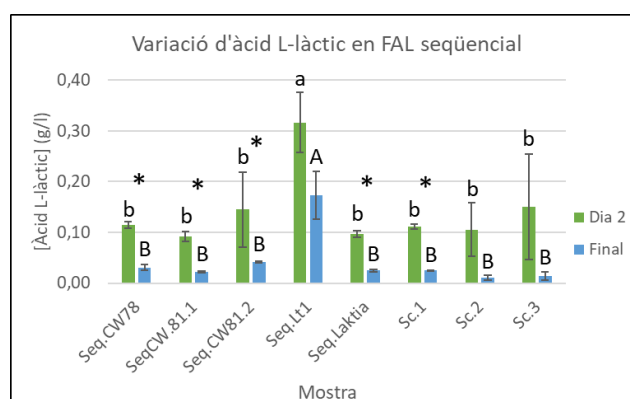


Figura 5. Concentració d'àcid L-làctic en fermentacions alcohòliques (FAL) amb inoculació seqüencial, realitzades amb diferents soques de *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae*, a dia 2 (verd) i dia final de fermentació (blau). També es mostren els valors de la fermentació control inoculada només amb Sc. Les columnes marcades amb * indiquen diferències significatives entre els valors d'àcid L-làctic a dia 2 i dia final, segons el test Tukey (HSD) amb $p < 0,05$. Les lletres diferents a damunt de cada columna indiquen diferències significatives entre les mostres a un mateix dia (dia 2, minúscules; dia final, MAJÚSCULES), segons el test Tukey (HSD) amb $p < 0,05$.

A la Taula 5 es mostren els valors dels paràmetres de final de les FAL seqüencials. Les FAL més ràpides van ser les dels controls de Sc, i també van ser les que van produir més etanol. Les FAL seqüencials amb Lt que van produir un grau alcohòlic més elevat van ser les Seq.CW81 i la Seq.Laktia (amb valors similars als de Sc), i es correlaciona amb una menor producció d'àcid L-làctic a dia 2, tot i que no significativa (Figura 5). En les FAL amb Lt, també s'observa que a major producció d'àcid L-làctic es produïa menys àcid acètic, compost considerat negatiu. Pel que fa a l'àcid L-màlic, hi va haver disminució respecte els 2 g/l inicials en totes les FAL. El suplement de nitrogen d'algunes de les FAL no va comportar cap diferència respecte les FAL que no es van suplementar, pel que fa als compostos a final de FAL.

Per a l'estudi d'imposició de Sc inoculada a partir del dia 2, es va realitzar qPCR a dia 2, 6 i final de FAL seqüencial, a més del recompte en placa WLN. A la Figura 6 es comparen les dues metodologies per dues FAL (la resta de condicions estan a la Figura S4). En la majoria de casos es van detectar valors superiors a la qPCR que en el recompte de placa.

Taula 5. Resum de paràmetres finals de les fermentacions alcohòliques (FAL) amb inoculació seqüencial de *L. thermotolerans* (soques CW78, CW81, Lt1 i Laktia) i *S. cerevisiae* (Sc). Les dades de pH i D-glucosa + D-fructosa es presenten com a mitjana $\pm$ desviació estàndard de les rèpliques. Les dades de grau alcohòlic, àcid acètic i àcid L-màlic són d'anàlisis d'una sola rèplica.

Mostra	Durada FAL	Grau alcohòlic (% v/v)	pH	D-glucosa + D-fructosa (g/l)	Àcid acètic (g/l)	Àcid L-màlic (g/l)
Seq.CW78	20	11,5	3,508 $\pm$ 0,034	0,87 $\pm$ 1,15	0,97	1,44
Seq.CW81.1	17	12,2	3,462 $\pm$ 0,003	1,62 $\pm$ 0,32	1,05	1,63
Seq.CW81.2	16	12,0	3,546 $\pm$ 0,011	1,99 $\pm$ 0,38	0,95	1,68
Seq.Lt1	16	11,9	3,528 $\pm$ 0,002	2,36 $\pm$ 0,75	0,90	1,60
Seq.Laktia	21	12,2	3,456 $\pm$ 0,009	1,34 $\pm$ 0,78	1,28	1,69
Control Sc.1	19	12,2	3,427 $\pm$ 0,009	0,20 $\pm$ 0,20	1,35	1,59
Control Sc.2	10	12,6	3,553 $\pm$ 0,003	0,03 $\pm$ 0,00	0,54	1,75
Control Sc.3	10	* mesura errònia	3,646 $\pm$ 0,010	0,58 $\pm$ 0,06	0,64	1,82

Mitjançant la qPCR, en tots els casos la població dominant a dia 2 era la de Lt, i aquesta disminuïa al llarg dels dies de FAL, mentre la població de Sc augmentava. En alguns casos, a dia 6 de FAL la població de Sc encara era inferior a la de Lt, però en altres casos la imposició va ser més ràpida i clara. Per altra banda, amb el recompte en placa de WLN, també s'observava la imposició de Sc sobre Lt a mesura que passaven els dies, però els resultats eren més diversos: a dia 2 hi havia condicions que ja tenien més població de Sc que de Lt, com en Seq.CW81.1 i Seq.CW81.2, degut a la ràpida disminució de Lt a inici de la FAL. A dia 6 de FAL, mitjançant placa WLN, en totes les condicions Sc ja s'havia imposat a Lt.

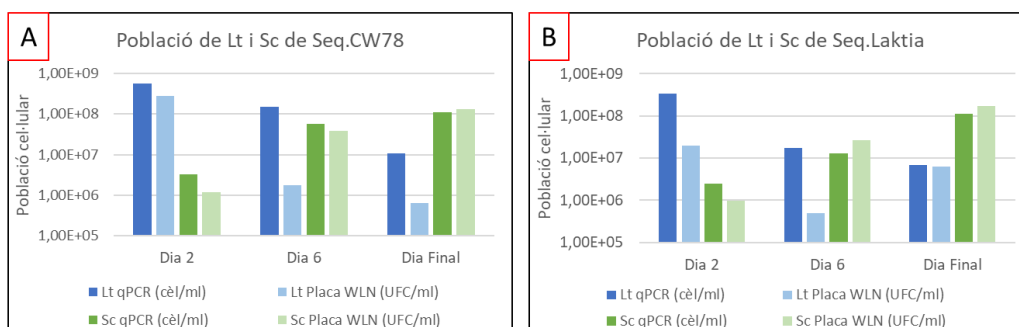


Figura 6. Població de *L. thermotolerans* (Lt; color blau) i *S. cerevisiae* (Sc; color verd) determinada per PCR quantitativa (tonalitat fosca; cèl/ml) i per placa WLN (tonalitat clara; UFC/ml), a dies 2, 6 i final de fermentació alcohòlica (FAL) amb inoculació seqüencial. A: FAL Seq.CW78; B: FAL Seq.Laktia.

4.3. Fermentacions malolàctiques a partir de most sintètic fermentat

A la Figura 7 es mostren les evolucions de la FML en most sintètic fermentat per la soca CW78 de Lt i Sc (Figura 7A), i el control de Sc.1 (Figura 7B). La resta de condicions de FML realitzades a partir de most sintètic fermentat amb Lt i Sc es poden trobar a la Figura S5. La soca PSU-1 va mostrar una millor adaptació al vi que no pas CH11. En els assajos presents, el consum d'àcid L-màlic va ser constant i lineal des de l'inici, i per aquest motiu s'ha calculat el consum diari d'àcid L-màlic en g/l/dia (Taula 6). Si es comparen els valors de consum de màlic diari entre PSU-1 i CH11, en els casos amb PSU-1 el consum diari era significativament major que en les FML de CH11, exceptuant P_Sc.1, C_CW81 i C_Sc.3. Aquest fet concorda amb les FML que es van mantenir actives fins a l'últim dia de seguiment.

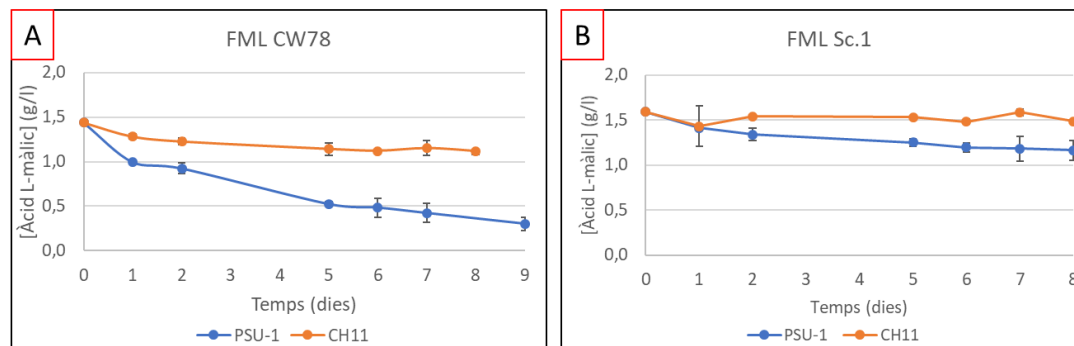


Figura 7. Evolució de la concentració d'àcid L-màlic durant la fermentació malolàctica (FML) de les soques PSU-1 (blau) i CH11 (taronja) d'*O. oeni* amb durant FML. A: FML del vi CW78; B: FML del vi Sc.1 (control).

