

**SELECCIÓ DE SOQUES DE *LACHANCEA*
THERMOTOLERANS PER A LA
REDUCCIÓ DEL GRAU ALCOHÒLIC
DELS VINS**

JUDITH CELMA BARCELÓ

TREBALL DE FI DE GRAU

Dirigit per María Jesús Torija



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona, 14 de juny de 2021

Grau d'Enologia - Facultat d'Enologia



AGRAÏMENTS

D'entrada donar les gràcies a tot l'equip del grup d'investigació de Biotecnologia i Enologia de la URV, per la seva ajuda i assessorament al laboratori, especialment a la M. Àngeles Morcillo per ensenyar-me els procediments i les tècniques més específiques per a fer el meu treball i a la Sandra Martín per donar-me suport al llarg de tots els experiments.

M'agradaria agrair també l'ajut incansable del meu company de carrera i amic Quim Giralt per ajudar-me en la redacció del treball, a desconnectar en els moments més crítics i per preocupar-se que tot anés bé.

Vull agrair també el suport d'amics i amigues que han estat amb mi i m'han ajudat, en especial al Ricard i la Lucía per estar, literalment, al meu costat mentre feia el treball i donar-me l'energia per continuar.

Agrair també als meus familiars, per aguantar els meus nervis i fer-me les coses més senzilles, en especial a la meva mare Raquel per estar en tot moment al meu costat i a la meva germana Diana per guiar-me i ajudar-me a acabar el treball amb la mateixa il·lusió que el vaig començar.

Finalment, agrair de forma especial a la meva tutora, la Dra. M. Jesús Torija pel seu suport constant d'ençà que vaig començar, per ensenyar-me, corregir-me, donar-me idees i per estar pendent en tot moment perquè finalment pogués sortir un bon treball.



Resum

En l'àmbit vitivinícola, el canvi climàtic és un dels factors que ha afectat considerablement a les zones on es cultiva raïm. A causa de l'augment de la temperatura s'obté raïm més madur amb una quantitat de sucre més elevada que, finalment, esdevé en un producte final amb una alta concentració d'etanol. Fonamentalment, els problemes de salut a escala mundial i les demandes de la gent cap a productes més sans ens obliga a buscar alternatives més accessibles al públic, tot conservant les característiques sensorials i organolèptiques dels vins, encara que el grau sigui més baix.

Aquest treball s'enfoca en la cerca d'un llevat capaç de disminuir el grau alcohòlic en els vins al mateix temps que conserva el gust, l'acidesa, els aromes i altres paràmetres organolèptics del vi, utilitzant diferents soques de l'espècie *Lachancea thermotolerans*, que són capaços de utilitzar part del sucre del most per produir àcid làctic i d'aquesta manera reduir el grau i modular l'acidesa. Per dur a terme aquest treball s'han estudiat diferents soques de *L. thermotolerans*, utilitzant una soca comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, com a control. Primer es van fer fermentacions individuals per avaluar les característiques de les diferents soques de *L. thermotolerans* i després, aquelles que van presentar uns millors resultats a nivell individual, es van testar en fermentacions seqüencials amb una soca de *S. cerevisiae*. Per fer el seguiment de la implantació dels llevats inoculats, així com controlar possibles contaminacions, els llevats es van identificar a nivell d'espècie amb la tècnica PCR-RFLP de la regió 5,8S-ITS del DNAr. Amb els resultats de les fermentacions individuals, es van seleccionar les soques Lt2 i LtCW81, ja que ambdues soques presentaven una major concentració d'àcid làctic en acabar les fermentacions i una disminució del grau alcohòlic més elevada que no pas les altres soques estudiades. Amb aquestes soques es van realitzar fermentacions seqüencials amb la soca QA23, donant en els dos casos bons resultats. A partir d'aquestes primeres dades preliminars, s'haurien de fer més proves per determinar si aquestes soques podrien ser utilitzades per reduir el grau alcohòlic a nivell comercial.

Paraules clau

Lachancea thermotolerans, *Saccharomyces cerevisiae*, àcid làctic, etanol, fermentació individual, fermentació seqüencial.



Abstract

In the viticulture and viniculture sector, climate change is one of the elements that has considerably affected the zones where grapes are grown. Due to the temperature increase, the grapes that are obtained are riper and with a higher sugar quantity and, at the end, we obtain a final product with a high ethanol concentration. Fundamentally, the worldwide health problems and the people's demands of healthier products forces us to look for alternatives more accessible to the public that retain the sensorial and organoleptic properties of the wine, even if the alcoholic degree is lower. This work is focused on the research of a yeast that can diminish the alcohol content in a wine, while preserving the taste, acidity, aroma, and other organoleptic parameters of the wine, using different strains of the *Lachancea thermotolerans* species. This species is able to use part of the sugar of the grape juice to produce lactic acid, thus reducing the ethanol content and regulating the acidity.

To accomplish this work, different strains of *L. thermotolerans* have been studied, using a commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* as a control. First, individual fermentations were performed to evaluate the characteristics of the different strains of *L. thermotolerans*, and then, those that had better results individually were tested in sequential fermentations with a *S. cerevisiae* strain. For monitoring the imposition of the inoculated yeasts, as well as possible contaminations, yeasts were identified, at species level, with the technique PCR-RFLP of the DNAr 5,8S-ITS region.

After revising the individual fermentations, the strains Lt2 and LtCW8 were chosen to continue the study, since both strains showed the highest lactic acid concentration at the end of the fermentations, as well as the highest decrease on the alcoholic degree in relation with the other strains that were studied. Therefore, sequential fermentations were carried out with these strains and the *S. cerevisiae* strain QA23, obtaining positive results in both cases.

After these preliminary data, more testing should be done to assess if these strains could be used to reduce the alcoholic degree at commercial level.

Key words

Lachancea thermotolerans, *Saccharomyces cerevisiae*, lactic acid, ethanol, individual fermentation, sequential fermentation.



ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Fermentació Alcohòlica	2
1.2. Fermentació malolàctica	3
1.3. <i>Lachancea thermotolerans</i>	4
1.4. Inoculació dels llevats	4
2. OBJECTIUS	6
3. MATERIALS I MÈTODES	6
3.1. Soques utilitzades	7
3.2. Medis de cultiu utilitzats	7
3.2.1. Medi YPD (líquid i sòlid)	7
3.2.2. Medi WLN (Wallerstein)	7
3.3. Fermentacions amb <i>Lachancea thermotolerans</i>	8
3.3.1. Inoculació	8
3.3.2. Seguiment de la fermentació alcohòlica	8
3.4. IDENTIFICACIÓ DELS LLEVATS A NIVELL DE ESPÈCIE	9
3.5. Anàlisi químics	10
3.6. Anàlisi dels resultats	11
4. RESULTATS	12
4.1. Fermentacions individuals	12
4.2. FERMENTACIONS SEQÜENCIALS	15
5. DISCUSSIÓ	20
6. CONCLUSIONS I PERSPECTIVES	23
7. BIBLIOGRAFIA	24
8. ANNEXOS	28
Annex 1	28
Annex 2	29
Fermentacions individuals – dades complementàries	29
Fermentació seqüencial – dades complementàries	30
Annex 3	30
Annex 4	32



1. INTRODUCCIÓ

El món del vi està evolucionant, tant des del punt de vista de la seva elaboració, principalment a causa dels efectes del canvi climàtic, com des del punt de vista comercial, ja que el mercat ha d'anar-se adaptant al consumidor i satisfer les seves preferències (Fleet, 2008).

Els cultius de raïm en climes càlids donen vins amb molt de cos i amb sabors de maduració, tot i que la concentració de sucres elevada dels mostos pot esdevenir en una concentració elevada d'etanol. Aquesta alta graduació alcohòlica pot contribuir a minvar la qualitat dels vins i disminuir la intensitat aromàtica i gustativa. A més a més, els problemes de salut relacionats amb l'alcohol i les recomanacions dels organismes encarregats de la salut pública, obliguen cada vegada més a reconduir els vins per tal de disminuir el contingut alcohòlic (Contreras *et al.*, 2013). Per últim, els vins amb alts nivells d'etanol poden plantejar problemes econòmics, ja que alguns països estan obligats a aplicar impostos que augmenten de forma considerable el preu final del producte (Gil *et al.*, 2013; Contreras *et al.*, 2013).

El canvi climàtic és un factor que ha contribuït directament a l'augment del grau alcohòlic dels vins. Aquest fet s'explica ja que la temperatura s'ha incrementat de forma global, es parla d'un augment d'1'26°C entre els anys 1950 i 1999 i es preveu que a la llarga pugi fins als 2'04°C cap al 2050 (Nadal, 2014). Aquest augment de temperatura afecta l'evapotranspiració de la planta i la maduració de la mateixa, que s'accelera i com a conseqüència, el contingut en etanol dels vins serà més elevat. Aquest augment en el grau alcohòlic del vi pot generar conseqüències poc beneficioses per la salut humana, a part d'alterar alguns components aromàtics del mateix vi. (Fleet, 2008)

Des del punt de vista enològic, hi ha diferents estratègies que es poden aplicar per reduir el grau alcohòlic, a part d'aplicar variacions i millores en el procés que envolta la fermentació vínica. Per exemple, la creació de diferents varietats de raïms amb un contingut de sucre baix en les baies gràcies al encreuament de diferents varietats de *Vitis vinífera*, així com les plantacions en alçada i collir abans el raïm. (Aguera *et al.*, 2010). D'altra banda, des d'un punt de vista microbiològic, una possible estratègia és la utilització de diferents tipus de llevats, especialment llevats no-*Saccharomyces* (no-Sc), híbrids o llevats modificats genèticament (Fleet, 2008) .

Dintre d'aquesta última opció, està l'obtenció de llevats modificats genèticament que puguin disminuir la concentració d'etanol. La utilització d'organismes modificats genèticament (GMO) segueix sent un tema de debat i que crea certa controvèrsia. A més a més, cal destacar que a Europa no està permesa la utilització de GMO, i per tant, part de la investigació enològica s'està



concentrant en la obtenció de soques modificades genèticament però amb mètodes clàssics, considerats no-gmo, com la hibridació, mutagènesis espontània o l'adaptació evolutiva (Gonzalez *et al.*, 2013). Una altra estratègia és la utilització de llevats no-convencionals, és a dir, llevats no-*Saccharomyces* que puguin reduir el grau alcohòlic, millorar el perfil organolèptic i aportar més complexitat organolèptica en els vins en comparació amb les fermentacions on únicament s'utilitza *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet, 2008). Aquesta última estratègia és en la que es basa el present estudi.

Malauradament, la majoria d'aquests llevats no-*Saccharomyces* no poden realitzar la fermentació completa, per la qual cosa, s'acostumen a utilitzar conjuntament amb alguna soca de *Saccharomyces*, en forma de coinoculació o fermentació seqüencial. Encara que són molts els paràmetres que s'haurien de comprovar pel que fa al vi final produït sota les condicions anteriorment esmentades, existeix un ampli ventall ben documentat de components aromàtics que s'originen gràcies a llevats no-*Saccharomyces* (revisat recentment per Borren and Tian, 2021). Segons els interessos enològics es podria utilitzar un tipus d'espècie diferent per produir el vi (Jolly, 2014).

