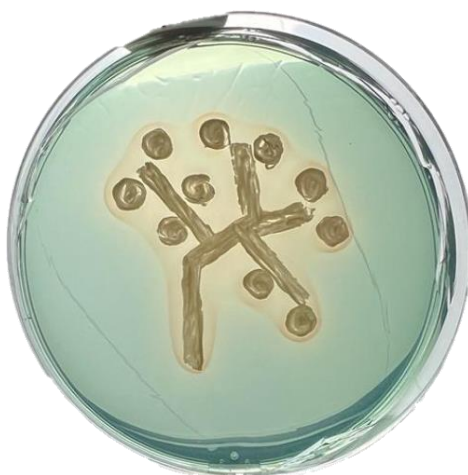


EL PAPER DE *METSCHNIKOWIA* EN LA BIOPROTECCIÓ DEL VI

Iratxe Mejias Fernández

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA



Tutor acadèmic: Albert Bordons de Porrata-Doria, Doctor en Biologia,
Departament de Bioquímica i Biotecnologia, albert.bordons@urv.cat

En cooperació amb: INCAVI (Institut Català de la Vinya i el Vi)

Supervisores: Dra. Anna Puig Pujol, (apuigpujol@gencat.cat) i Dra. Gemma
Roca Domènech (grocad@gencat.cat)

Juny 2022, Tarragona

Jo, Iratxe Mejias Fernández, amb DNI 24416885Q, soc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formació-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 6 de juny de 2022.

Agraïments

Vull agrair en primer lloc a l'equip de l'INCAVI per haver-me acollit i ensenyat part de la seva professió. En especial a la Dra. Anna Puig i la Dra. Gemma Roca per tota la paciència i ajuda que m'han donat.

També agrair al meu tutor acadèmic, el Dr. Albert Bordons per haver fet possible la realització d'aquest treball.

A la meva família, la meva mare, pare i la meva germana Leire per que mai han deixat de confiar en mi i finalment puc sentir-me orgullosa d'haver acabat. A la família que es tria, els meus amics i amigues de tota la vida i els que he conegut aquests anys, gràcies pels ànims que sempre em doneu.

Al meu company de vida, que em va fer veure que al final, una pandèmia no és tan dolenta si et tinc al meu costat, gràcies.

Índex

Dades del centre.....	4
1. Resum	5
2. Introducció: el paper de la bioprotecció.....	6
2.1. Diversitat microbiana en el raïm	7
2.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.1.2 Llevats no- <i>Saccharomyces</i>	8
2.2. Llevats no- <i>Saccharomyces</i> com agents de bioprotecció	9
2.3 El gènere <i>Metschnikowia</i>	10
3. Hipòtesi.....	11
4. Objectius.....	11
5. Metodologia.....	12
5.1 Soques de llevat i medis de cultiu	12
5.1.1. Soques de llevat usades en l'estudi.....	12
5.1.1.1 Diferenciació a nivell de soca de <i>M. fructicola</i>	12
5.1.1.2 Medis de cultiu	13
5.1.2 Medis de cultiu	13
5.2 Microvinificacions.....	14
5.3 Anàlisis microbiològiques	17
5.3.1 Recompte de població de llevats	17
5.3.2 Anàlisis d'implantació de llevats.....	17
5.4 Anàlisis físico-químiques dels vins	17
5.5 Anàlisi sensorial dels vins	18
6. Resultats	19
6.1 Diferenciació a nivell de soca de <i>M. fructicola</i>	19
6.2. Cinètica fermentativa de les microvinificacions	21
6.3 Recompte de població de llevats	23
6.4. Anàlisi d'implantació de llevats	26
6.5 Anàlisis físico-químiques dels vins	33
6.6 Anàlisi sensorial dels vins	36
7. Conclusions	39
8. Autoavaluació.....	39
9. Bibliografia.....	41
10 Annexos	45

Dades del centre

L'Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI) és un organisme autònom de la Generalitat de Catalunya creat l'any 1980. Té la consideració de Centre Públic d'Investigació al servei de l'activitat productiva vitícola i enològica nacional i té capacitat plena en matèria vitivinícola.