Taula 6. Concentració d'àcid L-làctic inicial i resum de la durada i paràmetres químics finals de les fermentacions malolàctiques (FML) a partir de most sintètic fermentat amb *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae*. Les soques analitzades són PSU-1 (P_) i CH11 (C_). A la columna de "Durada FML" també s'indica si la FML encara seguia activa o no a l'últim dia de seguiment. Les dades es presenten com a mitjana $\pm$ desviació estàndard de les rèpliques, excepte en la Durada FML, àcid L-làctic inicial i el Recompte de viables final. Les lletres diferents en una mateixa columna signifiquen que les condicions presenten diferències significatives en aquell paràmetre, segons el test Tukey (HSD) amb $p < 0,05$.

Mostra	Durada FML	Àcid L-làctic inicial (g/l)	Recompte de viables final (UFC/ml)	Producció d'àcid L-làctic (g/l)	Àcid L-màlic (g/l)	Consum diari d'àcid L-màlic (g/l/dia)	pH	Variació d'àcid acètic (g/l)	Variació d'àcid cítric (g/l)	Variació de D-glucosa + D-fructosa (g/l)
P_CW78	9 (activa)	<0,01	$9,50 \times 10^5$ b	$0,67 \pm 0,06$ a	$0,30 \pm 0,08$ g	$0,13 \pm 0,01$ ab	$3,553 \pm 0,005$ c	$0,08 \pm 0,02$ a	$-0,07 \pm 0,04$ ab	$0,07 \pm 0,02$ bc
P_Laktia	9 (activa)	<0,01	$4,00 \times 10^6$ b	$0,64 \pm 0,02$ a	$0,44 \pm 0,04$ fg	$0,14 \pm 0,00$ a	$3,550 \pm 0,003$ c	$-0,03 \pm 0,05$ ab	$-0,08 \pm 0,09$ ab	$0,01 \pm 0,01$ c
P_CW81	7 (activa)	0,04	$4,10 \times 10^6$ b	$0,56 \pm 0,02$ ab	$0,64 \pm 0,06$ ef	$0,14 \pm 0,01$ a	$3,494 \pm 0,005$ de	$0,05 \pm 0,06$ a	$-0,17 \pm 0,01$ abc	$0,17 \pm 0,01$ a
P_Sc.1	8 (aturada)	0,04	$1,00 \times 10^4$ b	$0,24 \pm 0,03$ cde	$1,16 \pm 0,11$ bc	$0,05 \pm 0,01$ de	$3,472 \pm 0,007$ fg	$-0,05 \pm 0,03$ b	$-0,12 \pm 0,02$ abc	$-0,25 \pm 0,01$ e
P_Sc.2	9 (aturada)	0,01	$3,05 \times 10^6$ b	$0,55 \pm 0,11$ ab	$0,73 \pm 0,07$ e	$0,11 \pm 0,01$ bc	$3,520 \pm 0,001$ d	$0,02 \pm 0,02$ ab	$-0,12 \pm 0,07$ abc	$-0,21 \pm 0,01$ de
P_Sc.3	7 (activa)	<0,01	$2,60 \times 10^6$ b	$0,61 \pm 0,01$ a	$0,78 \pm 0,08$ de	$0,15 \pm 0,01$ a	$3,669 \pm 0,006$ a	$0,04 \pm 0,07$ a	$-0,21 \pm 0,06$ bc	$0,10 \pm 0,04$ ab
C_CW78	8 (aturada)	<0,01	$< 10^4$ b	$0,18 \pm 0,04$ de	$1,12 \pm 0,04$ bc	$0,04 \pm 0,01$ e	$3,472 \pm 0,007$ ef	$-0,08 \pm 0,01$ b	$-0,04 \pm 0,04$ a	$-0,20 \pm 0,02$ d
C_Laktia	8 (aturada)	<0,01	$< 10^4$ b	$0,21 \pm 0,03$ de	$1,16 \pm 0,03$ bc	$0,07 \pm 0,00$ d	$3,471 \pm 0,003$ efg	$-0,09 \pm 0,06$ b	$-0,06 \pm 0,01$ ab	$-0,23 \pm 0,02$ de
C_CW81	7 (activa)	0,04	$2,7 \times 10^6$ b	$0,39 \pm 0,05$ bcd	$0,94 \pm 0,07$ cd	$0,10 \pm 0,01$ c	$3,475 \pm 0,001$ ef	$0,00 \pm 0,01$ ab	$-0,13 \pm 0,03$ abc	$0,09 \pm 0,03$ b
C_Sc.1	8 (aturada)	0,04	$1,20 \times 10^6$ b	$0,03 \pm 0,01$ e	$1,48 \pm 0,01$ a	$0,01 \pm 0,00$ f	$3,441 \pm 0,006$ g	$-0,04 \pm 0,05$ b	$-0,12 \pm 0,01$ abc	$-0,23 \pm 0,01$ de
C_Sc.2	8 (aturada)	0,01	$2,10 \times 10^7$ a	$0,22 \pm 0,05$ de	$1,32 \pm 0,01$ ab	$0,05 \pm 0,00$ de	$3,484 \pm 0,010$ ef	$0,01 \pm 0,03$ ab	$-0,10 \pm 0,04$ abc	$-0,22 \pm 0,01$ de
C_Sc.3	7 (activa)	<0,01	$2,00 \times 10^6$ b	$0,47 \pm 0,01$ abc	$1,05 \pm 0,03$ bc	$0,11 \pm 0,04$ bc	$3,646 \pm 0,007$ fg	$0,03 \pm 0,03$ ab	$-0,26 \pm 0,01$ c	$0,11 \pm 0,02$ ab

A la Taula 6 es mostra la concentració inicial d'àcid L-làctic, la durada i els paràmetres químics finals de cada FML. En tots els casos, el valor inicial d'àcid L-làctic era proper a 0 g/l. La resta de valors dels paràmetres inicials de cadascuna de les FML es poden trobar a la Taula S4. En el cas de les FML actives, no es va poder finalitzar el seguiment, ja que no es van assolir nivells d'àcid L-màlic per sota de 0,1 g/l abans d'acabar el període de pràctiques. Les condicions inoculades amb CH11 C_CW78, C_Laktia, C_Sc.1 i C_Sc.2, i la condició de PSU-1 P_Sc.1, es van estancar a dia 8 de FML, i la condició P_Sc.2 es va estancar a dia 9. En canvi, la resta de condicions (P_CW78, P_Laktia, P_CW81, P_Sc.3, C_CW81 i C_Sc.3) es van haver d'aturar a dia 7 o 9 degut a la falta de temps per finalitzar els seguiments.

Pel que fa al pH, en tots els casos es va mantenir o augmentar respecte el valor inicial de FML. Els nivells d'àcid acètic van variar mínimament respecte l'inici de les FML. En canvi, en totes les condicions hi va haver consum d'àcid cítric, però les diferències són mínimes entre condicions, exceptuant la C_Sc.3, que és la que va mostrar més consum. Referent al consum de glucosa + fructosa, els canvis no van ser notoris, però sí que hi ha diferències significatives entre condicions. Malgrat això, no totes les condicions en les que hi va haver consum de cítric, va haver-hi consum de glucosa + fructosa.

Finalment, en la majoria de casos, la població final de viables final estava al voltant de 10^6 UFC/ml, exceptuant el cas de C_Sc.2. L'inòcul inicial era de 2×10^7 cèl/ml, per tant hi va haver una disminució de la població, però es va mantenir a nivells suficients per a realitzar la FML.

El detall del consum de les FML que encara eren actives es mostra a la Taula 7. Tot i que la cinètica fermentativa no era molt elevada, en 7 i 9 dies s'havia consumit la major part d'àcid L-màlic. Segons aquestes dades, i assumint que les FML no s'haguessin estancat, les FML amb PSU-1 actives haguessin acabat als 12-13 dies, mentre que les que inoculades amb CH11, als 17 dies.

Taula 7. Consum d'àcid L-màlic i previsió de la durada total de fermentació malolàctica (FML) en cas que no s'haguessin aturat. La primera lletra del codi són les soques PSU-1 (P_) i CH11 (C_), i després hi ha el codi del vi de partida.