1.1. FERMENTACIÓ ALCOHÒLICA

Quan s'elabora un vi, el procés més significatiu és la fermentació alcohòlica. En aquest procés són els llevats que es troben en el raïm, o bé els que s'inoculen, els que s'encarreguen de metabolitzar els sucres i altres components que es troben en el most en diferents productes volàtils i no volàtils que determinen i afecten les característiques organolèptiques i químiques finals del vi. L'etanol no és un compost que tingui com a funció principal l'aportació de sabor o d'aroma, però intervé en l'augment del cos del vi i en la seva dolçor. D'altra banda, són els àcids orgànics, èsters i alcohols superiors els que determinen els aromes i sabors finals. Els organismes no-*Saccharomyces* es vinculen de forma estreta a la producció d'enzims capaços de metabolitzar diversos precursors aromàtics del most millorant les condicions aromàtiques dels vins (Romano *et al.*, 2003).

Durant una fermentació espontània, quan comença la fermentació i el contingut alcohòlic és baix, en el most es troben majoritàriament espècies de llevats no-*Saccharomyces*, que, a mesura que avança aquest procés, seran substituïts per llevats del gènere *Saccharomyces*, principalment per *S. cerevisiae*, ja que tenen major capacitat fermentativa i poden tolerar un nivell d'etanol més elevat (Fleet, 2003).

En l'actualitat una gran part de la producció de vi es fonamenta en la inoculació de soques de *S. cerevisiae* amb elevada capacitat fermentativa i que consumeixen tots els sucres, per tal de tenir



un major control del procés i obtenir productes de qualitat i reproduïbles (Erten *et al.*, 2006). Per realitzar la fermentació alcohòlica hi ha un ampli ventall d'opcions pel que fa a la selecció de llevats segons quin sigui l'interès. Per triar aquests llevats es poden establir uns criteris de selecció segons el propòsit d'elaboració del vi final. Alguns dels factors determinants que es tenen en compte a l'hora de la selecció són la cinètica dels llevats, el rendiment de l'etanol, la capacitat fermentativa, la producció d'èsters, la temperatura, etc. (Torija *et al.*, 2003).

D'altra banda, sabem que anteriorment i durant un període molt llarg de temps, les fermentacions en el vi sorgien de forma natural sense ser les persones conscients dels microorganismes que participaven en aquest procediment. *S. cerevisiae* ha estat el llevat al que més protagonisme se'l ha donat per dur a terme la fermentació alcohòlica, pels motius esmentats anteriorment i perquè ens assegurem un major control de la fermentació. Tot i que *S. cerevisiae* presenta moltes avantatges per la vinificació dels vins, la seva inoculació també presenta alguns inconvenients, com per exemple, la homogeneïtzació dels vins, ja que no deixem marge a que els llevats autòctons puguin actuar al llarg de forma natural en l'elaboració dels vins, obtenint d'aquesta manera productes molt similars entre ells. Per millorar la complexitat dels vins la inoculació de no-*Saccharomyces* ens aporta diferents avantatges, com per exemple un major nombre de metabòlits secundaris i precursors aromàtics, entre d'altres (Borren and Tian, 2021).

1.2. FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA

La fermentació malolàctica (FML) es basa en una senzilla reacció que consisteix en una descarboxilació enzimàtica de l'àcid L-màlic a l'àcid L-Làctic. Aquesta fermentació té lloc al final de la fermentació alcohòlica, tot i que de vegades es pot produir una mica abans. Aquesta reacció, pot influir de forma significativa en la complexitat aromàtica i gustativa del vi, augmentant les notes mantegoses i afruitades al mateix temps que redueix altres aromes més herbacis. Habitualment aquesta fermentació es du a terme en vins negres, o bé en vins blancs molt àcids, i és portada a terme pels bacteris làctics, principalment *Oenococcus oeni* (Liu, 2002).

L'àcid màlic es troba implicat en diferents cicles metabòlics respiratoris que contribueixen a la maduració de les baies dels raïms. És per aquest motiu que a les zones fredes aquest es degrada a un ritme més lent que no pas a les càlides. La quantitat d'aquest àcid al moment de recollir el raïm per fer vi és important, ja que una concentració excessivament baixa o elevada pot esdevenir en problemes gustatius en el vi. Un dels principals motius per dur a terme la FML en els vins va ser la importància de controlar la quantitat d'àcid màlic, ja que aquesta pot arribar a causar inestabilitat en els vins (Su *et al.*, 2014).



1.3. *LACHANCEA THERMOTOLERANS*

En els darrers anys, els llevats no-*Saccharomyces* han anat adquirint un paper més important en les fermentacions del vi, ja que les espècies de *Saccharomyces* han estat de forma tradicional les principals implicades en les fermentacions de vins i altres begudes alcohòliques.

El gènere *Lachancea* va ser anomenat inicialment per Kurtzman al 2003, actualment engloba 11 espècies vàlides: *L. thermotolerans*, *L. quebecensis*, *L. waltii*, *L. dasiensis*, *L. nothofagi*, *L. meyersii*, *L. lazaretensis*, *L. kluyveri*, *L. fermentati*, *L. cidri* i *L. mirantina*. (Friedrich *et al.*, 2012).

Fins a l'actualitat únicament tres espècies del gènere *Lachancea* han estat associades a processos enològics: *L. thermotolerans*, *L. fermentati* i *L. lanzarotensis*. Aquest gènere està relacionat també amb una millora del perfil organolèptic del vi final (Porter, Divol and Setati, 2019).

Lachancea thermotolerans, abans conegut com a *Kluyveromyces thermotolerans*, s'ha estudiat per la seva capacitat de disminuir el pH mitjançant la producció d'àcid làctic. De fet, el gènere *Lachancea* és únic per la seva capacitat de produir àcid làctic a partir dels sucres, i que gràcies a aquest fet pot millorar tant les propietats aromàtiques com gustatives dels vins (Domizio *et al.*, 2016). Cal remarcar que *L. thermotolerans* és la única espècie de *Lachancea* que es comercialitza actualment pel seu ús en la indústria vínica. (Porter *et al.*, 2019)

Una de les seves característiques principals és la seva elevada capacitat de produir àcid làctic fermentant la glucosa, reduint així el rendiment d'etanol. A més a més, és capaç de controlar l'acidesa volàtil i millorar el sabor final del vi, motiu pel qual se'l considera un bon llevat per realitzar fermentacions seqüencials amb *Saccharomyces* ja que algunes de les soques de *L. thermotolerans* en diferents mosts de raïm negre o blanc no aconsegueixen finalitzar la fermentació i es paren en densitats més elevades i amb presència de sucres residuals (Su *et al.*, 2014; Porter, Divol and Setati, 2019).

1.4. INOCULACIÓ DELS LLEVATS

Tot i que les fermentacions es poden realitzar de forma espontània, en l'actualitat la major part de producció de vins es fa mitjançant la inoculació dels llevats per tal de conduir la fermentació. Com hem comentat anteriorment, la forma més habitual és la inoculació d'una soca de *S. cerevisiae*, però actualment, cada vegada més es tendeix a la utilització de més soques, per afegir complexitat al vi final.

D'entrada, val a dir que la inoculació de llevats no-*Saccharomyces* amb *Saccharomyces* es pot dur a terme de dues formes diferents, coinoculació i inoculació seqüencial. Pel que fa a la coinoculació, és una tècnica que consisteix en inocular els dos tipus de llevats en el mateix moment del procés fermentatiu, és a dir, a l'inici de la fermentació, encara que es pot jugar amb les



proporcions de llevats, ficant més quantitat del llevat no-*Saccharomyces* per tal d'afavorir i perllongar la seva presència a la fermentació. D'altra banda, en la inoculació seqüencial el llevat no-*Saccharomyces* s'inocula a l'inici de la fermentació i a les 24-48 h s'inocula la soca de *S. cerevisiae*. D'aquesta manera, s'afavoreix que el llevat no-*Saccharomyces* perduri durant més temps al procés fermentatiu i pugui deixar la seva empremta en el vi final (Raynal *et al.*, 2009).

En aquest treball, s'han dut a terme inoculacions seqüencials, ja que es volia aconseguir que les soques seleccionades de *L. thermotolerans* poguessin conduir l'inici de la fermentació i finalment afegir *S. cerevisiae* per finalitzar la fermentació i acabar de consumir la totalitat de sucres presents en el most.

Tot i que, generalment *L. thermotolerans* no té la capacitat de consumir la totalitat de sucres presents en el most, sí que és capaç d'aportar uns trets positius en el perfil sensorial del vi. (Porter, Divol and Setati, 2019).

La capacitat de generar àcid làctic pot ser diferent segons la soca que s'utilitza, les condicions fermentatives (tipus de most i varietat de raïm) i la persistència de *L. thermotolerans* al moment de la inoculació de les *Saccharomyces*. Finalment, val a dir que els paràmetres i les condicions de fermentació no són constants en els diversos informes i resulta complicat concloure amb el veritable impacte que té *L. thermotolerans* en la qualitat del vi (Porter, Divol and Setati, 2019).



2. OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest treball era seleccionar alguna soca de l'espècie *Lachancea thermotolerans* que pugui reduir el grau alcohòlic del vi, degut a la seva capacitat de produir àcid làctic a partir dels sucres. Per això, primer es va determinar la capacitat que tenien sis soques de *L. thermotolerans* per sintetitzar àcid làctic i reduir la concentració final d'etanol en fermentacions individuals en comparació a una soca control de *S. cerevisiae*.

Posteriorment, es van seleccionar les soques de *L. thermotolerans* que havien sintetitzat una major quantitat d'àcid làctic i menys etanol i es van provar en fermentació seqüencial amb *S. cerevisiae* per tal d'avaluar l'efecte que tenen sobre la soca de *S. cerevisiae*, així com sobre el vi final en comparació amb la fermentació realitzada per la soca de *S. cerevisiae* de forma individual.

3. MATERIALS I MÈTODES

Per dur a terme aquest estudi es va utilitzar most natural de raïm blanc de la varietat moscatell de diferents anyades (2019 i 2020) proporcionat per la Finca Mas dels Frares. Abans de començar les fermentacions es van fer les caracteritzacions dels mateixos.

Els paràmetres que es van mesurar van ser els següents:

- Anyada 2019: most utilitzat en les fermentacions individuals.
 - GAP: 13°
 - Densitat inicial: 1090'1 g/l
 - Concentració de N: 77'5 mg/l
- Anyada 2020: most utilitzat en la fermentació seqüencial.
 - GAP: 11°
 - Densitat inicial: 1079,3 g/l
 - Concentració de N: 89'6 mg/l

Utilitzant els següents instruments:

- Densímetre electrònic (Mettler Toledo) i taula de conversió (densitat i GAP)
- pHmetre
- Multianalitzador automàtic Y15 Biosystems (amoni i aminoàcids)



La quantitat inicial de nitrogen es va fixar a uns 200 mgN/l. Per tant, primer es va calcular la concentració de nitrogen del mostos naturals per l'índex de Formol (Annex 1). Com els mostos de moscatell tenien menys nitrogen, es va afegir una solució de fosfat diamònic (DAP) per tal d'assolir-la. La quantitat calculada s'afegia al fermentador en esterilitat al mateix moment que es duia a terme la inoculació del most.

Per tal d'esterilitzar el most i assegurar que no hi hagués cap microorganisme que pogués afectar el procés de fermentació, unes 48 hores abans de la inoculació es va afegir dimetil carbonat en una concentració de l'1% a la garrafa del most natural. Com la garrafa de most era de 5 litres, es van afegir 5 ml d'aquest compost.