Les actuacions de l'INCAVI van des de la col·laboració amb els sectors productors de raïm, els elaboradors de vi fins als mateixos consumidors finals.

Les seves principals línies d'acció son incentivar els vins de qualitat i fer-los més competitius de cara als mercats interior i exterior, impulsar la recerca, l'experimentació i la transferència de tecnologia, així com difondre el coneixement dels vins catalans, les Denominacions d'Origen i fomentar la cultura del vi. INCAVI compta amb dues seus situades a, Vilafranca del Penedès i a Reus.

L'INCAVI desenvolupa les funcions següents:

- Anàlisis de vins, derivats i expedició de certificats a petició de particulars i organismes.
- Actuar com a organisme tècnic assessor dels consells reguladors de les Denominacions d'Origen vitivinícoles de Catalunya i del sector en general.
- Promoure i fomentar la millora del conreu de la vinya i la qualitat dels vins i altres productes que se'n derivin.
- Promocionar el coneixement i bon ús dels vins catalans a nivell de consum, tot contribuint a la seva correcta valoració.
- Estudiar, investigar i experimentar els processos, les tècniques, els materials i altres aspectes relatius a la producció vitivinícola.
- Col·laborar en realització d'estudis, censos, inventaris, cadastres i estadístiques relacionats amb el sector vitivinícola.

L'activitat tècnica de l'INCAVI, es pot dividir en dos àmbits: el servei d'anàlisi i R+D+I vitivinícola. El servei d'anàlisi fa un control analític de qualitat de caràcter enològic mitjançant els laboratoris ubicats a Reus i Vilafranca dels Penedès. Ofereix a viticultors diferents anàlisis: anàlisi físico-químiques, microbiològics, de sòls, foliars i sensorials. En l'àmbit de R+D+I es poden diferenciar dues branques d'investigació: els projectes d'agronomia i biodiversitat, on responen a les demandes dels viticultors i dels Consells

Reguladors de les Denominacions d'Origen trobant solucions per adaptar la viticultura al canvi climàtic i fer-la més sostenible; i els projectes d'enologia i biotecnologia que treballen en la selecció i avaluació de llevats i bacteris làctics que poden aportar millores en l'expressió final dels vins.

1. Resum

L'ús de llevats no-*Saccharomyces* com agents bioprotectors en la fase prèvia a la fermentació alcohòlica pot ser una alternativa a l'addició de sulfits (SO₂) en les primeres etapes de l'elaboració del vi. En aquest treball s'ha comprovat la funció bioprotectora de les espècies de llevat no-*Saccharomyces*: *Metschnikowia pulcherrima* (*Mp*) i *Metschnikowia fructicola* (*Mf*) mitjançant l'elaboració de microvinificacions amb inòculs de les soques: *Mp* INITIA™ (Lallemand), *Mp Vitis*, *Mp* Berués i *Mf Vitis* durant 96 h de fase prefermentativa a dues temperatures, 8 i 12 °C, seguit de la inoculació de la soca de *Saccharomyces cerevisiae* Penedès-29.

Els resultats mostren que la temperatura de la fase prefermentativa afecta la capacitat de bioprotecció de les soques de *Metschnikowia* inoculades. Temperatures més elevades (12 °C) faciliten el desenvolupament de la microbiota indígena dificultant així la implantació de les soques de *Metschnikowia*. En l'anàlisi físico-química només es va observar com la presència de *Metschnikowia* com agent bioprotector a 8 °C durant les primeres 96 h de fase prefermentativa tendia a incrementar la concentració de glicerol en els vins finals. Finalment, es va avaluar la influència de les soques de *Metschnikowia* a nivell sensorial. Aquelles microvinificacions on s'havia inoculat una soca de *Metschnikowia* en fase prefermentativa mostraven un increment en les notes de fruita blanca i fruita fresca.