FML actives	Dia final	Àcid L-màlic inicial (g/l)	Àcid L-màlic final (g/l)	Consum d'àcid L-màlic	Previsió de dies de FML
P_CW78	9	1,44	0,30	79%	12
P_Laktia	9	1,59	0,44	72%	13
P_CW81	7	1,63	0,64	61%	12
P_Sc.3	7	1,82	0,78	57%	13
C_CW81	7	1,63	0,94	42%	17
C_Sc.3	7	1,82	1,05	42%	17

4.4. Fermentacions malolàctiques amb vi sintètic i diferents concentracions d'àcid L-làctic

L'evolució de les FML partint de vi sintètic a diferents concentracions d'àcid L-làctic es mostra a la Figura 8. A concentració de 0 g/l d'àcid L-làctic, les soques PSU-1 i CH11 van ser capaces d'acabar la FML amb dos i tres dies respectivament. Quan la concentració d'àcid L-làctic era de 2,5 g/l, només la soca PSU-1 d'*O. oeni* va acabar la FML amb 4 dies, en canvi la soca CH11 va arribar a consumir 1 g/l d'àcid L-làctic. Quan la concentració d'àcid L-làctic era de 5 g/l cap de

les dues soques va ser capaç d'acabar la FML, tot i que la soca PSU-1 presentava un major consum d'àcid L-màlic que la soca CH11.

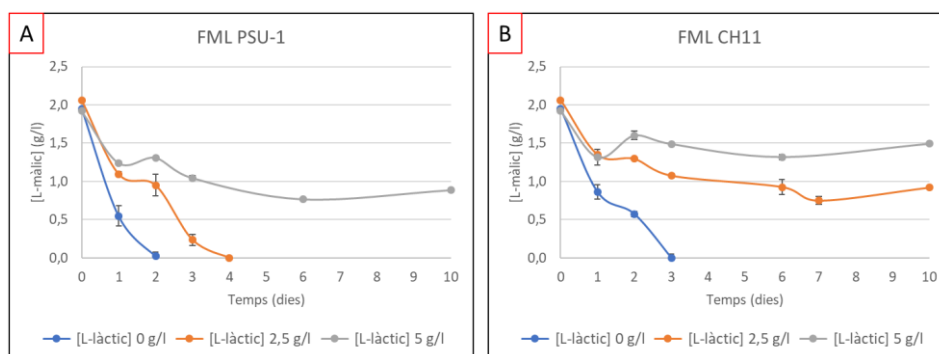


Figura 8. Evolució de la concentració d'àcid L-màlic durant la fermentació malolàctica de les soques PSU-1 (A) i CH11 (B) d'*O. oeni* a partir de vi sintètic. Les diferents condicions d'àcid L-làctic en el vi es mostren de color blau (0 g/l), taronja (2,5 g/l) i gris (5 g/l).

A la Taula 8 es mostren els valors dels paràmetres analitzats a final de les FML en vi sintètic. En tots els casos la concentració d'àcid L-làctic i el pH van augmentar respecte els valors inicials (veure composició del WLM a l'apartat de Materials i mètodes), i l'àcid L-màlic va disminuir. Pel que fa a l'àcid acètic, els nivells es van mantenir estables respecte els valors inicials de 0,28 g/l. En el cas de l'àcid cítric sí que hi va haver consum en totes les condicions, encara que a les FML amb 5 g/l d'àcid L-làctic aquesta disminució va ser menor. Finalment, cal destacar que a les condicions de 5 g/l d'àcid L-làctic, la població viable va ser inferior a 10^4 UFC/ml, i els nivells de glucosa + fructosa van ser superiors als inicials (2 g/l). En el cas de la FML de CH11 a 2,5 g/l d'àcid L-làctic, tot i no acabar la FML, a final es va detectar població viable a l'ordre de 10^6 UFC/ml, de manera que la concentració de 2,5 g/l de L-làctic no era letal per a CH11.

Taula 8. Resum de paràmetres finals de les fermentacions malolàctiques (FML) amb les soques PSU-1 i CH11 a partir de vi sintètic. Les concentracions d'àcid L-làctic inicials van ser 0 g/l (.0), 2,5 g/l (.2,5) i 5 g/l (.5). Les dades es presenten com a mitjana $\pm$ desviació estàndard de les rèpliques, excepte a Durada FML. Les lletres diferents en una mateixa columna signifiquen que les soques presenten diferències significatives en aquell paràmetre, segons el test Tukey (HSD) amb $p < 0,05$.

Mostra	Durada FML	Recompte de viables final (UFC/ml)	Producció d'àcid L-làctic (g/l)	Àcid L-màlic (g/l)	pH	Àcid acètic (g/l)	Àcid cítric (g/l)	D-glucosa + D-fructosa (g/l)
PSU-1.0	2	$1,90 \times 10^7$ a	$1,13 \pm 0,06$ a	$0,00 \pm 0,00$ c	$3,692 \pm 0,006$ ab	$0,31 \pm 0,02$ a	$0,34 \pm 0,10$ ab	$2,10 \pm 0,10$ bc
PSU-1.2,5	4	$1,83 \times 10^7$ a	$0,79 \pm 0,10$ ab	$0,00 \pm 0,00$ c	$3,752 \pm 0,025$ a	$0,30 \pm 0,02$ ab	$0,30 \pm 0,10$ b	$1,99 \pm 0,01$ c
PSU-1.5	10	$< 10^4$ c	$0,26 \pm 0,11$ c	$0,89 \pm 0,08$ b	$3,580 \pm 0,013$ bc	$0,24 \pm 0,01$ c	$0,47 \pm 0,03$ ab	$3,00 \pm 0,07$ a
CH11.0	3	$1,11 \times 10^7$ ab	$0,91 \pm 0,00$ ab	$0,00 \pm 0,00$ c	$3,637 \pm 0,065$ abc	$0,27 \pm 0,01$ bc	$0,35 \pm 0,01$ ab	$2,18 \pm 0,07$ b
CH11.2,5	10	$3,26 \times 10^6$ bc	$0,63 \pm 0,03$ bc	$0,80 \pm 0,20$ b	$3,564 \pm 0,093$ bc	$0,26 \pm 0,01$ c	$0,36 \pm 0,04$ ab	$3,00 \pm 0,05$ a
CH11.5	10	$< 10^4$ c	$0,60 \pm 0,29$ bc	$1,49 \pm 0,21$ a	$3,551 \pm 0,008$ c	$0,23 \pm 0,01$ c	$0,51 \pm 0,01$ a	$3,02 \pm 0,03$ a

5. Discussió

Les soques de *L. thermotolerans* (Lt) estudiades en el present treball han mostrat baixa capacitat de producció d'àcid L-làctic, malgrat haver-hi diferències entre elles. Degut a això, no es van poder determinar els efectes de l'àcid L-làctic produït en FAL sobre la FML. Aquest fet va ser degut a la disminució d'àcid L-làctic a final de la FAL en les fermentacions seqüencials, amb la presència de *S. cerevisiae* (Sc). Per altra banda, sí que es va poder estudiar la influència de diferents concentracions d'àcid L-làctic sobre la FML i diferents soques d'*O. oeni*, gràcies a un assaig amb vi sintètic (WLM). Es va veure que a partir de 2,5 g/l d'àcid L-làctic, en funció de la soca d'*O. oeni*, podia haver-hi dificultats per a realitzar la FML, i a partir de 5 g/l es perdia la viabilitat cel·lular.

No totes les soques de Lt tenien la mateixa capacitat de producció d'àcid L-làctic ni el mateix perfil fermentatiu. Aquest fet ja s'havia descrit en altres estudis (Gobbi *et al.*, 2013; Benito *et al.*, 2016b; Du Plessis *et al.*, 2017), i es pot extrapolar a altres espècies de llevats, que es poden definir per una característica fenotípica, però hi poden haver diferències entre soques (Padilla *et al.*, 2016; Du Plessis *et al.*, 2017).

Tot i les diferències entre soques de Lt, la producció d'àcid L-làctic a les FAL individuals va ser baixa en comparació amb altres estudis (Kapsopoulou *et al.*, 2005; Gobbi *et al.*, 2013), i així ho demostren les mínimes diferències amb el control de Sc. En un estudi de Zhu *et al.* (2020), es van comparar FAL seqüencials en most sintètic i most natural. Els resultats de producció d'àcid L-làctic de Lt en FAL seqüencial amb Sc mostraven que amb most natural la producció era d'uns 4 g/l, mentre que en most sintètic era de 0,5 g/l. En el present estudi es va utilitzar most sintètic, i la màxima producció d'àcid L-làctic va ser per part de la soca CW79, amb 0,403 g/l, valor similar al de Zhu *et al.* (2020). De fet, a la resta d'estudis que s'havien determinat valors més alts, també s'utilitzava most natural o most concentrat. Així doncs, la composició del most utilitzat en els estudis té una influència sobre les soques de Lt i la seva capacitat de produir àcid L-làctic. Una possible explicació de l'efecte que té la composició del most sobre la capacitat fermentativa de les soques és la baixa concentració de nitrogen assimilable del most sintètic de partida (YAN inicial: 206,5 mg N / l). Una baixa concentració de nitrogen inicial, per sota dels 250 mg N / l, es relaciona amb una menor capacitat de fermentació per part de les soques (Bell *et al.*, 2005).