3.1. SOQUES UTILITZADES

S'han estudiat un total de sis soques diferents de *L. thermotolerans*: Lt1 (Agrovin S.A.), Lt2 (Agrovin S.A.), LtCW78 (de la col·lecció ICVV de Logronyo, ICVV1331), LtCW79 (ICVV1132), LtCW80 (ICVV1133) i LtCW81 (Agrovin S.A.).

I s'ha utilitzat una soca de *S. cerevisiae* (Lalvin-QA23, Lallemand, Canadà) com a control (Annex 4).

3.2. MEDIS DE CULTIU UTILITZATS

3.2.1. Medi YPD (líquid i sòlid)

Per preparar els precultius del llevats *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae*, es va fer servir el medi ric YPD (10% *Yeast Extract*, 20% (p/v) *Peptone*, 20% p/v) *Glucose* (p/v) Panreac, Química SLU, Barcelona, Spain).

Per fer el seguiment de la població viable de llevats al llarg de la fermentació es va fer servir aquest mateix medi en estat sòlid, afegint 17 g/l d'agar-agar (agent gelificant).

3.2.2. Medi WLN (Wallerstein)

Per tal de diferenciar les colònies de *L. thermotolerans*, (tenen una coloració verda (diferents tonalitats segons la soca)) i les colònies de *S. cerevisiae* (colònies color blanc) es va utilitzar el medi diferencial WLN, tal com es pot observar a les figures 8 i 9 dels annexos.

Per preparar aquest medi, únicament s'ha de diluir 80g de WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient Agar (WL) medium (Difco; USA)) en un litre d'aigua destil·lada i després autoclavar-lo.



3.3. FERMENTACIONS AMB *LACHANCEA THERMOTOLERANS*

Per tal d'avaluar el comportament fermentatiu de les sis soques de *L. thermotolerans*, es van realitzar dos tipus de fermentacions:

- Fermentacions individuals en les quals només s'inoculava una de les soques de *L. thermotolerans* i es comparava amb una soca control de *S. cerevisiae* (Lalvin-QA23). Totes les fermentacions es van fer per triplicat.
- Fermentacions seqüencials en les quals s'inoculava primerament una de les soques seleccionades de *L. thermotolerans* i a les 48 hores aproximadament, quan la densitat baixava uns 10 punts, s'inoculava la soca de *S. cerevisiae* sense suplementar el most amb nitrogen. Es va utilitzar com a control la fermentació individual de la soca de *S. cerevisiae*. Totes les fermentacions es van fer per triplicat.

3.3.1. Inoculació

Per dur a terme les fermentacions individuals es van utilitzar fermentadors (ampolles de 250 ml) on es van repartir 240 ml de most natural a temperatura ambient. Tot el material utilitzat per la inoculació havia de ser esterilitzat prèviament. En cada fermentador es van inocular individualment, i per triplicat, les soques de Lt. i Sc. a raó de 2×10^6 cèl/ml.

Per afegir la quantitat adient de cultiu al fermentador per tenir la concentració de població desitjada, primer es va realitzar un recompte de cèl·lules en la càmera de Neubauer (Figura 10) dels precultius en YPD. Una vegada calculada la població als precultius, es va calcular el volum a afegir al fermentador. Seguidament, s'havia de prendre el punt de partida de la fermentació.

Finalment, es deixaven els fermentadors a l'agitador a 120 rpm a una temperatura al voltant dels 28°C.

Pel que fa a les inoculacions seqüencials, el procediment va ser el mateix. Primer s'inoculava la soca de Lt. seleccionada d'entre les sis analitzades amb la mateixa concentració de població inicial que en les fermentacions individuals i, aproximadament 48 hores després, quan la densitat baixava uns 10 punts, s'afegia la soca de Sc. a raó de 2×10^6 cèl/ml. sense fer cap mena d'aportació de nitrogen.

3.3.2. Seguiment de la fermentació alcohòlica

En totes les fermentacions, es prenia mostra cada 24 hores per monitoritzar la fermentació (densitat i OD) fins a que la densitat s'estancava durant dos dies seguits o era inferior a 990 g/l. Al final del procés, es va determinar la producció d'àcid làctic, etanol així com, la quantitat de sucres residuals (glucosa i fructosa).



Per prendre les mostres, s'agitaven els fermentadors per re-suspendre el llevat que quedava al fons, s'agafaven 6 ml amb xeringues estèrils i es passava la mostra a uns tubs. D'aquests tubs es separaven 100µl en Eppendorfs per tal de fer dilucions seriades per sembrar cadascuna de les mostres en dos medis sòlids diferents: WLN i YPD.

Per fer aquestes dilucions i que el creixement de població en placa fos comptable, prèviament es mesurava la densitat òptica de les mostres (OD) a 600nm en l'espectrofotòmetre Ultrospec 2100pro. Si les mostres donaven un valor fora de rang (superior a 1,000 o pels voltants d'aquesta quantitat), era necessari fer una dilució.

La resta de volum es centrifugava per tal de separar el sobrenedant del pellet. Del sobrenedant es separava 1 ml en Eppendorfs (per la posterior anàlisi cromatogràfica i es guardava al congelador) i la quantitat restant s'usava per mesurar la densitat amb el densímetre electrònic.

3.4. IDENTIFICACIÓ DELS LLEVATS A NIVELL DE ESPÈCIE

Per determinar la implantació de l'espècie inoculada en el most, és a dir *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae*, es va utilitzar la tècnica de RFLP-PCR del ADN ribosomal, la qual consisteix en l'amplificació d'una zona del rDNA dels llevats, més concretament, la zona 5'8S-ITS i la posterior digestió amb enzims de restricció (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Encara que, en el nostre cas, per diferenciar les dues espècies utilitzades era suficient amb fer només l'amplificació, ja que se sap que *S. cerevisiae* té un amplificat de 880pb (parells de bases) i *L. thermotolerans* de 700pb, per tant ja es poden diferenciar sense fer la digestió posterior.

Per realitzar aquest procediment es necessiten els següents reactius (Taula 1):

Taula 1. Reactius PCR

<i>Ingredient</i>	<i>Quantitat</i>
<i>Aigua MiliQ</i>	38,5µl
<i>Taq10</i>	5 µl
<i>MgCl₂</i>	3 µl
<i>ITS1</i>	1 µl
<i>ITS4</i>	1 µl
<i>dNTP's</i>	1 µl
<i>Taq polimerasa</i>	0,5 µl



El programa de PCR consta de tres etapes: desnaturalització, hibridació i polimerització, cadascuna d'elles es du a terme a una temperatura i temps determinats, com es pot observar a la Figura 1.

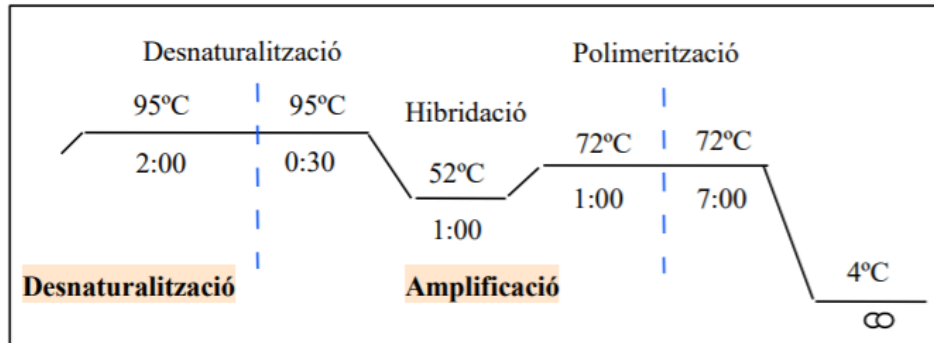


Figura 1. Programa per realitzar la PCR de la zona 5,8S-ITS de rDNA

Un cop feta l'amplificació del DNAr es va dur a terme una electroforesi en gel d'agarosa (1,5%) per poder visualitzar l'amplificat obtingut i poder identificar l'espècie de llevat que portava a terme la fermentació.

3.5. ANÀLISI QUÍMICS

Un cop finalitzades les fermentacions, tant individuals com seqüencials, es van analitzar als sobrenedants congelats dels punts finals, la concentració de sucres i àcids per HPLC, d'especial rellevància la concentració d'àcid làctic, etanol i sucres residuals (glucosa i fructosa).

Per dur a terme aquest procediment es van preparar les mostres per passar-les per l'HPLC (High Pressure Líquid Chromatography), utilitzant l'Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) (Quirós et al., 2010). La columna utilitzada va ser Hi-Plex H (300 mm × 7.7 mm) ubicada dins del compartiment termostatitzat 1260 MCT (Infinity II Multicolumn Thermostat) i connectada als detectors MWD (G1365B multiwavelength detector) i RID (1260 Infinity II refractive index detector) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). La temperatura de la columna es va mantenir a 60°C durant els 30 minuts de funcionament, i la fase mòbil va ser 5mM H₂SO₄ amb una velocitat de flux de 0.6 mL/min. El volum de les mostres injectades va ser de 10 µL. Abans de la injecció, les mostres es van filtrar a través d'un filtre de 0.22µm (Dominique Dutscher, Brumath, France). Es van utilitzar el software OpenLAB CDS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) per analitzar els resultats obtinguts.



3.6. ANÀLISI DELS RESULTATS

Per l'anàlisi de resultats finals es va comparar la mitjana i la desviació entre les diferents soques estudiades amb el programa Excel. Així mateix es va fer un anàlisi de dades per veure si hi havia diferències significatives entre les soques gràcies a l'anàlisi de variància entre mostres, per fer-ho es van dur a terme un anàlisi T-test amb una $p=0'05$.

4. RESULTATS

4.1. FERMENTACIONS INDIVIDUALS

Encara que totes les fermentacions individuals no es van poder fer al mateix moment degut al temps i material disponibles al laboratori, les hem comparat al mateix gràfic per tal de poder extreure conclusions (Figura 2)

El seguiment d'aquestes fermentacions es va fer mitjançant la mesura de densitat (Figura 2), el recompte de viables en placa YPD (Figura 3) i la OD (Figura 6 de l'Annex 2). També es va observar el creixement de cadascuna de les soques en placa de WLN.