Paraules clau: sulfits, bioprotecció, llevats, no-*Saccharomyces*, *Metschnikowia*, implantació.

2. Introducció: el paper de la bioprotecció en enologia

El diòxid de sofre o sulfurós (SO_2) és l'additiu universal més utilitzat en el món enològic. Aquest agent químic té tres propietats principals: actua com antioxidant, antioxidàsic i antimicrobià. El seu ampli espectre d'acció el fa indispensable en el procés de vinificació (Divol et al., 2012). Els sulfits s'utilitzen generalment, en les fases de prefermentació, després de les principals fermentacions (fermentació alcohòlica i fermentació malolàctica) i just abans d'embotellar el vi. No obstant, l'objectiu de l'enologia actual tendeix a disminuir la seva concentració. Un dels principals motius és l'existència de consumidors sensibles a la seva presència, principalment aquells en els que produeix al·lèrgia i problemes respiratoris com l'asma. Aquests efectes adversos fa que s'estiguin buscant accions per a la seva reducció (Salaha et al., 2008).

La bioprotecció en l'enologia es presenta com una alternativa a l'adició de SO_2 en la fase prefermentativa. Aquesta pràctica consisteix en la inoculació de llevats, bacteris o una barreja d'ambdós al raïm o al most per a que s'estableixin i colonitzin el medi, de manera que exerceixin un control sobre la microbiota indígena present i potencialment susceptible a alterar la qualitat del most. Es tracta de proporcionar un element viu per ocupar el nínxol ecològic del raïm o del most i limitar el desenvolupament de microorganismes autòctons indesitjables, podent reduir d'aquesta manera l'ús de SO_2 .

L'acció antimicrobiana del SO_2 sobre el most té com a objectiu principal inhibir el creixement de llevats indígenes, molts dels quals podrien actuar en detriment de la qualitat de la fermentació i del vi final obtingut. Si es redueix la dosis de SO_2 , s'incrementa la pressió microbiològica del most amb les poblacions autòctones compostes majoritàriament per llevats no-*Saccharomyces* els quals actuen en les primeres fases de la fermentació alcohòlica (FA). Per tant, la reducció o absència de SO_2 ha de ser substituïda per altres estratègies com pot ser la bioprotecció.

Amb la bioprotecció s'addiciona al raïm o al most una població determinada principalment d'espècies de llevats no-*Saccharomyces* prèviament seleccionades, amb capacitat de fermentació dèbil i que son capaces de colonitzar el medi, desplaçant i inhibint el desenvolupament de la població indígena de llevats. Amb aquesta operació es pot aconseguir reduir la dosificació de SO_2 en les primeres fases del procés d'elaboració.

2.1. Diversitat microbiana en el raïm

Els llevats, bacteris i fongs filamentosos que son presents a la superfície del raïm, contribueixen a l'ecologia microbiana i composició del vi, però hi han llevats que tenen una influència dominant donat que obtenen protagonisme durant la FA.

L'espècie trobada i aïllada més freqüentment del raïm és el llevat *Kloeckera apiculata* (*Hanseniaspora uvarum*) que representa gairebé el 50% de la població de llevats present. Altres petites però significatives poblacions identificades en la superfície del raïm son: *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Hansenula*, *Aureobasidium*, *Metschnikowia* i *Rhodotorula* depenent de l'estat de maduració (McKay et al., 2010). Es fa una distinció entre llevats salvatges que poden dur a terme una FA limitada amb producció d'esters volàtils, a vegades amb conseqüències negatives (p.e. producció d'acetat d'etil) i llevats del vi que poden dur a terme una FA completa sense produir cap efecte sensorial negatiu.

Malgrat no ser el més abundant de manera autòctona, *S. cerevisiae* és el llevat dominant durant la FA degut a què té una alta capacitat fermentativa i bona tolerància a concentracions elevades d'etanol. La resta de llevats sobreviuen els primers dies del procés però la població anirà disminuint a mesura que la concentració d'alcohol augmenti.