Per la seva banda, la producció d'àcid L-làctic per part de Sc no es pot considerar significativa, i en altres estudis ja s'ha descrit que en FAL individual pot haver-hi detecció d'aquest compost de manera residual (Gobbi *et al.*, 2013; Benito *et al.*, 2016b). La màxima producció d'àcid L-làctic va ser per part de la soca CW79, però degut al poc temps del que es disposava al laboratori, es va fer la selecció de soques per a les FAL seqüencials abans de conèixer els resultats de producció d'àcid L-làctic de cada soca de Lt, i la soca CW79 no va ser seleccionada. En futurs estudis seria interessant poder incloure la soca CW79 per a l'assaig de FAL seqüencial.

Se sap que els llevats no-*Saccharomyces* tenen una major contribució durant els primers estadis de la FAL (Padilla *et al.*, 2016). En aquest estudi s'ha vist que la major producció d'àcid L-làctic es dona a les primeres 48 hores de FAL, coincidint amb la baixada de densitat. Després de les 48 hores els nivells no variaven de manera significativa, fet que concorda amb la revisió de Morata *et al.* (2018), i confirmant que la major contribució es dona als primers estadis de la FAL.

Pel que fa a les FAL seqüencials, totes les soques van produir el mateix àcid L-làctic a 48 hores que en les FAL individuals, fet que era esperable, excepte en el cas de la soca comercial Laktia, que va ser significativament inferior. En aquests casos, els controls de Sc també van produir nivells d'àcid L-làctic similars a Lt (de l'ordre de 0,100 g/l). Aquests nivells són similars als que s'havien determinat a un estudi de Gobbi *et al.* (2013) i inferiors als de Zhu *et al.* (2020), també en el control de Sc. El fet que Lt produeixi nivells similars que Sc denota que la producció per part de Lt era més baixa del que s'esperaria, ja que Lt es defineix per la producció d'àcid L-làctic, tal i com s'ha demostrat en molts altres estudis (Kapsopoulou *et al.*, 2005; Gobbi *et al.*, 2013; Benito, 2018).

A final de les FAL seqüencials els nivells d'àcid L-làctic van baixar de manera significativa fins a valors propers a 0 g/l en la majoria de casos. L'única excepció va ser la de Lt.1, tot i que els nivells també van disminuir. Aquests fets són contraris al que s'esperava, ja que en diversos estudis (Gobbi *et al.*, 2013; Balıkcı *et al.*, 2016; Benito *et al.*, 2016b) la millor condició per a la producció d'àcid L-làctic és la inoculació seqüencial de Sc a 48 hores. En canvi, en un estudi de Du Plessis *et al.* (2017) en el que es van realitzar FAL seqüencials a 48 hores amb most natural, no es va detectar àcid L-làctic a temps final (< 0,20 g/l), fet que concorda amb els resultats del present estudi, encara que aquest fet no va ser discutit. Una possible explicació a la baixada d'àcid L-làctic entre les 48 hores i el final de FAL podria ser la degradació o metabolització de l'àcid L-làctic, tot i que aquesta reacció no s'hauria de donar en condicions enològiques (Morata *et al.*, 2018). Una altra explicació, que sembla més adient, és la captació d'àcid L-làctic per part de les cèl·lules de Sc, o per part de les cèl·lules de Lt en presència de Sc. Aquesta característica podria ser dependent de soca de Sc, però per poder trobar resposta a aquest fenomen caldrien més estudis en condicions de celler, emprant most natural de raïm. La condició que va produir més àcid L-làctic, tant a 48 h com a final de la FAL seqüencial, va ser la de Seq.Lt1.

Pel que fa a la resta de paràmetres de les FAL seqüencials, es va observar que el grau alcohòlic de les fermentacions amb Lt no superava el grau de les FAL control amb Sc. Els resultats no es van poder analitzar estadísticament, però estan amb concordança amb altres estudis que suggereixen que la producció de quantitats significatives d'àcid L-làctic per part de Lt pot provocar una disminució del grau alcohòlic (Gobbi *et al.*, 2013; Benito *et al.*, 2016b). De fet, tot i que els nivells d'àcid L-làctic a final de FAL siguin pràcticament nuls, hi va haver formació d'àcid L-làctic a principi de la FAL, de manera que part dels sucres no es van poder consumir per a formar etanol. Malgrat això, a final de FAL, els nivells d'àcid L-làctic no eren prou alts com per produir una disminució de pH, fet que sí que es va detectar en altres estudis (Gobbi *et al.*, 2013; Benito *et al.*, 2016b). En les FAL seqüencials amb Lt, també es va detectar una lleugera disminució dels nivells d'àcid L-màlic, que ja s'havia reportat en altres estudis que implicaven Lt en FAL (Du Plessis *et al.*, 2017; Benito, 2018).

Durant el seguiment de les FAL seqüencials es va determinar el perfil poblacional de Sc i Lt al llarg de la FAL amb plaques de medi WLN sòlid. En el cas de les FAL seqüencials, un cop inoculat Sc, aquest s'imposava a Lt, i la població de Lt disminuïa, tot i que es mantenia present fins al final de FAL. Aquest fet ja s'ha descrit en altres estudis, com el de Ciani *et al.* (2006), que afirmen que les poblacions de llevats no-*Saccharomyces* poden mantenir-se fins a final de FAL en presència de Sc. Tot i amb això, a final de FAL es va detectar un lleuger augment de la població de Lt, fet que no era esperat. El seguiment de població també es va fer per qPCR, i mitjançant aquesta

tècnica, no es va detectar un augment de població de Lt a final de FAL, sinó que aquesta s'anava mantenint o disminuint a cada punt de mostreig.

Si es comparen les dades de població obtingudes per sembra en placa WLN i per qPCR, en la majoria de casos el valor era més elevat en la qPCR. Aquest fet és normal ja que la qPCR detecta còpies d'ADN de totes les cèl·lules, tan vives com mortes (població total), mentre que a la sembra en placa només es detecten les cèl·lules vives (població viable). En els casos en què la població per qPCR era inferior a la de placa WLN, l'explicació podia ser tan una pèrdua de cèl·lules a l'hora de separar-les del medi per fer l'extracció d'ADN i qPCR, com un error a l'hora de fer les dilucions per sembrar en placa.

Tant la sembra en placa de WLN com la qPCR són bones tècniques per a la detecció de microorganismes, tot i que tenen avantatges i inconvenients. El principi de la qPCR fa que aquesta tendeixi a sobreestimar la població cel·lular, ja que es comptabilitzen les cèl·lules mortes, tot i que s'han plantejat solucions com la utilització de marcadors de viabilitat, que eviten l'amplificació d'ADN provinent de cèl·lules mortes o danyades (Andorrà *et al.*, 2010b; Navarro *et al.*, enviat). En canvi, la sembra en placa pot subestimar la població si hi ha cèl·lules viables però no cultivables, és una tècnica més lenta, ja que pot tardar entre 2 i 3 dies a donar resultats, cal tenir una orientació per saber quina dilució sembrar i si les poblacions de dues espècies són diferents la que és minoritària pot no detectar-se (Navarro *et al.*, enviat). Per la seva banda, la qPCR pot donar resultats més immediats (hores), permet detectar cèl·lules viables però no cultivables, i quantificar poblacions d'ordres de magnitud diferents, sent una tècnica molt més precisa (Andorrà *et al.*, 2010b; García *et al.*, 2017; Navarro *et al.*, enviat). Malgrat això, a la qPCR cal conèixer el microorganisme a detectar i tenir encebadors específics. A nivell econòmic, la sembra en placa és molt més assequible que la qPCR. Per aquests motius, el seguiment d'una FAL amb Lt i Sc es pot fer amb placa de cultiu, ja que són dos organismes que creixen sense problemes en medi sòlid, tot i que en un estudi recent s'ha vist que Lt pot entrar a l'estat de viable però no cultivable (Navarro *et al.*, enviat). La qPCR és una tècnica que permet fer el seguiment de FALs amb gran diversitat d'espècies i poblacions (com podria ser una FAL espontània), sempre i quan es tinguin els encebadors dissenyats.

Pel que fa a les FML provinents de FAL, no es va poder finalitzar el seguiment degut a què no es disposava de més temps al laboratori. De totes maneres, la soca PSU-1 va mostrar una major capacitat fermentativa i adaptació que CH11, ja que el consum diari d'àcid L-màlic era superior en la primera, i només es van aturar 2 condicions d'aquesta soca. De fet, les condicions amb PSU-1 probablement haguessin acabat amb uns 13 dies si haguessin seguit la tendència, mentre que les condicions actives de CH11 haguessin acabat amb uns 17 dies.