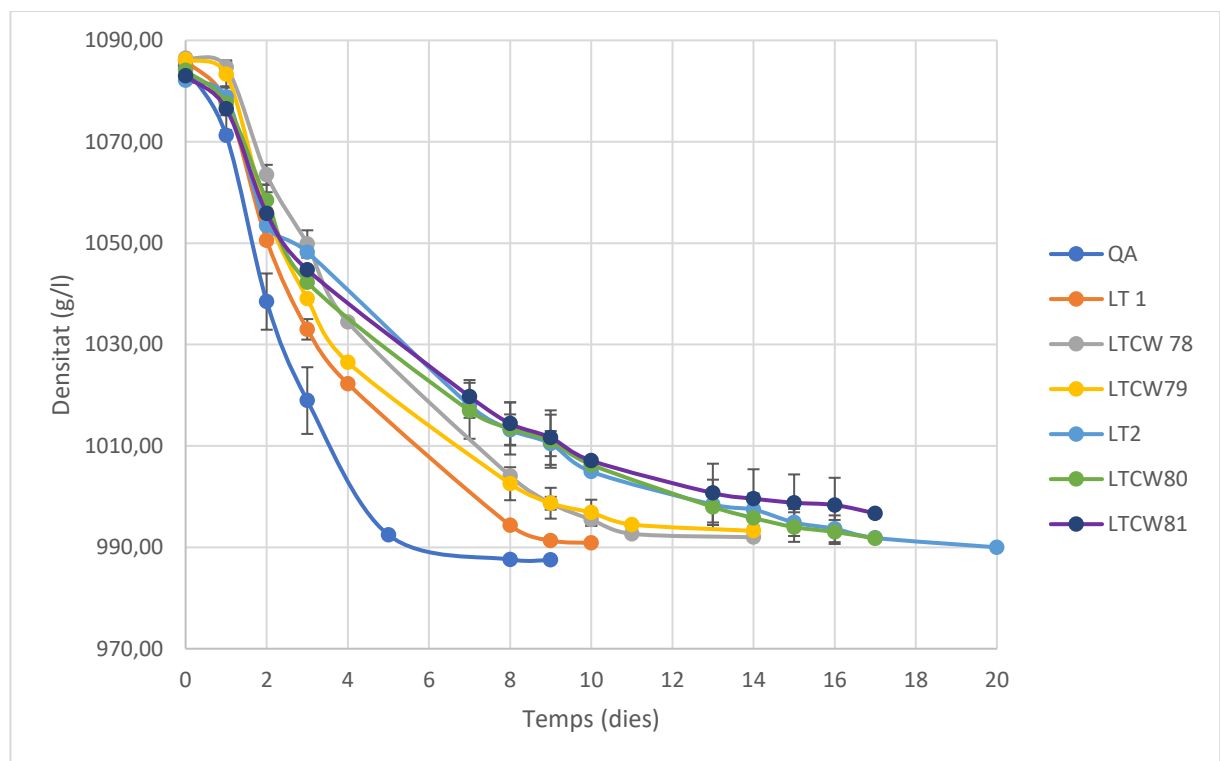


Figura 2. Seguiment de la densitat de les fermentacions individuals de les soques de *L. thermotolerans* Lt1, Lt2, LtCW78, LtCW79, LtCW80 i LtCW81 en comparació amb la soca control de *S. cerevisiae* QA23.

En aquesta primera gràfica, podem veure, com era d'esperar, que la soca de *S. cerevisiae* QA23 presenta un poder fermentatiu més elevat que les soques avaluades de *L. thermotolerans*, ja que es pot apreciar que és capaç de arribar a una densitat inferior de 990 g/l a partir del 8è dia. D'altra banda, sorprenentment gairebé totes les soques de *L. thermotolerans*, excepte LtCW81, van ser capaces de finalitzar la fermentació, necessitant entre 10 i 20 dies per acabar-la.

Les tendències fermentatives observades de les soques de *L. thermotolerans* es poden classificar en 3 grups ben diferenciats. Per una banda, ens trobem amb les soques Lt1, LtCW78 i LtCW79 les quals finalitzen les fermentacions entre 10 i 14 dies, sent la Lt1 la que té un poder fermentatiu més

semblant a la QA23. A continuació, es pot apreciar el grup format per les soques LtCW80 i Lt2 les quals acaben la fermentació transcorreguts 17 i 20 dies, respectivament, des de la inoculació. Finalment, podem observar que la soca LtCW81 és la que presenta un poder fermentatiu més baix, ja que no és capaç de concloure la fermentació perquè no consumeix la totalitat dels sucres, obtenint una densitat superior a 990 g/l en la qual es dona per finalitzada la fermentació. Per acabar, comentar que s'han eliminat les rèpliques (1) de les soques LtCW79 i LtCW81, ja que no seguien la tendència de les altres dues.

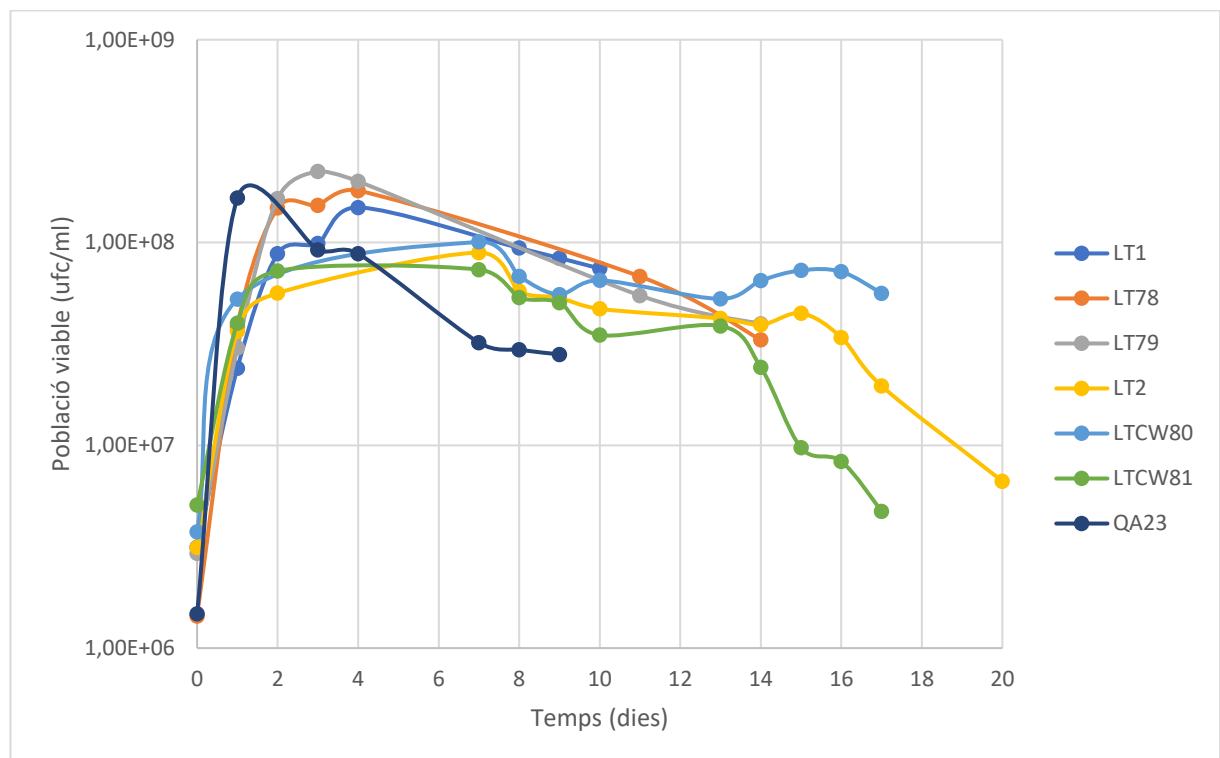


Figura 3. Seguiment de la població viable de les fermentacions individuals de les soques de *L. thermotolerans* Lt1, Lt2, LtCW78, LtCW79, LtCW80 i LtCW81 respecte a la soca control de *S. cerevisiae* QA23.

En la Figura 3 es pot apreciar com la soca QA23 de *S. cerevisiae* assoleix el seu màxim de població viable transcorregut un dia des de la seva inoculació.

De la mateixa manera que en la Figura 2 es poden veure clarament els diferents comportaments que presenten les soques de *L. thermotolerans* avaluades. Per una banda ens trobem amb les soques LtCW78 i LtCW79 que presenten un creixement més similar al de la QA23 i fins i tot assoleixen una població més elevada a partir del segon dia. D'altra banda, la soca Lt1 tot i que presenta un creixement més progressiu de la població, aquesta té un poder fermentatiu més elevat que no pas les dues soques de *L. thermotolerans* anteriorment esmentades. Finalment, veiem que el grup format per Lt2, LtCW80 i LtCW81 assoleixen el seu màxim de població el 7é dia de la fermentació, a més a més, de tenir una població màxima viable bastant més baixa que la resta de soques i com a conseqüència un procés fermentatiu més llarg.



Taula 2. Concentració en g/l d'àcid làctic, sucres residuals, etanol , així com el valor del pH final de les fermentacions individuals de les soques de *L. thermotolerans* respecte a la soca control de *S. cerevisiae* QA23.

SOCA	ÀCID LÀCTIC (g/l)	SUCRES (g/l)	ETANOL (%v/v)	pH
QA23	0,07 ± 0,08 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	12,77 ± 0,07 ^e	3,31 ± 0,08 ^e
Lt1	0,32 ± 0,24 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	12,18 ± 0,13 ^c	3,38 ± 0,03 ^f
LtCW78	1,71 ± 0,56 ^c	0,00 ± 0,00 ^a	12,30 ± 0,34 ^d	3,25 ± 0,04 ^c
LtCW79	1,36 ± 0,26 ^c	0,00 ± 0,00 ^a	12,08 ± 0,30 ^c	3,25 ± 0,02 ^b
Lt2	2,80 ± 0,44 ^d	0,35 ± 3,66 ^b	11,96 ± 0,17 ^b	3,27 ± 0,02 ^d
LtCW80	0,52 ± 0,30 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	12,05 ± 0,24 ^c	3,43 ± 0,02 ^g
LtCW81	4,53 ± 2,00 ^e	5,86 ± 6,13 ^c	11,35 ± 0,47 ^a	3,23 ± 0,10 ^a

S'ha aplicat el T-test amb la finalitat de determinar si hi han diferències significatives entre els resultats. Les lletres indiquen si existeixen diferències significatives entre les soques.

A partir dels resultats que es mostren en la Taula 2, es poden seleccionar aquelles soques amb una síntesi més elevada d'àcid làctic a partir dels sucres presents en el most i una menor producció d'etanol en el vi final.

Si comparem totes les soques respecte la soca control (QA23) veiem que les soques avaluades de *L. thermotolerans* van donar un perfil bastant diferenciat en relació a aquests dos paràmetres (àcid làctic i etanol) amb la soca de *S. cerevisiae*.

Primer, ens fixarem en l'àcid làctic, un dels paràmetres que més ens interessa, ja que com s'ha dit anteriorment una part d'ell es forma a partir dels sucres que *L. thermotolerans* es capaç de metabolitzar. Aquest paràmetre presenta diferències significatives entre les diferents soques i el control. A més, les soques LtCW78 i LtCW79 i les soques Lt1 i LtCW80 produeixen un contingut similar d'aquest àcid.

Respecte la soca QA23, que només sintetitza 0'07 g/l d'àcid làctic, es pot veure que les soques Lt1 i LtCW80 incrementen moderadament la concentració d'aquest àcid, obtenint 0'32 i 0'52 g/l respectivament. Seguidament, les soques LtCW78 i LtCW79 produeixen una quantitat superior a les anteriors arribant a una concentració final de 1'71 i 1'36 g/l d'àcid làctic, respectivament. Finalment, les soques que aconseguen produir una major quantitat d'àcid làctic són Lt2 amb una concentració final de 2'8 g/l i LtCW81 amb una concentració d'uns 4,5 g/l.

Pel que fa als sucres, podem apreciar que tant la QA23 com totes les soques de *L. thermotolerans* avaluades, menys Lt2 i LtCW81, aconseguen consumir completament els sucres.



En relació a l'etanol, l'altre paràmetre amb més interès per l'estudi, es pot observar una disminució significativa d'aquest paràmetre en totes les soques de *L. thermotolerans* respecte a la soca control, reduint-se en mitjana entre 0,4 i 1,3% (v/v). Les soques que més han reduït el grau alcohòlic al vi final han estat les soques LtCW81 i Lt2. En el cas de la soca LtCW81 encara que no havia consumit tots els sucres (quedaven menys de 6 g/l), el consum d'aquest grams no augmentaria significativament el grau, i continuaria estant entre les que més han reduït el contingut d'etanol. Una altra dada interessant, és que entre les soques de *L. thermotolerans* també hi ha diferències significatives a nivell de contingut d'etanol, exceptuant Lt1, LtCW79 i LtCW80 que presenten nivells d'etanol molt similars. En el cas de Lt1 i LtCW80 és normal ja que també sintetitzaven els mateixos nivells d'àcid làctic.