En referència als llevats del vi, podem diferenciar-los en dos grups: llevats *Saccharomyces* i llevats no-*Saccharomyces*.

2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae és un fong unicel·lular que posseeix 12068 kb d'ADN genòmic organitzat en 16 cromosomes. Aquest llevat a part de ser un organisme model, pel fet de ser un dels eucariotes més senzills, és destacable per la gran varietat d'aplicacions industrials.

Una de les raons per la qual és interessant industrialment és per l'anomenat efecte *Crabtree* que consisteix en que *S. cerevisiae*, encara estant sota condicions aeròbiques, no fa ús de la respiració per a metabolitzar sucres sinó que en el seu lloc produeix etanol i altres compostos a partir del piruvat. *S. cerevisiae* domina la major part dels processos fermentatius com l'elaboració de vins i altres begudes alcohòliques com la cervesa o també l'elaboració de pa.

Es parla de *S. cerevisiae* com a llevat del vi malgrat la seva poca presència en el raïm de manera natural. Actualment s'utilitza aquest llevat com a cultiu estàrter (de l'anglès *starter*, iniciador) ja que permet controlar la població inoculada, és capaç de completar la FA, és resistent a baixes temperatures, i a concentracions d'alcohol i SO₂ elevades.

L'ús de cultius estàrters en la indústria del vi ha ajudat a mantenir un control del procés de fermentació i en general ha millorat la qualitat d'aquests. Aquesta contribució es deu a la no producció d'aromes indesitjables (acidesa volàtil, compostos de sofre o fenols volàtils, entre altres) que emmascaren les característiques positives del vi, disminuint la seva qualitat (Tempère et al., 2018).

2.1.2 Llevats no-*Saccharomyces*

Els llevats no-*Saccharomyces* (no-Sc) son un grup de llevats que participen en les primeres fases de la FA. Recentment, han passat de ser considerats llevats que feien malbé el vi a microorganismes que poden millorar el perfil aromàtic d'aquest. Aquestes millores es fan mitjançant reaccions enzimàtiques, disminució d'etanol, producció de glicerol, augment de l'acidesa i estabilitzant el color (Casas-Godoy et al., 2021).

En els darrers anys, la recerca enològica s'ha centrat en les avantatges de l'ús de llevats no-Sc en l'elaboració de vi. Generalment, aquests llevats son inoculats per a iniciar la FA i després *S. cerevisiae* és inoculada per a finalitzar-la.

Taula 1 Importància d'alguns llevats no-*Saccharomyces* en la fermentació del vi, disponibilitat comercial (CA), tipus de conservació, marca i productor comercial (Casas-Godoy et al., 2021). Adaptada de (Morata et al., 2019) i (Benito et al., 2019).

Species	Influence on wine characteristics	CA	Commercial presentation	Brand (producer)
<i>Hanseniaspora spp.</i>	Enhance terpenes and acetate ester production. Mannans increase mouthfeel	No	-	-
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Low volatile acidity Enhance lactic acid production	Yes	Active Dry Yeast (ADY)	- CONCERTO™(CHR HANSEN) - LEVEL2 LAK-TIA™(LALLEMAND)
<i>Metschnikowia fructicola</i>	Improve sensory expression reduce use of SO ₂	Yes	Active Dry Yeast (ADY)	GAIA™ (LALLEMAND)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Enhance terpenes, volatile thiols and esters production Prevention of flavor defects	Yes	Active Dry Yeast (ADY)	- LEVEL 2 FLAVIA®MP346 (LALLEMAND) - LEVULIA® PULCHERRIMA (AEB) - OENOFERM® MPROTECT (ERBSLÖH)
<i>Pichia anomala</i>	Reduction of C6 alcohols production	No	-	-
<i>Pichia guilliermondii</i>	Enhance color stability	No	-	-
<i>Pichia kluyveri</i>	Enhance esters and volatile thiols production	Yes	Frozen yeast	FROOTZEN® (CHR HANSEN)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	L-Malic acid consumption, deacidification	Yes	Dry beads	PROMALIC® (PROENOL)
<i>Starmella bacillaris</i>	Enhance glycerol production	No	-	-
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Enhance esters and volatile thiols production, low volatile acidity production	SI	Frozen yeast Active Dry Yeast (ADY)	- PRELUDE™(CHR HANSEN) - LEVEL2 BIODIVA. TD291 (LALLEMAND) - ZYMAFLORE® Alpha(LAFFORT)