Si es comparen els vins de partida, no hi havia diferències significatives d'àcid L-làctic, però sí que la presència de Lt en les FAL va tenir influència. Els llevats no-*Saccharomyces* poden tenir efectes positius i negatius de cara a la FML (Balmaseda *et al.*, 2018). Lt es caracteritza per la producció d'àcid L-làctic i glicerol (l'últim no es va estudiar en aquest treball) (Porter *et al.*, 2019). L'àcid L-làctic en elevades concentracions pot tenir un efecte inhibitori sobre la FML (Morata *et al.*, 2018), però en aquest estudi no es van produir elevades concentracions d'aquest compost. En canvi, el glicerol no té efectes sobre els BAL (Balmaseda *et al.*, 2018). En aquest estudi, els vins que es van fermentar amb Lt eren més favorables per al desenvolupament de la FML que

no pas els controls de Sc, tot i que l'efecte de l'àcid L-làctic no es va poder comprovar degut a les baixes concentracions produïdes.

Pel que fa a l'anàlisi d'altres paràmetres de les FML provinents de FAL, en totes les condicions es va consumir part de l'àcid cítric del medi, demostrant l'activitat metabòlica d'*O. oeni* en resposta a l'estrès per pH i alcohol (Olguín *et al.*, 2009). De totes maneres, no es va observar un increment dels nivells d'àcid acètic, que s'associen amb el consum d'àcid cítric (Bartowsky, 2005) i amb els BAL heterofermentatius com *O. oeni* (Du Plessis *et al.*, 2017), possiblement perquè una part es va volatilitzar. El consum d'àcid cítric també s'associa amb el consum de sucres residuals, tot i que aquest consum no es va donar a totes les condicions. Així doncs, amb el consum parcial de l'àcid cítric es va demostrar l'activitat metabòlica d'*O. oeni*, encara que no es va detectar la resta d'activitat metabòlica a la que hauria d'estar associada.

En les FML provinents de FAL, l'inòcul inicial era de 2×10^7 cèl/ml. Respecte aquesta població inicial hi va haver una disminució fins al voltant de 10^6 cèl/ml, població que es va mantenir i que permetia el desenvolupament de la FML. De fet, la població necessària per a la realització de la FML s'ha descrit que és a partir de 10^6 cèl/ml (Lerm *et al.*, 2010).

En les FML amb vi sintètic (WLM), les cinètiques fermentatives a diferents concentracions d'àcid L-làctic van ser diferents. A concentració de 0 g/l d'àcid L-làctic tant la soca PSU-1 com la CH11 van mostrar capacitat de realitzar la FML. Però amb 2,5 g/l d'àcid L-làctic només la soca PSU-1 va mostrar resistència per poder acabar la FML, mentre que CH11 només va consumir 1 g/l d'àcid L-màlic, i la viabilitat cel·lular va disminuir. A 5 g/l d'àcid L-làctic cap de les dues soques va poder finalitzar la FML, ja que la viabilitat cel·lular va disminuir dràsticament: en el cas de PSU-1 es va consumir 1 g/l d'àcid L-màlic, mentre que en CH11 només 0,5 g/l d'àcid L-màlic. En una revisió de Morata *et al.* (2018), es comenta que per sobre de 4 g/l d'àcid L-làctic els BAL són inhibits i no es pot desenvolupar la FML. En el present estudi s'ha vist que a 5 g/l d'àcid L-làctic pot haver-hi consum d'àcid L-màlic per part del BAL, però no poden finalitzar la FML, ja que finalment la viabilitat cel·lular es veu afectada. Així doncs, es pot dir que una concentració de 5 g/l d'àcid L-làctic té un efecte letal sobre els BAL.

En les FML en WLM, el consum d'àcid cítric només es va observar en les condicions que es va mantenir la viabilitat al llarg de la FML. Tot i que les diferències no van ser significatives, en les condicions de 5 g/l d'àcid L-làctic el consum d'àcid cítric va ser menor, fet que denota la baixa activitat metabòlica i viabilitat d'*O. oeni* en aquesta condició, ja que l'àcid cítric està relacionat amb l'activitat metabòlica dels BAL (Olguín *et al.*, 2009). En cap de les condicions es va observar consum de sucres ni producció d'acètic, malgrat que aquests esdeveniments estan relacionats amb el consum d'àcid cítric (Bartowsky, 2005). En els casos de 5 g/l d'àcid L-làctic, com que no hi va haver consum d'àcid cítric, tampoc s'esperava consum de sucres ni producció d'acètic.

Les concentracions d'àcid L-làctic en WLM (0 g/l, 2,5 g/l i 5 g/l) van ser escollides en base la literatura publicada, considerant que eren representatives de la producció d'àcid L-làctic per part de Lt (Benito *et al.*, 2016b; Morata *et al.*, 2018). Els resultats mostren que a partir de 5 g/l d'àcid L-làctic la FML no es pot desenvolupar, i suggereixen que a partir de 2,5 g/l hi poden haver dificultats en funció de la soca d'*O. oeni* implicada. Un detall important és que en la preparació del WLM, el pH es va ajustar després de l'addició de l'àcid L-làctic, per tant era igual en totes les condicions. Això indica que les inhibicions de FML detectades no es devien a una baixada de pH

induïda per l'àcid L-làctic, sinó que el mateix l'àcid L-làctic era el responsable de la inhibició del creixement i activitat metabòlica d'*O. oeni*. En futurs estudis, seria interessant escurçar el rang de concentracions d'àcid L-làctic per tal de determinar la tolerància de cada soca, per exemple: 0,0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 i 3,0 g/l. A més, també s'ajustaria més als resultats d'àcid L-làctic produïts a les FAL amb Lt en aquest estudi, ja que les soques estudiades tenien baixa capacitat de producció d'àcid L-làctic.

Des de la perspectiva de la concentració d'àcid L-làctic, els resultats dels assajos amb vi sintètic i vi provinent de most sintètic no concorden. En el cas de PSU-1, la cinètica fermentativa de la condició de 2,5 g/l d'àcid L-làctic en WLM era més alta que en totes les FML provinents de FAL amb PSU-1, tot i que partien d'una concentració d'àcid L-làctic propera a 0 g/l. La concentració d'àcid L-làctic era més favorable en el cas del most sintètic fermentat, però aquest fet es deu a què els medis eren diferents, i en el cas de WLM les condicions eren més favorables per a *O. oeni* que no pas el most sintètic fermentat. Tot i amb això, sí que es poden comparar els assajos des de la perspectiva de les soques: en tots dos sempre es va observar que la soca PSU-1 era més ràpida o consumia més àcid L-màlic que la soca CH11, de manera que la primera mostra una millor capacitat de realització de FML en diferents condicions. De fet, les FML amb la soca CH11 no van acabar en cap dels assajos realitzats, exceptuant la condició a 0 g/l de WLM i les que varen quedar actives (C_CW81 i C_Sc.3) però que no es té certesa si haguessin acabat, de manera que aquesta soca és més susceptible a canvis en el medi. Aquests resultats posen en relleu la importància d'estudiar diferents soques, ja que algunes característiques d'*O. oeni* són dependents de soca.

6. Conclusions i perspectives de futur

Les soques de *L. thermotolerans* utilitzades en aquest estudi no tenien una alta capacitat de producció d'àcid L-làctic en most sintètic. Tot i amb això, es pot afirmar que la major contribució de *L. thermotolerans* pel que fa a producció d'àcid L-làctic es dona a les primeres 48 hores, els primers estadis de la FAL. A més, la presència de la soca QA23 de *S. cerevisiae* en FAL seqüencial amb *L. thermotolerans*, va provocar una disminució dels nivells d'àcid L-làctic. Tot i amb això, caldria realitzar més estudis amb mostos naturals, per determinar si la baixa producció d'àcid L-làctic i la disminució induïda per *S. cerevisiae* es repeteixen.

L'objectiu principal de l'estudi era determinar si *L. thermotolerans* tenia un efecte inhibitori clar sobre la FML, però degut a la baixa producció d'àcid L-làctic de les soques de *L. thermotolerans* no es va poder determinar. El que sí que es va veure és que els vins produïts amb de *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae* eren més favorables per a la FML que els produïts amb *S. cerevisiae* sola, probablement degut a altres efectes del metabolisme de *L. thermotolerans* que no són la producció d'àcid L-làctic. També es va poder determinar que en vins amb 5 g/l d'àcid L-làctic els BAL no tenien viabilitat i la FML no es podia donar, i en vins amb 2,5 g/l d'àcid L-làctic la FML era inhibida en funció de la soca d'*O. oeni*. Pel que fa a les soques d'*O. oeni*, la PSU-1 tenia més capacitat d'adaptació i presentava millor capacitat fermentativa que CH11, demostrant que la tolerància a l'àcid L-làctic és una característica dependent de soca.

En el futur calen més estudis per poder ampliar el coneixement de l'efecte de *L. thermotolerans* (producció d'àcid L-làctic i metabolisme en general) sobre la FML, i poder determinar la concentració mínima inhibidora per a diferents soques d'*O. oeni*, o sobre poblacions indígenes de BALs per a FML espontània. D'aquesta manera, es podria seleccionar la soca d'*O. oeni* més adequada en funció de les condicions del vi obtingut per a realitzar la FML. Una altra perspectiva de futur, seria estudiar en most natural la inoculació de *L. thermotolerans* i al cap de diferents temps *S. cerevisiae* (12, 24, 36, 48 hores), per tal de determinar en quina condició es produeix la màxima quantitat d'àcid L-làctic sense que pugui comprometre el desenvolupament de la FML, ja sigui espontània amb BALs indígenes o amb soques seleccionades d'*O. oeni*.