Per acabar, podem dir que al pH, tal i com era d'esperar, pràcticament totes les soques de *L. thermotolerans* van presentar pHs significativament més baixos que la soca control. Només les soques Lt1 i LtCW80 van presentar pHs més alts que la soca control, coincidint amb què van ser les soques que van sintetitzar menys àcid làctic.

4.2. FERMENTACIONS SEQÜENCIALS

Una vegada acabades les fermentacions individuals, es van seleccionar dues soques segons les seves capacitats fermentatives, la quantitat d'etanol i la síntesi d'àcid làctic final per a realitzar les fermentacions seqüencials. Fent una valoració de tots els resultats obtinguts, es va decidir utilitzar les soques Lt2 i LtCW81 degut que van ser les que produïen més àcid làctic i reduïen la concentració d'etanol final.

Primer es va realitzar la inoculació de les soques de *L. thermotolerans* escollides, transcorregudes 48h, la densitat del most no havia disminuït fins al valor esperat, per la qual cosa, es va esperar fins que la densitat va baixar deu 10 punts per inocular la soca de *S. cerevisiae* per tal d'assegurar que la fermentació pogués estar conduïda per ambdues soques, fins que inevitablement al final de la fermentació *S. cerevisiae* s'imposés respecte *L. thermotolerans*.

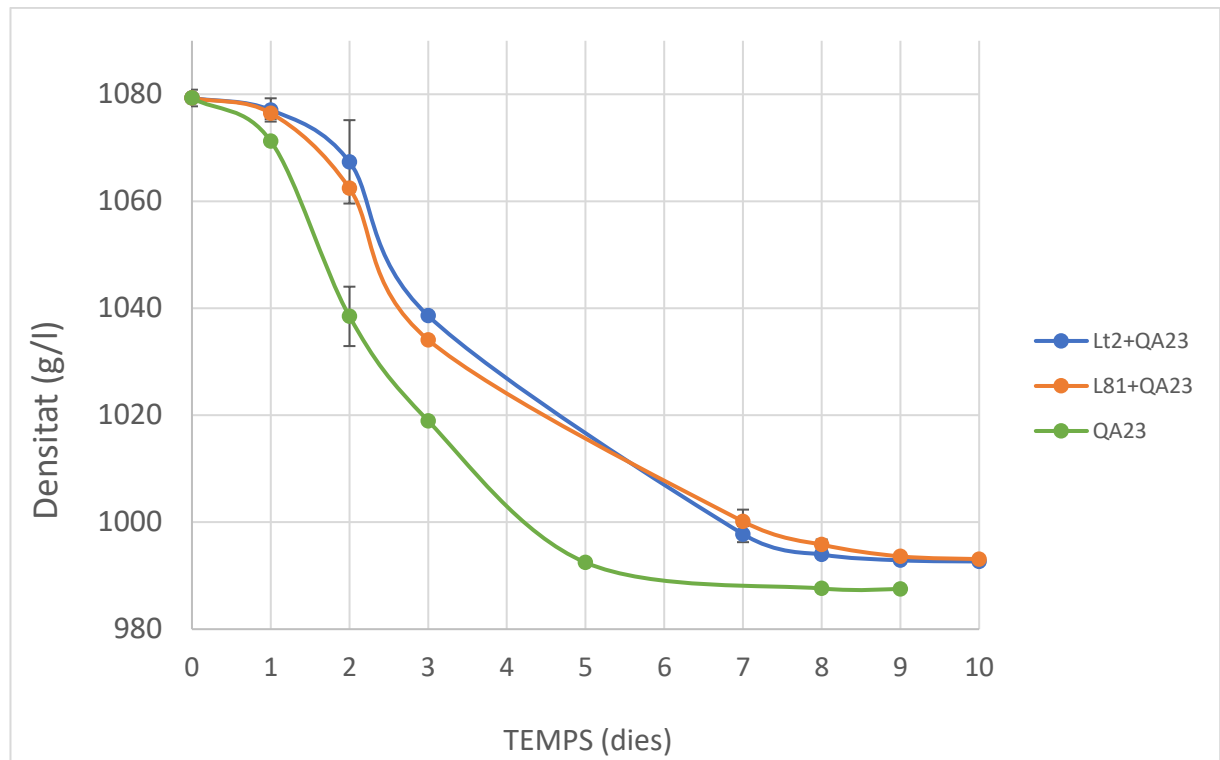


Figura 4. Seguiment de la densitat de la fermentació seqüencial de les soques Lt2 i LtCW81 amb la soca de *S. cerevisiae* QA23 en comparació a la fermentació individual de la soca control QA23.

En la Figura 4 veiem que la fermentació seqüencial utilitzant les soques de *L. thermotolerans* seleccionades presenta un comportament molt similar a la fermentació de la soca control QA23. Cal destacar, que en les fermentacions seqüencials, la disminució de la densitat és més lenta, tardant un total de 10 dies en finalitzar la fermentació en comparació als 8 dies que tarda la soca control. Tot i que, en la Figura 4 es mostren dades fins del dia 9 la densitat es va parar el dia anterior.

Els primers dies, la densitat disminueix molt lentament en les fermentacions seqüencials, degut que *L. thermotolerans* consumeix els sucres més poc a poc que no pas la soca de *S. cerevisiae*. Es veu que en inocular la soca QA23 la densitat baixa molt ràpidament, fins arribar al final de la fermentació.

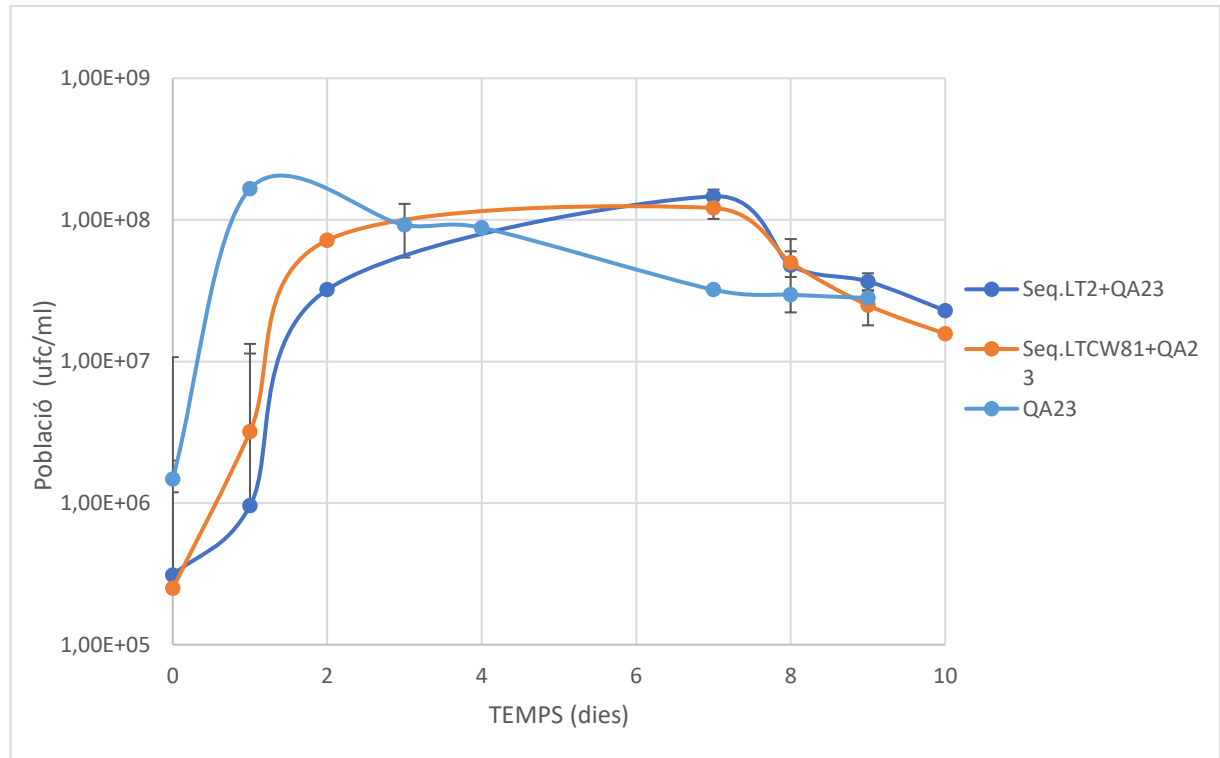


Figura 5. Seguiment de la població viable de la fermentació seqüencial de les soques Lt2 i LtCW81 amb la soca de *S. cerevisiae* QA23 en comparació a la fermentació individual de la soca control QA23.

Com es pot apreciar en la Figura 5, tant les fermentacions seqüencials com la fermentació individual de la soca control de *S. cerevisiae* presenten una població molt semblant al llarg de la fermentació alcohòlica, tal i com passava amb la densitat en la Figura 4. La diferència més marcada és durant els primers dies ja que en la soca control QA23 la població assoleix el seu màxim en tan sols 24h, i en canvi, en les fermentacions seqüencials, l'augment de població és més lent (també la viabilitat inicial) ja que en un inici només tenim les soques de *L. thermotolerans*, les quals presenten una menor capacitat de creixement respecte a la soca de *S. cerevisiae*, fet que també influeix en que les fermentacions seqüencials finalitzin un dia més tard que la anterior.



Taula 3. Concentració en g/l de sucres residuals, etanol i àcid làctic i pH de les fermentacions seqüencials en comparació amb la fermentació control de QA23

SOCA	ÀCID LÀCTIC (g/l)	SUCRES (g/l)	ETANOL (%vol.)	pH
QA23	0,013	0,00	10,91	3,09
Lt2 + QA23	2,17 ± 1,30 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	9,83 ± 0,43 ^a	2,96 ± 0,05 ^b
LtCW81 + QA23	3,02 ± 1,02 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	10,33 ± 0,89 ^b	2,92 ± 0,09 ^a

S'ha aplicat el T-test amb la finalitat de determinar si hi han diferències significatives entre els resultats. Les lletres indiquen si existeixen diferències significatives entre les soques.

Taula 4. Percentatge de població viable de la soca de *S. cerevisiae* QA23 en les fermentacions seqüencials.

	DIA 3	DIA 4	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10
Seq. Lt2	4,42%	3,98%	9,36%	39,87%	54,05%	80,02%
Seq. LtCW81	2,43%	2,21%	22,61%	30,48%	51,47%	95,78%

En les fermentacions seqüencials es va utilitzar un most d'una anyada posterior, amb menys sucres inicials i per tant amb un valor de GAP inferior (al voltants de 11%).

Pel que fa a la Taula 4, podem veure els resultats finals de les fermentacions seqüencials. Comentar que només es va fer l'anàlisi d'una sola replica de la soca control, per tant aquesta no presenta ni mitjana ni desviació.

També es pot observar que en les dues fermentacions seqüencials s'aconsegueix un increment de l'àcid làctic així com una disminució en la quantitat d'etanol final i que ambdues aconseguixen consumir la totalitat dels sucres.

En relació a la fermentació seqüencial de Lt2 veiem que tot i que presenta una concentració final d'àcid làctic inferior a la fermentació seqüencial amb LtCW81, sent 2'17 i 3'02 g/l, respectivament, aquesta assoleix un grau alcohòlic inferior, sent en aquest cas de 9'83 % respecte a 10'33 % amb el que finalitza LtCW81.