2.2. Llevats no-*Saccharomyces* com agents de bioprotecció

S'han descrit una sèrie d'espècies de llevats no-*Saccharomyces* interessants des del punt de vista de la bioprotecció i biocontrol:

a) *Metschnikowia pulcherrima* és un llevat habitual del most. Les soques de *M. pulcherrima* son interessants com a iniciadores de fermentacions mixtes amb *S. cerevisiae*, per la seva forta activitat antimicrobiana/antifúngica enfront a altres espècies de llevat i fongs filamentosos no desitjables. La seva habilitat per alliberar compostos aromàtics volàtils (tiols, terpens...) i concentracions elevades d'esters, contribueixen a millorar la complexitat aromàtica dels vins. A més, també s'ha descrit que amb la seva inoculació mixta es pot reduir lleugerament la concentració d'etanol dels vins finals (Contreras et al., 2015; Kántor et al., 2016; Oro et al., 2014).

- b) *Torulasporea delbrueckii* s'ha demostrat que pot ser una alternativa microbiològica i química als sulfits. És una espècie que és capaç de produir hidroxitirosol que actua com un compost bioactiu. L'estudi portat a terme per (Simonin et al., 2018) ha mostrat el paper bioprotector que presenta aquesta espècie, protegint als vins enfront microorganismes indesitjables a més de protegir-los d'oxidacions enzimàtiques i químiques.
- c) *Metschnikowia fructicola*. Molt propera a l'espècie del mateix gènere *M. pulcherrima*, se li han atribuït característiques molt semblants, amb una pronunciada eficiència de biocontrol per aplicacions vinícoles (Benucci et al., 2018; Liu et al., 2011).
- d) *Starmerella bacillaris* (*Candida zemplinina*). S'ha descrit en soques d'aquesta espècie activitat antifúngica contra *Botrytis cinerea* (Nadai et al., 2018; Nardi, 2020). Per tant, podria ser provada com un agent de biocontrol.
- e) *Pichia kluyvery*. S'han aïllat soques de *P. kluyvery* de *Vitis vinifera* ssp *sylvestris* que van demostrar tenir una acció antagonista contra les espècies patògenes *Botrytis cinerea*, *Aspergillus carbonarius*, i *Penicillium expansum*. Per tant, podria ser usada com agent antifúngic (Cordero-Bueso et al., 2017).

2.3 El gènere *Metschnikowia*

D'entre tots els llevats no-Sc del vi, *Metschnikowia* és un gènere d'ascomicets caracteritzat per una forma ovalada que es reproduïx per gemmació, tot i que s'ha observat creixement pseudohifal en condicions anaeròbiques. Aquest llevat té la particularitat de que quan es sembra en placa en un medi amb presència de FeCl₃, les colònies adquireixen una coloració vermella (Sipiczki, 2006). És un dels gèneres més investigats degut al seu impacte en l'elaboració de vi a més de trobar-se de manera habitual en mosques de la fruita, en el raïm i com a part de la microbiota resident de cellers i equips de vinificació.