7. Bibliografia

- Albergaria, H., & Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2035–2046.
- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2010a). Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *European Food Research and Technology*, 231(2), 215–224.
- Andorrà, I., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2010b). Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 257–262.
- Balikci, E. K., Tanguer, H., Jolly, N. P., & Erten, H. (2016). Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. *Yeast*, 37(1), 313–321.
- 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(March), 1–8.
- Bartowsky, E. J. (2005). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 174–187.
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., & Benito, S. (2015). Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1911–1922.
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderón, F., & Benito, S. (2016). Outlining the influence of non-conventional yeasts in wine ageing over lees. *Yeast*, 33(7), 329–338.
- Bell, S.-J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii* - *Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 312–320.
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2016a). Combined use of *S. pombe* and *L. thermotolerans* in winemaking. Beneficial effects determined through the study of wines' analytical characteristics. *Molecules*, 21(12).
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2017). The combined use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* - Effect on the anthocyanin composition. *Molecules*, 22(5).
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., & Benito, S. (2015). Combined use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production. *Molecules*, 20(6), 9510–9523.
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., & Benito, S. (2016b). Quality and composition of Airén wines fermented by sequential inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*, 54(2), 135–144.
- Benito, S. (2018). The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16), 6775–6790.
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Röcker, J., & Rauhut, D. (2015). Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *European Food Research and Technology*, 241(5), 707–717.

- Chen, K., Escott, C., Loira, I., del Fresno, J. M., Morata, A., Tesfaye, W., Calderon, F., Suárez-Lepe, J. A., & Benito, S. (2018). Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiology*, 69, 51–63.
- Ciani, M., Beco, L., & Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 239–245.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(5), 873–882.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1670–1678.
- Du Plessis, H., Du Toit, M., Nieuwoudt, H., Van Der Rijst, M., Kidd, M., & Jolly, N. (2017). Effect of *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces* yeasts and malolactic fermentation strategies on fermentation kinetics and flavor of Shiraz wines. *Fermentation*, 3(4).
- Escott, C., Morata, A., Ricardo-da-Silva, J. M., Callejo, M. J., González, M. del C., & Suarez-Lepe, J. A. (2018). Effect of *Lachancea thermotolerans* on the formation of polymeric pigments during sequential fermentation with *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules*, 23(9).
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones. *Applied Microbiology*, 124(6), 1521–1531.
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 979–995.
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Crespo, J., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2017). Yeast monitoring of wine mixed or sequential fermentations made by native strains from D.O. 'Vinos de Madrid' using real-time quantitative PCR. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–15.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, 33(2), 271–281.
- Guilloux-Benatier, M., Le Fur, Y., & Feuillat, M. (1998). Influence of fatty acids on the growth of wine microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(3–4), 144–149.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2007). Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. *FEMS Yeast Research*, 7(8), 1340–1349.
- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14, 215–237.
- Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., & Spyropoulos, H. (2005). Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8), 1599–1602.
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., & Nerantzis, E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans*

- and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 735–739.
- Lerm, E., Engelbrecht, L., & du Toit, M. (2010). Malolactic Fermentation: The ABC's of MLF. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 31(2), 186–212.
- Liu, P.-T., Lu, L., Duan, C.-Q., & Yan, G.-L. (2016). The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 356–363.
- Liu, S. Q. (2002). Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 589–601.
- 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.
- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M. A., González, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). *Lachancea thermotolerans* Applications in Wine Technology. *Fermentation*, 4(53), 1–12.
- Navarro, Y., Torija, M.-J., Mas, A., & Beltran, G. (enviat). Viability-PCR allows monitoring the yeast population dynamics in mixed fermentations, including viable but non culturable yeasts.
- Nissen, P., & Arneborg, N. (2003). Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 180(4), 257–263.
- Olguín, N., Bordons, A., & Reguant, C. (2009). Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology*, 26(2), 197–203.
- Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 1–20.
- Porter, T. J., Divol, B., & Setati, M. E. (2019). *Lachancea* yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Research International*, 119(October 2018), 378–389.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., & Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 201–210.
- Roca-Mesa, H., Sendra, S., Mas, A., Beltran, G., & Torija, M. J. (2020). Nitrogen preferences during alcoholic fermentation of different non-*Saccharomyces* yeasts of oenological interest. *Microorganisms*, 8(2).
- Shekhawat, K., Bauer, F. F., & Setati, M. E. (2016). Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(6), 2479–2491.
- Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., & Côrte-Real, M. (2008). Reduction of volatile acidity of wines by selected yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5), 881–890.
- Vilela, A. (2019). Use of nonconventional yeasts for modulating wine acidity. *Fermentation*, 5(1).
- Zhu, X., Navarro, Y., Mas, A., Torija, M. J., & Beltran, G. (2020). A rapid method for selecting non-*Saccharomyces* strains with a low ethanol yield. *Microorganisms*, 8(5).

Annex 1. Dades suplementàries

Taula S1. Composició d'aminoàcids de la preparació ("stock") per al most sintètic.

	mg/l	mg N/l
Prolina	300	36,48
Amoni	50	13,09
GABA	50	6,79
Glutamina	260	49,81
Arginina	115	36,97
Triptòfan	75	10,28
Alanina	90	14,14
Àcid Glutàmic	210	19,98
Serina	80	10,66
Treonina	60	7,05
Leucina	25	2,67
Àcid Aspàrtic	45	4,73
Valina	35	4,18
Fenilalanina	25	2,12
Isoleucina	25	2,67
Histidina	40	10,83
Metionina	10	0,94
Tirosina	10	0,77
Glicina	10	1,86
Cisteïna	15	1,73
Lisina	10	1,92
Asparagina	10	2,12
Citrulina	5	1,20
Total	1555	242,99

Per al càlcul del YAN se sumen l'amoní, el GABA i tots els aminoàcids exceptuant la Prolina.

Taula S2. Resum de les fermentacions alcohòliques (FAL) amb inoculació individual de Lt (*L. thermotolerans*) i Sc (*S. cerevisiae*), i concentració d'àcid L-làctic (g/l) a dia 2 i dia final de FAL. Les dades es presenten com a mitjana $\pm$ desviació estàndard de les rèpliques (triplicats i duplicats en el cas del control Sc.QA23), excepte en els Durada FAL. Les lletres diferents en una mateixa columna signifiquen que les soques presenten diferències significatives en aquell paràmetre, segons el test Tukey (HSD) amb $p < 0,05$. Els valors amb * indiquen diferències significatives entre els valors d'àcid L-làctic a dia 2 i dia final en aquella mostra, segons el test Tukey (HSD) amb $p < 0,05$.

Soca	Durada FAL	Densitat final (g/l)	[Àcid L-làctic] (g/l) Dia 2	[Àcid L-làctic] (g/l) Dia Final
Lt.CW78	10 (estancada)	1066 $\pm$ 1	0,195 $\pm$ 0,089 b	0,158 $\pm$ 0,068 c
Lt.CW79	10 (estancada)	1069 $\pm$ 1	0,403 $\pm$ 0,049 a	0,380 $\pm$ 0,068 a
Lt.CW80	8 (estancada)	1069 $\pm$ 2	0,149 $\pm$ 0,103 bc	0,185 $\pm$ 0,127 bc
Lt.CW81	6 (estancada)	1067 $\pm$ 11	0,183 $\pm$ 0,038 bc	0,225 $\pm$ 0,046 abc
Lt.1	10 (estancada)	1063 $\pm$ 14	0,160 $\pm$ 0,037 bc	0,211 $\pm$ 0,038 bc
Lt.Laktia	6 (estancada)	1073 $\pm$ 0	0,271 $\pm$ 0,020 ab	0,332 $\pm$ 0,049 ab
Sc.QA23	14 (acabada)	990 $\pm$ 1	0,058 $\pm$ 0,012 c *	0,008 $\pm$ 0,002 d *

Taula S3. Valors d'àcid L-làctic a dia 2 i final de fermentació alcohòlica (FAL) amb inoculació seqüencial de diferents soques de *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae* a les 48 h. Les dades es presenten com a mitjana $\pm$ desviació estàndard de les rèpliques (triplicats i duplicats en el cas dels controls de Sc.QA23). Les lletres diferents en una mateixa columna signifiquen que les soques presenten diferències significatives en aquell paràmetre, segons el test Tukey (HSD) amb $p < 0,05$. Els valors amb * indiquen diferències significatives entre els valors d'àcid L-làctic a dia 2 i dia final en aquella mostra, segons el test Tukey (HSD) amb $p < 0,05$.