Si es comparen els resultats de les fermentacions seqüencials de les soques de Lt2 i LtCW81 amb la fermentació individual de QA23 es pot veure com el grau alcohòlic és inferior a les fermentacions seqüencials, tenint una reducció d'entre 0,5 i 1%.

També es va mesurar el pH tant en el most (3,17) com a final de fermentació (Taula 4) i es va comprovar que en les fermentacions seqüencials era inferior a la fermentació control i al most inicial, el qual fa sospitar que aquest vi final té una acidesa més marcada que no pas els vins de les fermentacions anteriors.



A banda, es va estudiar el percentatge d'imposició de la soca QA23 a partir del 3er dia de fermentació mitjançant el creixement en plaques WLN (Taula 5). Es pot veure, com poc a poc, es va imposant la soca QA23, tot i que no és fins al penúltim dia de la fermentació que s'imposa definitivament. Per tant, es pot dir que bona part de la fermentació ha estat portada per les soques dels llevats no-*Saccharomyces* i, més concretament, per la soca de *L. thermotolerans*. Això queda reflectit als paràmetres finals tant pel que fa a la quantitat d'etanol com a la concentració d'àcid làctic finals.

Finalment, remarcar que no es va fer adició de nutrients en aquesta fermentació, fet que probablement explica el temps que li costa imposar-se a la soca de *S. cerevisiae*.



5. DISCUSSIÓ

En aquest treball s'ha fet un estudi de la capacitat fermentativa de sis soques de *L. thermotolerans* i s'ha estudiat la possibilitat d'utilitzar-les com inòculs conjuntament amb *S. cerevisiae* per reduir el grau alcohòlic, donada la seva característica de produir àcid làctic a partir de sucres. A partir d'aquest estudi, s'ha determinat que encara que totes les soques eren capaces de reduir en major o menor mesura el contingut d'etanol en el vi final, les soques Lt2 i LtCW81 eren les millors candidates per a realitzar la fermentació seqüencial amb *S. cerevisiae* per disminuir el grau alcohòlic final, ja que eren les que produïen més àcid làctic.

Encara que els valors d'àcid làctic presentaven en general desviacions estàndards elevades entre les rèpliques tant a nivell individual com seqüencial, ambdues soques presenten una concentració considerablement més elevada que les altres soques estudiades de *L. thermotolerans*. A més a més, si s'observa la quantitat d'etanol generat en la fermentació, es veu ràpidament que són les dues soques que donen un grau alcohòlic més baix, arribant a reduir més d'un grau en fermentacions individuals i entre 0.5 i 1% en fermentacions seqüencials i, en aquest cas, la desviació entre resultats és bastant assumible. D'altra banda, aquestes dues soques eren les que tenen la capacitat fermentativa més baixa, ja que algunes de les rèpliques no eren capaces de consumir tots els sucres, deixant-los de forma residual en els vins, però això tampoc és un problema, ja que el plantejament es utilitzar-les en les fermentacions seqüencials amb *S. cerevisiae*, per tant, no és necessari que siguin capaces de fermentar tots els sucres.

Un fet que ha estat evident és que en totes les fermentacions la soca control de *S. cerevisiae* donava com a resultat final un grau alcohòlic més elevat que no pas en les fermentacions amb soques de *L. thermotolerans*.

La utilització d'aquestes soques de *L. thermotolerans* inoculades de forma seqüencial amb *S. cerevisiae*, apart de reduir el grau alcohòlic, també han augmentat l'acidesa total dels vins, per tant, aquests llevats són molt recomanables per tal de millorar els vins amb una baixa acidesa deguda al canvi climàtic global.

En diferents estudis (Mora *et al.*, 1990; Ciani *et al.*, 2006; Cordero-Bueso *et al.*, 2013; Gobbi *et al.*, 2013; Mostert and Divol, 2014; Balikci *et al.*, 2016; Porter *et al.*, 2019) queda reflectit com la inoculació única de *L. thermotolerans* dona lloc a fermentacions en les quals hi ha presència de sucres residuals i concentracions més baixes d'etanol degut a la seva menor capacitat fermentativa. Això fa que sigui necessari realitzar una inoculació seqüencial o bé una coinoculació amb alguna soca de *S. cerevisiae*. Tot i que *L. thermotolerans* també es pot coinocular amb altres llevats no-



Saccharomyces amb alta capacitat de fermentació com per exemple *Schizosaccharomyces pombe* o *Torulaspora delbrueckii*. (Benito *et al.*, 2015; Escribano-Viana *et al.*, 2018).

En canvi, en aquest estudi es pot veure com gairebé totes les soques de *L. thermotolerans* són capaces d'acabar les fermentacions individuals a excepció de la soca LtCW81, tot i que alguna rèplica de les soques Lt2, LtCW79 i LtCW80 tampoc van ser capaç de consumir la totalitat dels sucres. Per tant, fins i tot es podria plantejar utilitzar-les en inoculació simple, encara que més estudis són necessaris.

En general, els estudis realitzats amb fermentacions seqüencials o coinoculades de llevats no-*Saccharomyces*, com per exemple *L. thermotolerans* i *T. delbrueckii*, esdevenen en un contingut final d'alcohol més baix (per sota del 10 % v/v) (González-Royo *et al.*, 2015; Canonico *et al.*, 2016; Domizio *et al.*, 2016; Michel *et al.*, 2016; Canonico *et al.*, 2017; Benito *et al.*, 2018). Pel que fa al nostre estudi s'observa que, pel contrari, la majoria de les soques estudiades finalitza la fermentació amb una concentració d'etanol més alta, possiblement perquè la concentració de sucres inicials del most és més alta. Tot i que, en el cas de les fermentacions seqüencials, com es va canviar el most i la quantitat de sucres era inferior, les soques inoculades amb *S. cerevisiae* van concloure la fermentació amb valors més similars als estudis anteriorment esmentats, pel voltant del 9'83 i el 10'33 % v/v.

Com ja s'ha demostrat en altres estudis (Padilla *et al.*, 2016; Benito, 2018) els llevats no-*Saccharomyces* aporten propietats durant els primers estadis fermentatius, és a dir, quan encara el grau alcohòlic es baix i no s'ha imposat la soca de *S. cerevisiae*. Per aquest motiu la soca de *S. cerevisiae* en les fermentacions seqüencials s'inoculava a les 48 h. També hauria estat interessant estudiar la producció d'àcid làctic abans d'inocular la soca de *S. cerevisiae* per veure l'efecte de la soca de *L. thermotolerans* fins aquell moment, així com retardar el moment en el que s'inocula la soca de *S. cerevisiae* per ex. a les 72 h per veure si la reducció d'etanol és més gran.

Pel que fa a les fermentacions seqüencials, podem veure com la quantitat d'etanol que es genera és inferior a la de la soca control de QA23 ja que part dels sucres els consumeix la soca de *L. thermotolerans* per a la síntesi d'àcid làctic, augmentant d'aquesta manera l'acidesa total del vi final.

Al llarg de les fermentacions, tant a les individuals com a les seqüencials, s'ha tingut en compte el creixement poblacional tant a les plaques de YPD com a les plaques WLN. Va ser una forma molt visual d'establir un control tant de la població, com dels llevats que es tenien al fermentador. Resulta interessant veure l'evolució a les plaques de WLN de les fermentacions seqüencials (Figura 11 de l'Annex 3), ja que es pot observar com a partir de la inoculació de *S. cerevisiae* aquesta es va imposant progressivament a la soca de *L. thermotolerans*, tot i que aquesta última es



mantenia fins al darrer dia de la fermentació. En l'estudi de Ciani *et al.*, 2006 es va comprovar que algunes poblacions de llevats no-*Saccharomyces* són capaces de mantenir la seva viabilitat fins al final de la fermentació tot i comptar amb la presència d'altres llevats. Un fet inesperat va ser la imposició excessivament lenta dels llevats *S. cerevisiae*, ja que no va ser fins al darrer dia de la fermentació que van aconseguir imposar-se totalment respecte a la soca de *L. thermotolerans*. Això es podria explicar amb el fet que no es van afegir nutrients quan es va inocular *S. cerevisiae* i per tant, la soca QA23 es va trobar amb un medi pobre en nutrients, i li va costar més imposar-se. Per a propers estudis, seria interessant avaluar el comportament d'aquestes dues soques inoculades de forma seqüencial amb addició i sense de nutrients, per tal de constatar com afecta aquest paràmetre a la fermentació i al producte final. Encara que el fet que *S. cerevisiae* no s'imposi tant ràpidament també pot ser positiu per donar més possibilitats a la soca no-*Saccharomyces* a desenvolupar-se i deixar més empremta en el vi final.



6. CONCLUSIONS I PERSPECTIVES

L'objectiu d'aquest treball era seleccionar alguna soca de *L. thermotolerans* per obtenir vins amb menor quantitat d'etanol i major d'àcid làctic que en una soca control de *S. cerevisiae*. Després dels assajos realitzats hem pogut seleccionar dues soques de *L. thermotolerans*, Lt2 i LtCW81 que eren capaces de produir nivells d'àcid làctic entre 2-4 g/l i d'arribar a reduir el grau entre 0.5-1% en fermentacions seqüencials. Per tant, l'objectiu s'ha assolit, i hem confirmat que, efectivament, es pot modular la composició del vi, utilitzant diferents soques de llevats no-*Saccharomyces*. En el nostre estudi, inoculant soques de *L. thermotolerans* hem estat capaços de reduir el grau alcohòlic tant en les fermentacions individuals com en les seqüencials. Tot i així, hauria estat interessant i recomanable realitzar totes les fermentacions individuals de forma simultània per assegurar al màxim que els paràmetres finals del vi i el transcurs de la fermentació estiguessin obtinguts en les mateixes condicions.

De cara a futurs treballs, seria interessant estudiar les inoculacions seqüencials amb addició de nutrients per determinar si la cinètica de la reacció augmentaria, si els paràmetres finals es veurien afectats i si les soques de *S. cerevisiae* s'imposarien més ràpidament que no pas en la fermentació seqüencial realitzada en aquest estudi. Caldria assegurar d'entrada la disponibilitat d'un most de partida amb les mateixes condicions per dur a terme totes les fermentacions, ja que a més a més dels possibles errors atzarosos, o que es poden cometre a l'hora d'inocular els llevats (quantitat, moment de l'inòcul, etc.), la fermentació i els microorganismes encarregats també es veuran afectats segons la disponibilitat de sucres del medi, la temperatura, etc.

En experiments futurs es podrien fer més rèpliques per obtenir uns valors més representatius en el cas de les fermentacions seqüencials i, probablement, seria recomanable analitzar altres paràmetres, com ara la quantitat d'àcid làctic, abans d'inocular *S. cerevisiae* en aquestes fermentacions. De la mateixa manera, també resultaria interessant ampliar el perfil fermentatiu de cada soca així com realitzar un panell de tast dels vins finals.