El poder fermentatiu de *Metschnikowia* és més aviat baix-moderat, encara així tenen la capacitat de créixer junt amb altres espècies de llevats a la fase inicial de la fermentació,

sintetitzant metabòlits secundaris que milloren el perfil aromàtic del vi. També s'han descrit activitats enzimàtiques amb potencial antimicrobià contra microorganismes que deteriorenen la qualitat del vi (Vicente et al., 2020).

Les propietats descrites de *Metschnikowia* provenen majoritàriament d'estudis amb soques de *Metschnikowia pulcherrima*. A part, existeixen altres espècies com *M. fructicola* i *M. viticola*.

La capacitat antimicrobiana de *Metschnikowia* i d'altres llevats no -Sc ha obert pas a la recerca d'estratègies de bioprotecció en l'àmbit enològic.

3. Hipòtesi

La inoculació de diferents soques d'espècies de *Metschnikowia* en el most en fase prefermentativa a baixa temperatura pot exercir un efecte bioprotector davant la microbiota indígena. Aquest fet podria permetre elaborar vins amb menys quantitat de sulfurós (SO₂) afegit, mantenint o millorant les qualitats enològiques i sensorials dels vins elaborats.

4. Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball és determinar els diferents efectes que exerceix *Metschnikowia* sobre les espècies autòctones presents al raïm quan aquesta s'inocula en el most en etapa prefermentativa amb conservació en fred.

Els objectius secundaris del treball van ser:

- Realitzar microvinificacions amb inòculs de diferents soques de les espècies *M. pulcherrima* i *M. fructicola*, sense addició de SO₂ al most, amb el posterior inòcul de *S. cerevisiae*.
- Avaluar l'impacte de la inoculació de llevats de bioprotecció en el most analitzant: la cinètica fermentativa del procés, l'anàlisi dels perfils de restricció de l'ADN mitocondrial (RFLP-mtDNA) d'una població representativa aïllada en cada punt de mostreig, l'anàlisi de paràmetres enològics generals dels vins elaborats i

finalment una anàlisi sensorial de descriptors generals (color, aroma, gust i postgust) i aromàtics (floral, fruita blanca, fruita tropical...).

5. Metodologia

5.1 Soques de llevat i medis de cultiu

5.1.1. Soques de llevat usades en l'estudi

Per a realitzar aquest estudi, es van utilitzar diferents soques de *Metschnikowia*. Concretament, tres soques de *M. pulcherrima* (*Mp*): *Mp* INITIA™ (Lallemand), *Mp Vitis* i *Mp* Berués; i una soca de *M. fructicola*: *Mf Vitis*. Més concretament, la *Mp* INITIA™ és una soca comercial que es distribueix en format de llevat sec actiu (LSA). És per això que abans de la seva utilització cal rehidratar-la en 10 vegades el seu pes en aigua a 20-30 °C durant 20 minuts. La resta de *Mp* i *Mf* formaven part d'una col·lecció de *Metschnikowia* pròpia d'INCAVI, i es mantenen en format fresc.

D'altra banda, la soca de llevat de *S. cerevisiae* utilitzada en aquest estudi va ser la soca *Sc* Penedès-29 (*Sc* P29) en format fresc, aïllada per INCAVI als anys 80 en la zona vitícola del Penedès.

5.1.1.1 Diferenciació a nivell de soca de *M. fructicola*

En el moment d'iniciar aquest estudi, els tècnics d'INCAVI ja havien realitzat prèviament la identificació a nivell de soca de la col·lecció pròpia de *M. pulcherrima*, i restava pendent la identificació de la col·lecció de *M. fructicola*, la qual estava formada per 12 aïllats obtinguts d'estudis previs realitzats per l'INCAVI i que pertanyien a diferents localitzacions geogràfiques.

Per a la caracterització a nivell de soca dels 12 aïllats de *M. fructicola* es va seguir el protocol descrit per González-Arenzana et al., 2017 i Renault et al., 2009, que es basa en la tècnica *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD)-PCR utilitzant els encebadors M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'), M14 (5'-GAGGGTGGGGCCGTT-3'), Coc (5'-AGCAGCGTGG-3'), OPA02 (5'-TGCCGAGCTG-3') i OPA09 (5'-GGGTAACGCCC-3') (veure Annex 1).