Mostra	Àcid L-làctic (g/l) dia 2	Àcid L-làctic (g/l) dia Final
Seq.CW78	0,114 $\pm$ 0,007 b *	0,031 $\pm$ 0,006 b *
Seq.CW81.1	0,092 $\pm$ 0,010 b *	0,022 $\pm$ 0,002 b *
Seq.CW81.2	0,145 $\pm$ 0,074 b *	0,041 $\pm$ 0,002 b *
Seq.Lt1	0,317 $\pm$ 0,059 a	0,173 $\pm$ 0,047 a
Seq.Laktia	0,096 $\pm$ 0,007 b *	0,025 $\pm$ 0,003 b *
Control Sc.1	0,111 $\pm$ 0,005 b *	0,025 $\pm$ 0,000 b *
Control Sc.2	0,105 $\pm$ 0,053 b	0,011 $\pm$ 0,005 b
Control Sc.3	0,151 $\pm$ 0,104 b	0,014 $\pm$ 0,008 b

Taula S4. Condicions inicials dels vins fermentats a partir de most sintètic amb *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae*, que van servir per a les fermentacions malolàctiques amb les soques PSU-1 i CH11.

Mostra	Grau alcohòlic (% v/v)	Àcid L-làctic (g/l)	Àcid L-màlic (g/l)	pH	Àcid acètic (g/l)	Àcid cítric (g/l)	D-glucosa + D-fructosa (g/l)
P_CW78	11,5	<0,01	1,44	3,483	0,97	0,49	0,51
P_Laktia	12,2	<0,01	1,69	3,443	1,28	0,53	1,21
P_CW81	12,2	0,04	1,59	3,427	1,35	0,60	0,53
P_Sc.1	12,6	0,04	1,75	3,550	0,54	0,55	0,34
P_Sc.2	12,2	0,01	1,63	3,478	1,05	0,51	1,17
P_Sc.3	13,6	<0,01	1,82	3,657	0,64	0,57	0,27
C_CW78	11,5	<0,01	1,44	3,483	0,97	0,49	0,51
C_Laktia	12,2	<0,01	1,69	3,443	1,28	0,53	1,21
C_CW81	12,2	0,04	1,59	3,427	1,35	0,60	0,53
C_Sc.1	12,6	0,04	1,75	3,550	0,54	0,55	0,34
C_Sc.2	12,2	0,01	1,63	3,478	1,05	0,51	1,17
C_Sc.3	13,6	<0,01	1,82	3,657	0,64	0,57	0,27

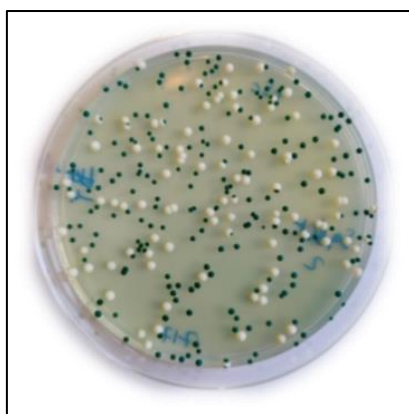


Figura S1. Placa amb medi diferencial WLN sòlid, en el que es veuen les colònies blanques (*S. cerevisiae*) i verdes (*L. thermotolerans*).

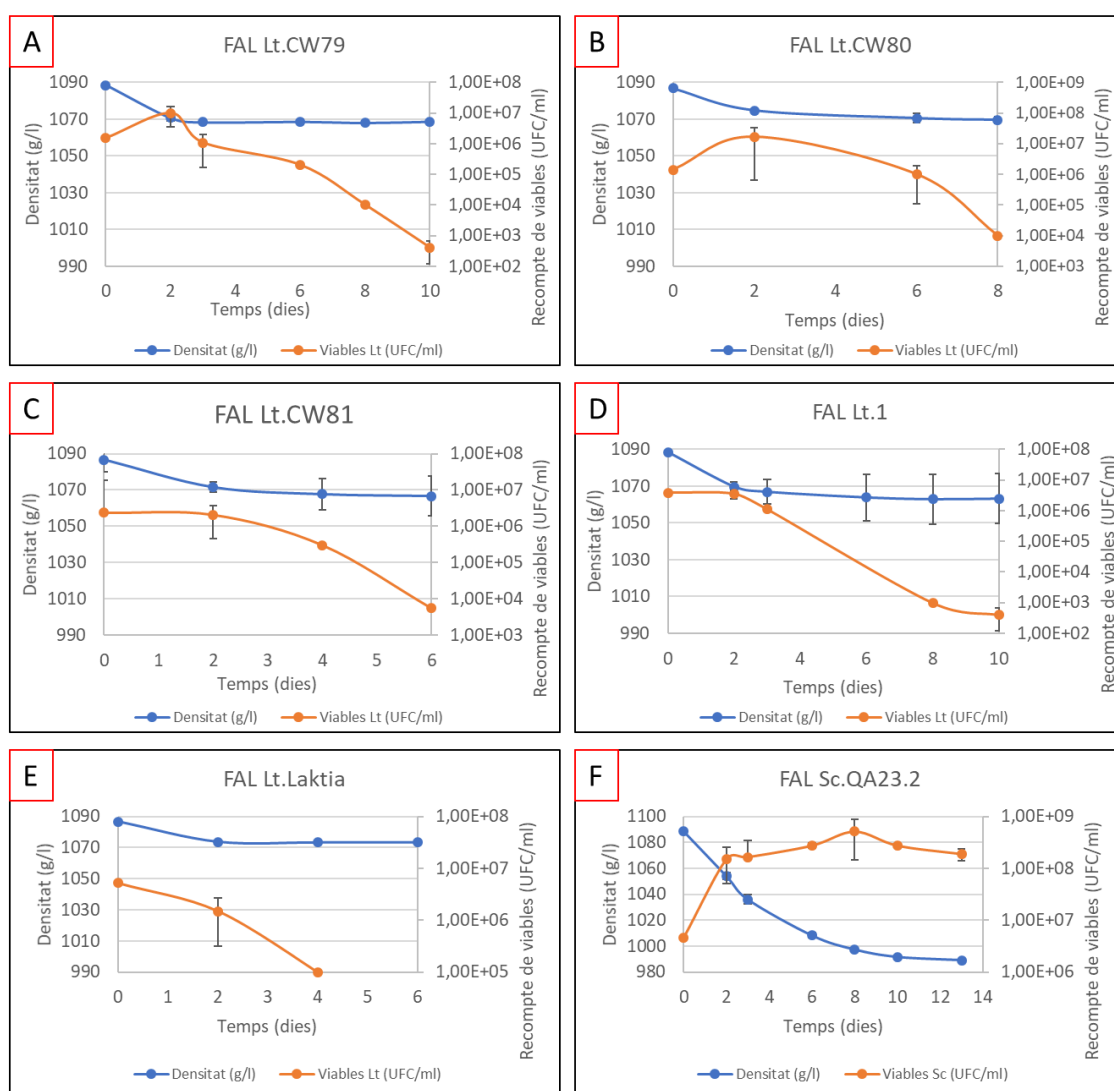


Figura S2. Seguiment de les fermentacions alcohòliques (FAL) individuals amb baixada de densitat (g/l) i recompte de cèl·lules viables en placa de cultiu WLN (UFC/ml). A: *L. thermotolerans* (soca CW79); B: *L. thermotolerans* (soca CW80); C: *L. thermotolerans* (soca CW81); D: *L. thermotolerans* (soca Lt.1); E: *L. thermotolerans* (soca Laktia); F: *S. cerevisiae* (soca QA23).