7. BIBLIOGRAFIA

- Aguera, E., Athès-Dutour, V., Bes, M., Caillé, S., Cottureau, P., Escudier, J. L., Mikolajczak, M., Roy, A., Sablayrolles, J. M., Samson, A., Souchon, I., & Vidal, J. P. (2010). Reduction of wine alcohol content: a comparative study of different technologies. *Bulletin De L'oiv*, 83(947/948/949), 31-42. Consultat a 1 de setembre de 2021, de [https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103126171?q=\(au%3a%22Vidal%2c+J.+P.%22\)](https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103126171?q=(au%3a%22Vidal%2c+J.+P.%22))
- Balikci, E. K., Tanguer, H., Jolly, N. P., & Erten, H. (2016). Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. *Yeast*, 33(7), 313-321. <https://doi.org/10.1002/yea.3166>
- Benito, A., Calderon, F., Palomero, F., & Benito, S. (2015). Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production. *Molecules*, 20(6), 9510-9523. <https://doi.org/10.3390/molecules20069510>
- Benito, S. (2018). The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 102(16), 6775-6790. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9117-z>
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2018). *Schizosaccharomyces pombe* Biotechnological Applications in Winemaking. *Methods In Molecular Biology*, 1721, 217-226. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7546-4_19
- Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2016). *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.005>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012>
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2013). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied And Environmental Microbiology*, 80(5), 1670-1678. <https://doi.org/10.1128/aem.03780-13>
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M., & Arroyo, T. (2013). Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *European Food Research And Technology*, 236(1), 193-207. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1874-9>
- Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. M. L., Bisson, L. F., & Bamforth, C. W. (2016). *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *Journal Of The Institute Of*



Brewing, 122(4), 599-604. <https://doi.org/10.1002/jib.362>

Erten, H., Tanguler, H., Cabaroglu, T., & Canbas, A. (2006). The influence of inoculum level on fermentation and flavour compounds of white wines made from cv. Emir. *Journal Of The Institute Of Brewing*, 112(3), 232-236. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00718.x>

Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., & López, R. Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non- *Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts. *Food Research International*, 112, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.018>

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal Of Food Microbiology*, 86(1-2), 11-22. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00245-9)

Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 979-995. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>

Gil M., Estévez S., Kontoudakis N., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2013). Influence of partial dealcoholization by reverse osmosis on red wine composition and sensory characteristics. *European Food Research and Technology*, 237, 481–488. Consultat a 1 de setembre de 2021, de <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00217-013-2018-6>

Friedrich, A., Jung, P. P., Hou, J., Neuvéglise, C., & Schacherer, J. (2012). Comparative Mitochondrial Genomics within and among Yeast Species of the *Lachancea* Genus. *PLOS ONE*, 7(10), e47834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047834>

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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>

Gonzalez, R., Quirós, M., & Morales, P. (2013). Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: A promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends In Food Science & Technology*, 29(1), 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.015>

González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., & Mas, A., Canals, J. M., & Zamora, F. (2014). Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research And Technology*, 240(5), 999-1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>

Liu, S.-Q. (2002). Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. *Journal Of Applied Microbiology*, 92(4), 589-601. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01589.x>



- Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F., & Hutzler, M. (2016). Screening for new brewing yeasts in the non-Saccharomyces sector with *Torulaspora delbrueckii* model. *Yeast*, 33(4), 129-144. <https://doi.org/10.1002/yea.3146>
- Mora, J., Barbas, J. I., & Mulet, A. (1990). Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 41(2), 156-159. Consultat a 1 de setembre de 2021, de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9043278>
- Mostert, T. T., & Divol, B. (2014). Investigating the proteins released by yeasts in synthetic wine fermentations. *International Journal Of Food Microbiology*, 171, 108-118. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.010>
- Nadal, M. (2018). El canvi climàtic en el cultiu de la vinya. Efectes en la garnatxa negra. *Quaderns Agraris*, 45, 71-90. <https://doi.org/10.2436/20.1503.01.91>
- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2013). Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast*, 14, 215-237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>
- 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(411), 1-20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Porter, T. J., Divol, B., & Setati, M. E. (2019). Lachancea yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Research International*, 119, 378-389. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.003>
- Raynal, C., Wardrop, F., Languet, P., Suárez, C., Heras Manso, J. M., Dumont, A., & Julien-Ortiz, A. (2011). Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura "no-Saccharomyces" y de una levadura "Saccharomyces Cerevisiae", una herramienta innovadora para el enólogo. (428), 83-92. Consultat a 1 de setembre de 2021, de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3786592>
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal Of Food Microbiology*, 86(1-2), 169-180. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00290-3)
- Su, J., Wang, T., Wang, Y., Li, Y-Y., & Li, H. (2014). The use of lactic acid-producing, malic acid-producing, or malic acid-degrading yeast strains for acidity adjustment in the wine industry. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 98(6), 2395-2413. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5508-y>
- Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation



Universitat Rovira i Virgili
Grau d'Enologia
Facultat d'Enologia
Tarragona

temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal Of Food Microbiology*, 80(1), 47-53. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00144-7)



8. ANNEXOS

Annex 1

DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO ASIMILABLE

Procedimiento

A) Pasos previos

Calibrar el pH-metro

Ajustar el pH de la solución de formaldehído a 8,1

B) Valoración

1. Poner 25 ml de muestra en un vaso de precipitados. Si la muestra contiene anhídrido sulfuroso, añadir algunas gotas de agua oxigenada 30%.
2. Ajustar a pH 8,1 con la solución de hidróxido de sodio 0,25 M (acabar de ajustar con la solución de 0.025M).
3. Añadir 10 ml de la solución de formaldehído y mezclar.
4. Después de haberlo dejado durante un minuto reposar a temperatura ambiente, valorar la solución con hidróxido de sodio 0,025 M hasta que el pH vuelva a ser 8,1.

Cálculos

ÍNDICE DE FORMOL (no tiene unidades) = ml de NaOH 0,025 M gastados

NITRÓGENO ASIMILABLE (mg de N/ litro) = 14 * Índice de formol



Annex 2

Fermentacions individuals – dades complementàries

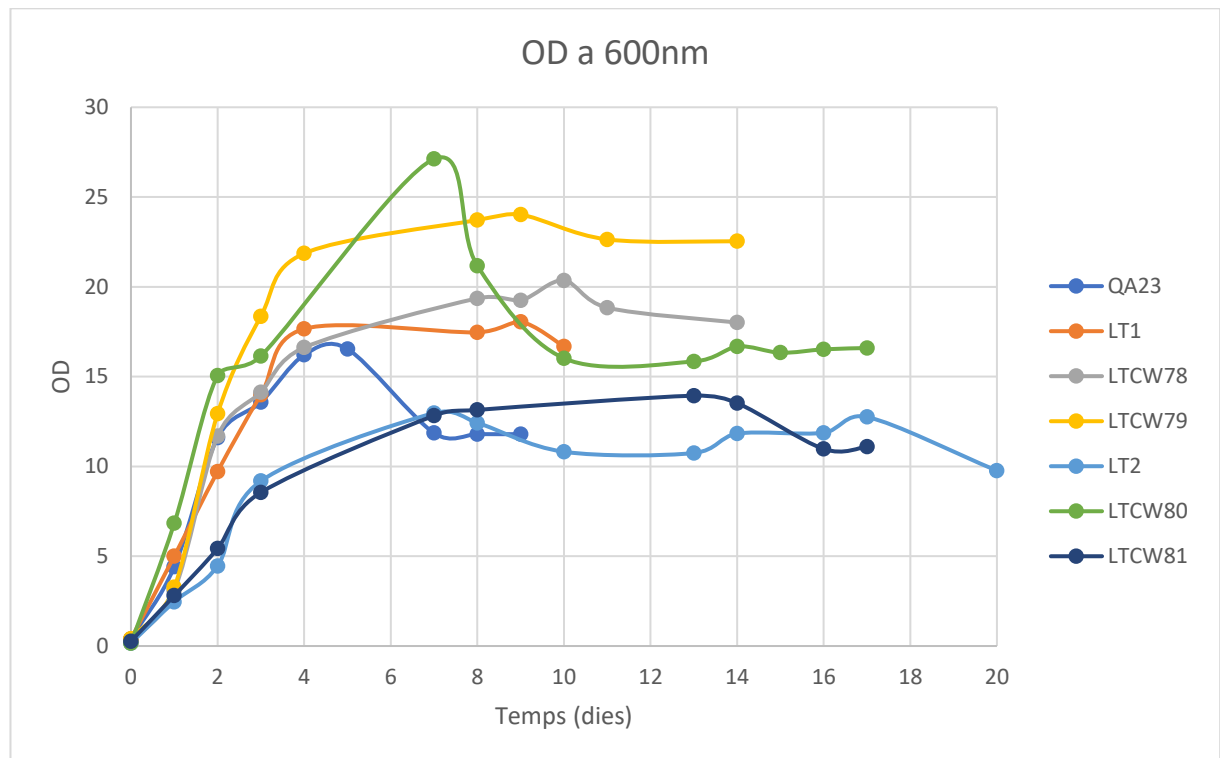


Figura 6. Seguiment de la OD de la fermentació individual de les soques Lt1, LTCW78, LTCW79, Lt2, LTCW80 i LTCW81 en comparació a la soca control de QA23.

Fermentació seqüencial – dades complementàries

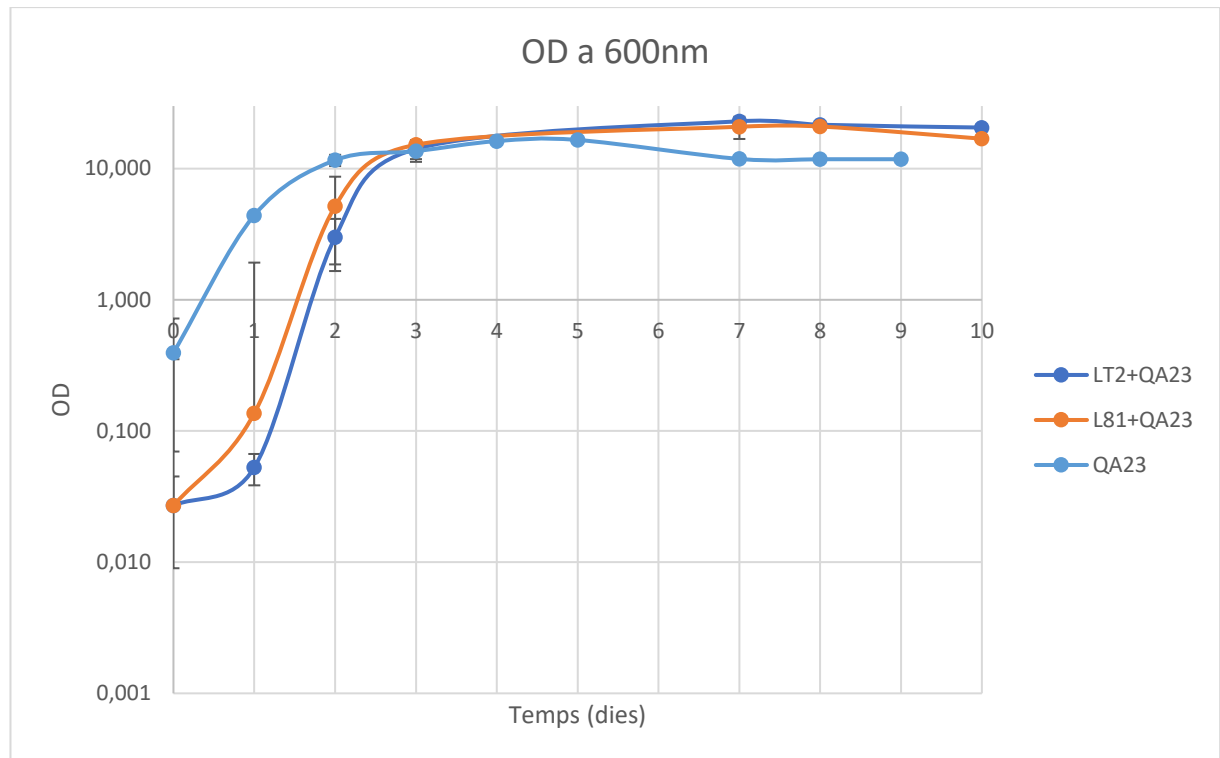


Figura 7. Seguiment de la OD de la fermentació seqüencial de les soques Lt2 i LtCW81 amb la soca de *S. cerevisiae* QA23 en comparació a la soca control de QA23.