5.1.2 Medis de cultiu

Per tal d'aconseguir creixement fresc de totes les soques amb les que portar a terme l'estudi, cada soca es va sembrar en plaques amb medi de cultiu Sabouraud + cloramfenicol (SAB) i es van incubar durant 48 h a 28 °C. Un cop desenvolupades les colònies, les plaques es van conservar a 4 °C.

Per a l'obtenció de precultius per a la inoculació de les microvinificacions, es van fer créixer les diferents soques de llevats a partir d'una colònia provinent de les plaques de SAB conservades a 4 °C (*Figura 1*) en 150 ml de most blanc pasteuritzat de la varietat Macabeu (° Brix = 16,4; acidesa total (AT) = 4,8 g/L; pH = 3,12, grau alcohòlic probable (GAP) = 9,6 % v/v, nitrogen fàcilment assimilable (NFA) = 110 mg/L) a temperatura ambient i en agitació constant (100 rpm) durant 48 h fins a la fase estacionària de creixement (*Figura 2*).

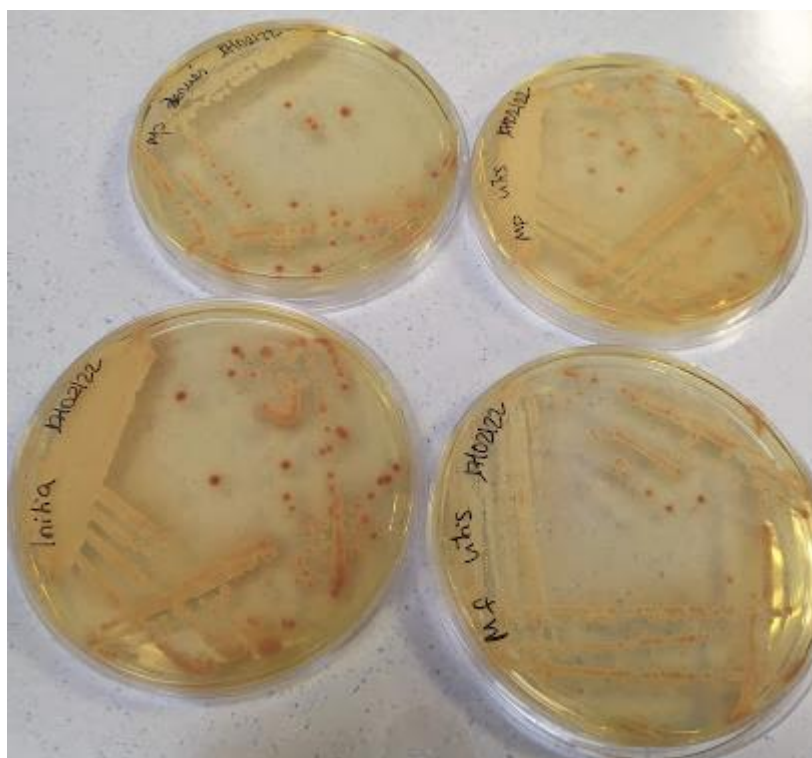


Figura 1 Plaques amb medi de cultiu Sabouraud amb les 4 soques diferents de *Metschnikowia*: *Mp Berués*, *Mp Vitis*, *Mp INITIATM* i *Mf Vitis*.