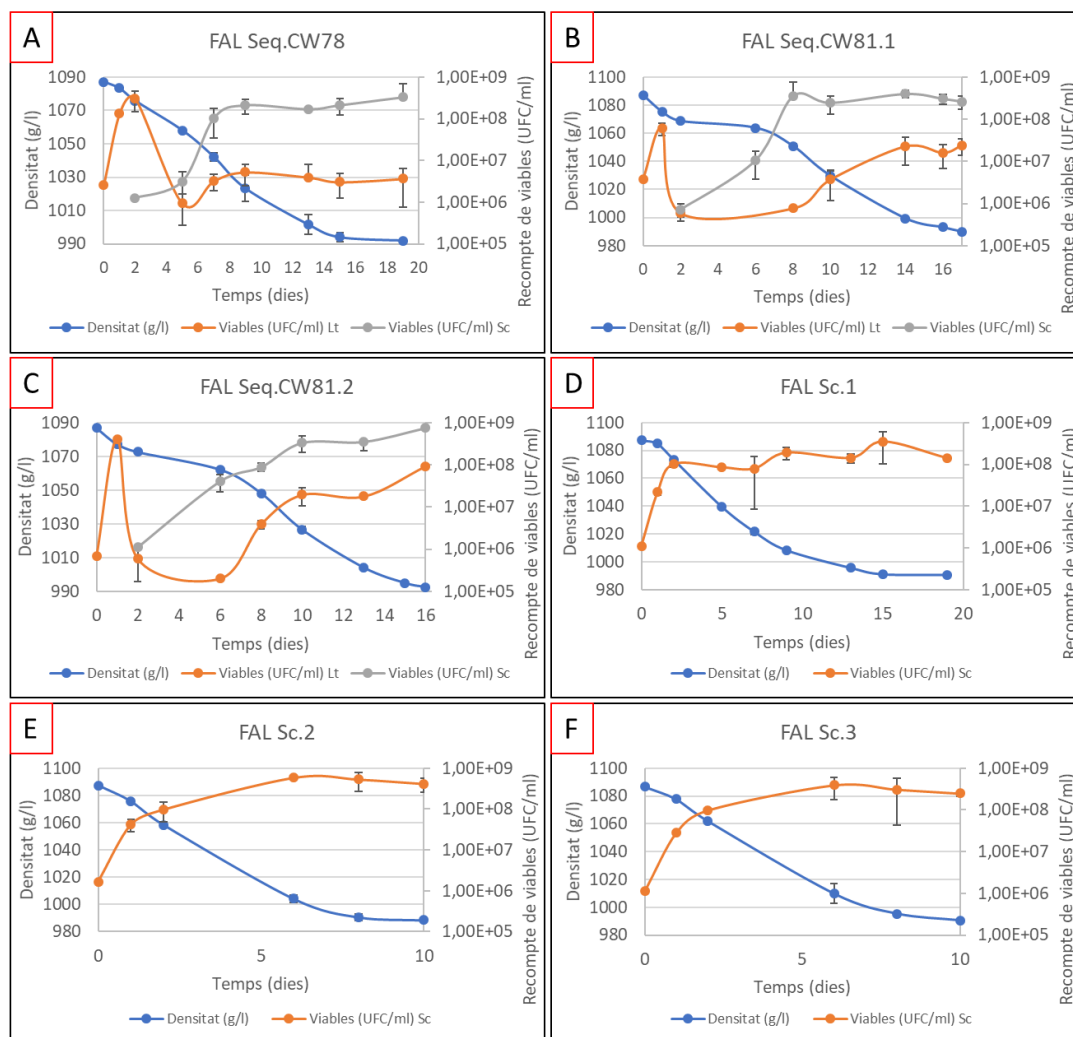


Figura S3. Seguiment de les fermentacions alcohòliques (FAL) amb inoculació seqüencial amb baixada de densitat (g/l) i recompte de cèl·lules viables en placa de cultiu WLN (UFC/ml): *L. thermotolerans* (Lt, taronja) i *S. cerevisiae* (Sc, gris). A: FAL de *L. thermotolerans* (soca CW78) i Sc.QA23 (inoculada a les 48 hores); B: FAL de *L. thermotolerans* (soca CW81.1) i Sc.QA23 (inoculada a les 48 hores); C: FAL de *L. thermotolerans* (soca CW81.2) i Sc.QA23 (inoculada a les 48 hores); D-F: FAL control Sc.QA23.

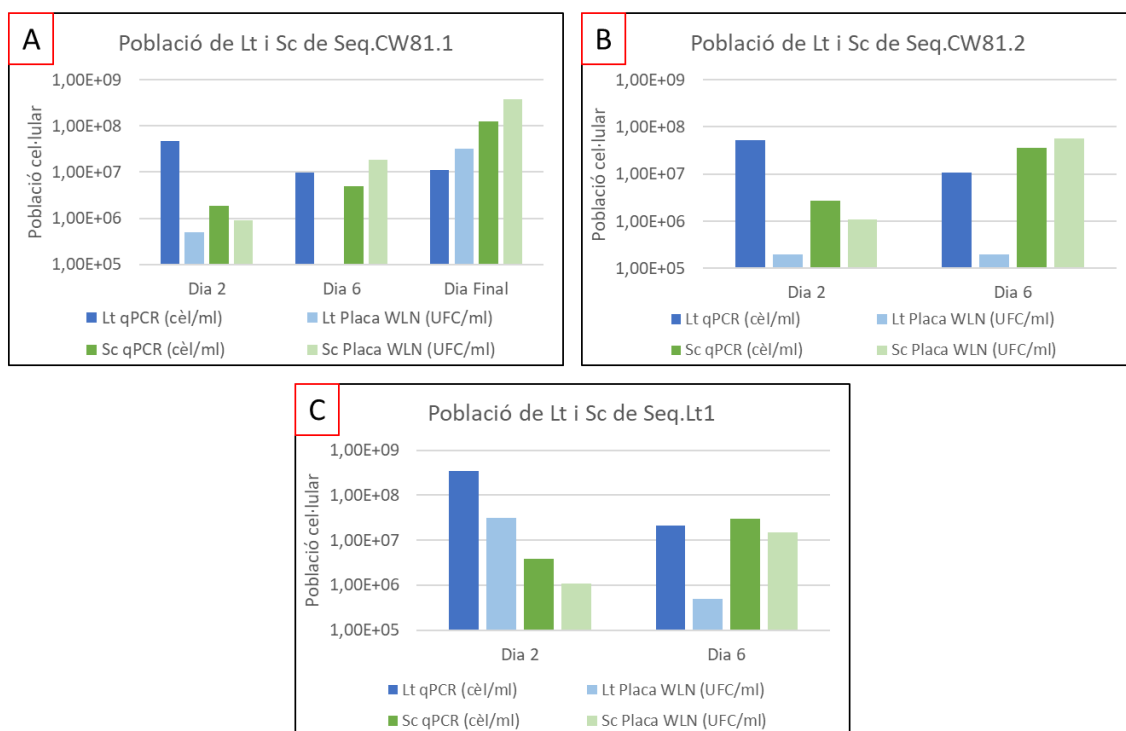


Figura S4. Població de *L. thermotolerans* (Lt; color blau) i *S. cerevisiae* (Sc; color verd) determinada per qPCR (tonalitat fosca; cèl/ml) i per placa WLN (tonalitat clara; UFC/ml), a dies 2, 6 i final de fermentació alcohòlica (FAL) amb inoculació seqüencial. A: FAL Seq.CW81.1; B: FAL Seq.CW81.2; C: FAL Seq.Lt1.

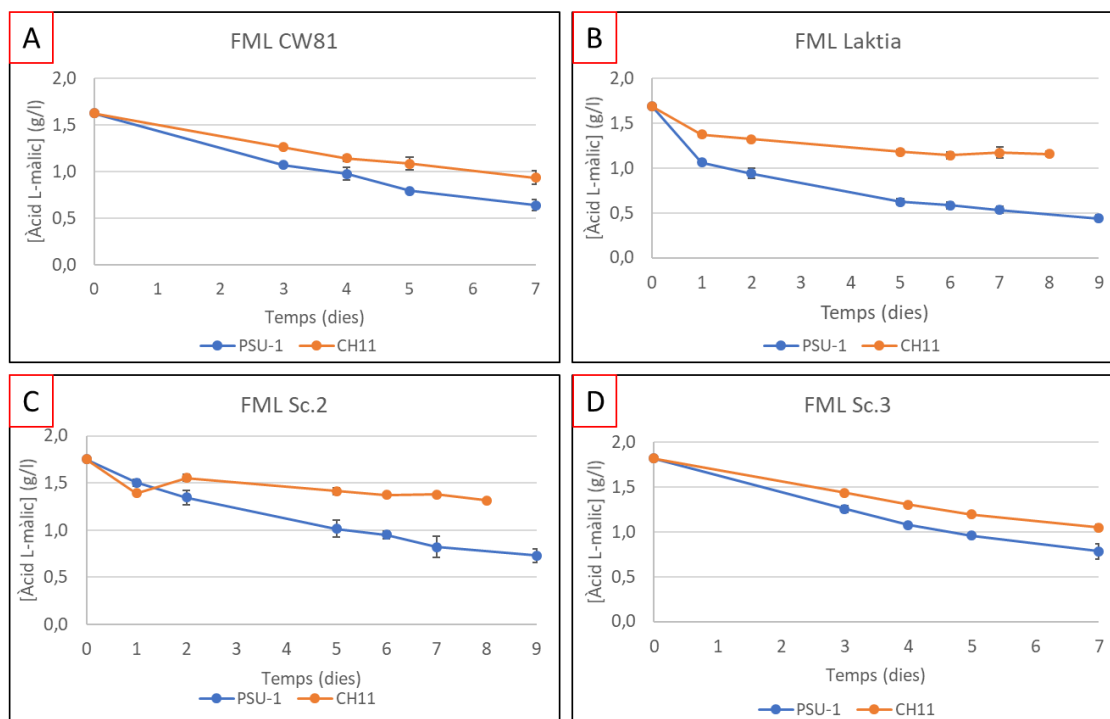


Figura S5. Evolució de la concentració d'àcid L-màlic durant la fermentació malolàctica (FML) de les soques PSU-1 (blau) i CH11 (taronja) d'*O. oeni*. A: FML del vi CW81; B: FML del vi Laktia; C: FML del vi Sc.2; D: FML del vi Sc.3.