Annex 3



Figura 8. Placa soca QA23 en medi WLN.

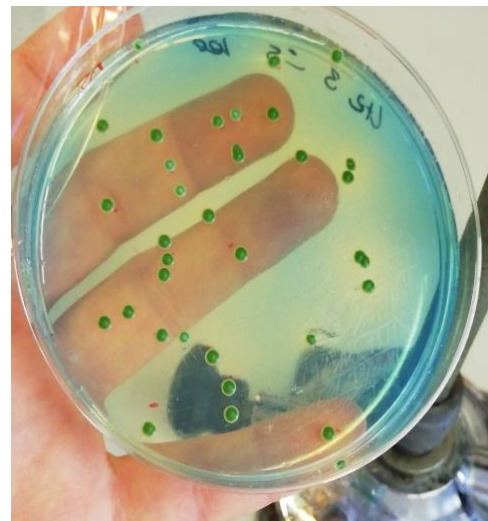


Figura 9. Placa soca Lt2 (rèplica 3) en medi WLN.

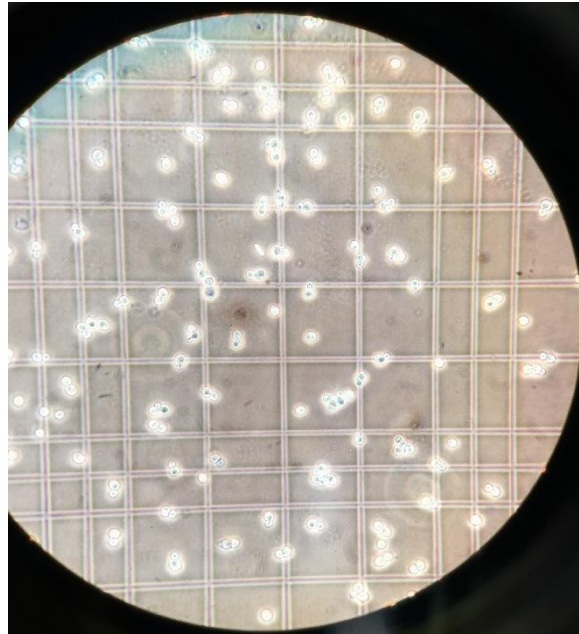


Figura 10. Recompte en cambra de Neubauer QA23.

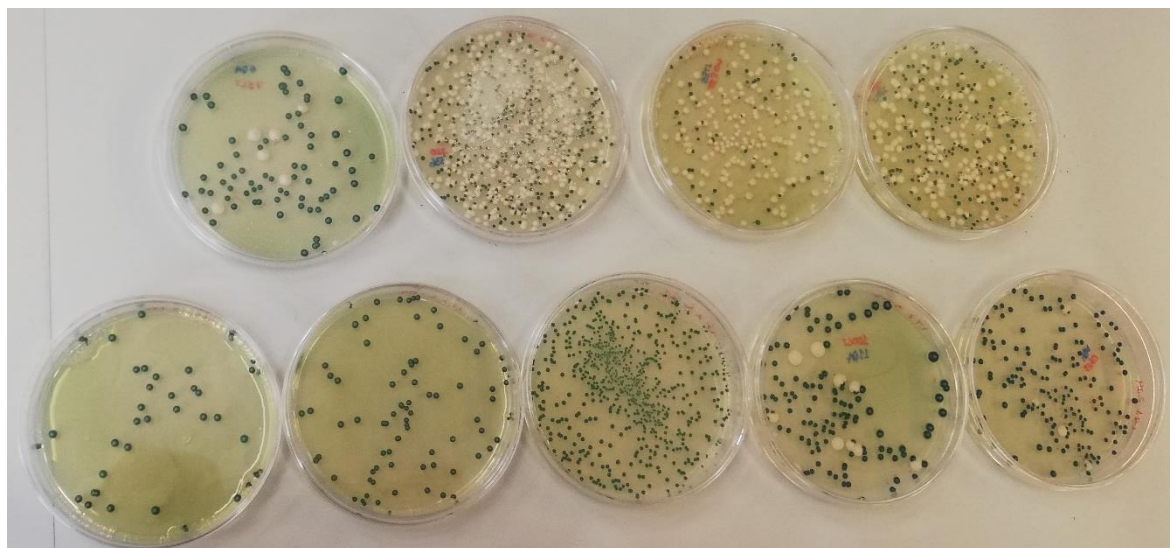


Figura 11. Evolució plaques en medi WLN de la fermentació seqüencial on s'observa la imposició de la soca de *S. cerevisiae* QA23 respecte a les soques de *L. thermotolerans* Lt2 i LtCW 81.

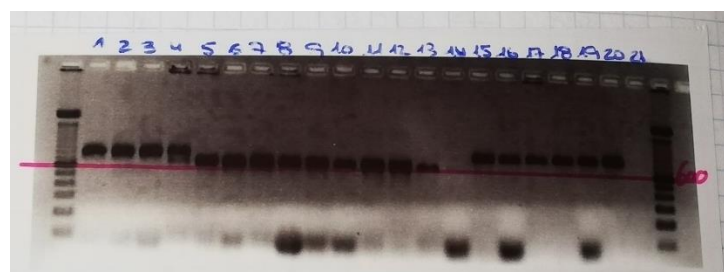


Figura 12. Resultats gel primera electroforesi.

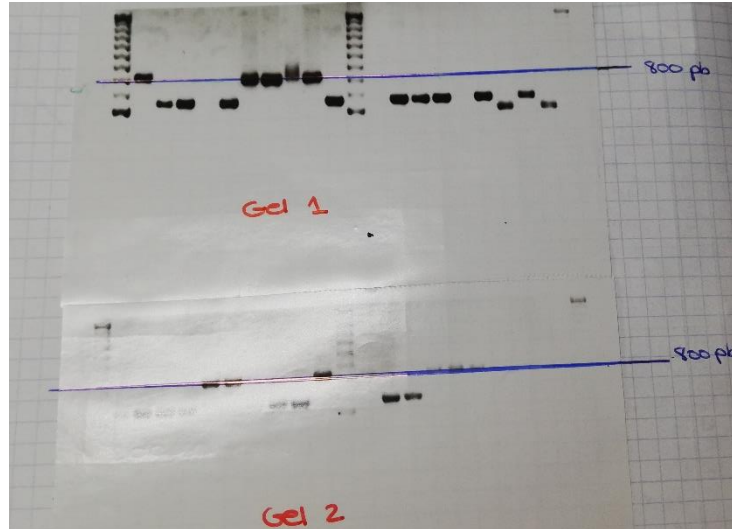


Figura 13. Resultats gels segona electroforesi.

Annex 4

Fitxa tècnica de la soca de *S. cerevisiae* QA23

Saccharomyces bayanus
Levadura natural seleccionada

LALVIN QA23

SELECTION TERROIR
VINHOS VERDES PORTUGAL



YSEO
PROCESS
Yeast Security Optimization

Seleccionado por:



www.lallemandwine.com
wine@lallemand.com

INTENSIDAD AROMÁTICA Y SEGURIDAD FERMENTATIVA

APLICACIONES

La vinificación de mostos blancos clarificados a baja temperatura es un proceso aplicado en un gran número de bodegas sobre variedades nobles como el Moscatel, la Sauvignon, la Chardonnay y la Verdejo pero también en variedades neutras como la Airén o el Macabeo. Este tipo de vinificación, generalmente realizada en ausencia de oxígeno, puede ser problemática para la mayoría de las levaduras, especialmente si esta carencia va unida a un bajo contenido en nitrógeno asimilable.

La levadura Lalvin QA23, fue seleccionada en la región de Vinhos Verdes de Portugal y entre sus cualidades ofrece seguridad fermentativa unida a sus bajas exigencias en nitrógeno asimilable y oxígeno. Esta levadura asocia sus características esenciales con la aptitud de revelar aromas cítricos (limón verde, pomelo) en las variedades blancas aromáticas.



PROPIEDADES ENOLÓGICAS Y MICROBIOLÓGICAS

- *Saccharomyces cerevisiae bayanus*
- Posee factor killer.
- Tolerancia al alcohol: hasta 16% de alcohol.
- Fase de latencia media.
- Velocidad de fermentación rápida.
- Levadura fructífera que termina bien las fermentaciones.
- Amplio rango de temperaturas de fermentación: 15 a 32°C.

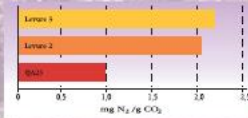
- Muy bajas necesidades en nitrógeno asimilable a cualquier temperatura (18 a 28°C)
- Bajas necesidades de oxígeno.
- Baja producción de acidez volátil: < a 0,2 g/L eq. H₂SO₄ de promedio.
- Baja producción de SO₂.
- Baja producción de SH₂ debido a la baja necesidad de N₂ asimilable.
- Baja producción de espuma.

DOSIS DE UTILIZACIÓN

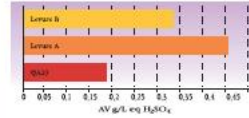
Vinificación en blanco, rosado y tinto 20 a 30 g/hl.
 Toma de espuma 50 g/hl.

Nota: conviene adaptar la dosis de utilización en función del estado sanitario de la vendimia e higiene de la bodega.

SEGURIDAD FERMENTATIVA Y AROMAS



Comparación de las necesidades en nitrógeno asimilable entre diferentes levaduras en un medio sintético con carencia de N₂ (Julien, 1999).



Comparación de la producción de acidez volátil entre 3 levaduras en vinificación de un mosto muy clarificado (20 NTU de turbidez).

Varietal	Zona vitícola	Notas aromáticas
Chardonnay	Oregon, Chile	Pomelo, piña
Muscadet	Valle del Loira	Aromas de frutas blancas (<i>vinos jóvenes</i>), frutos secos (<i>vinos después de envejecer</i>)
Ugni-Blanc	Gers	Frutas frescas, notas florales (<i>amapola y rosa</i>)
Moscatel de grano menudito	Roussillon	Cítricos, plátano, melocotón blanco

Tabla elaborada a partir de una cata llevada a cabo por profesionales en enología en las vendimias de 1992 a 1994

MODO DE EMPLEO

Rehidratar la levadura en 10 veces su peso en agua a 38-40°C. Esperar 15 minutos y luego agitar periódica y suavemente durante otros 15 minutos. Añadir al mosto.

- El tiempo total de rehidratación no deberá superar los 45 minutos.
- Evitar el choque térmico para la levadura. La diferencia de temperatura entre el mosto que va a ser inoculado y el medio de rehidratación no deberá ser superior a 10°C.
- Es esencial rehidratar la levadura en un contenedor limpio.
- No se recomienda la rehidratación en mosto.

DISTRIBUIDO POR:

LALLEMAND BIO S.L.

Tel.: 902 88 41 12 – Fax: 902 88 42 13

lallemandbio@lallemand.com

La información aquí contenida es verdadera y exacta según nuestro mejor conocimiento. Sin embargo, esta ficha no debe considerarse una garantía expresa o implícita, ni una condición de venta de este producto.