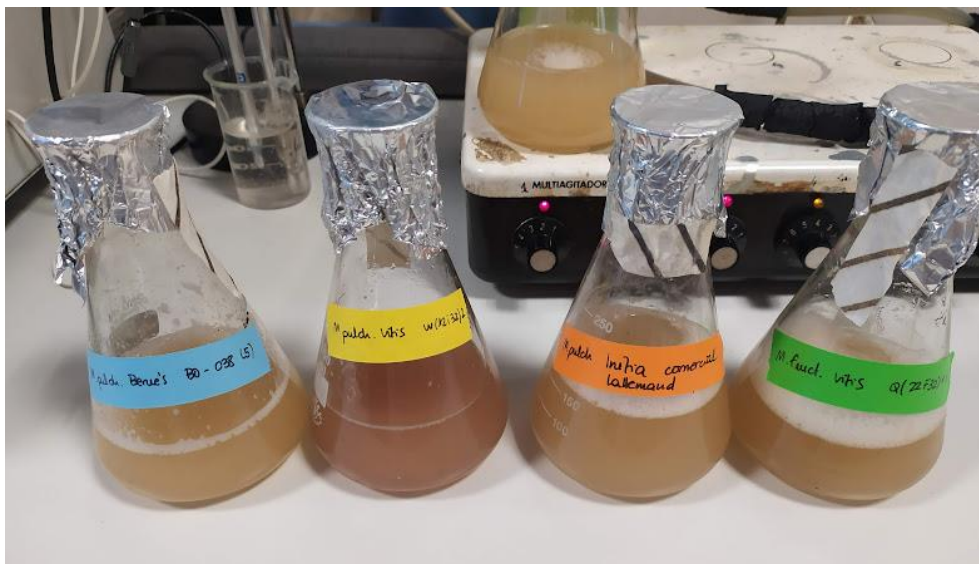


Figura 2 Pre-cultius de les soques de *Metschnikowia*: *Mp Berués*, *Mp Vitis*, *Mp INITIATM* i *Mf Vitis* després de 48 hores en agitació a temperatura ambient

5.2 Microvinificacions

Degut a que l'estudi es va dur a terme fora de l'època de verema, per a realitzar les microvinificacions es van utilitzar dos lots diferents de mostos naturals que INCAVI conservava congelats des de la verema de 2021. Concretament, un most de la varietat Xarel·lo d'un celler de la DO Penedès amb una terbolesa de 230 NTU i un most desfangat de la varietat Macabeu procedent d'una cooperativa del Penedès amb una terbolesa de 13 NTU.

Degut a que durant la congelació dels mostos, la població indígena d'aquests es veu compromesa, el most de Xarel·lo es va deixar temperar a temperatura ambient durant 72 h per a que els llevats indígenes del propi most s'activessin. D'altra banda, el most de Macabeu es va col·locar a 8 °C durant 24 h per a que es pogués descongelar però no comencés a fermentar abans d'iniciar les microvinificacions.

Abans d'iniciar les microvinificacions, es va inocular una fracció del most de Macabeu al most de Xarel·lo per aconseguir una població inicial de llevats de $7 \cdot 10^3$ cel/ml, i així simular les condicions d'un most natural amb presència de llevats indígenes. Abans d'iniciar l'experiment de bioprotecció, es van realitzar les anàlisis físico-químiques del most de partida (*Taula 2*).

Taula 2 Anàlisis físico-químiques del most inicial sense sulfitar.

NFA	138 mg/l	Àc. Acètic	0,03 g/l
°Brix	16,4	Àc. Màlic	1,5 g/l
Densitat	1069 g/l	SO ₂ lliure	10 mg/l
AT	4,9 g/l	SO ₂ total	31 mg/l
pH	3,17	Sucres	155,4 g/l

Una vegada preparat el most de partida, es van realitzar les microvinificacions, partint de 250 ml de volum i per duplicat, 24 en total (Figura 3). La Taula 3 mostra la codificació de les microvinificacions amb les diferents condicions testades en aquest estudi durant la fase prefermentativa. Concretament, es van avaluar dues temperatures diferents per la bioprotecció (8 °C i 12 °C) durant les 96 h de fase prefermentativa amb les diferents soques de *Metschnikowia* (INITIA™, *Mp Vitis*, *Mp Berués* i *Mf Vitis*) inoculant una població inicial de $5 \cdot 10^6$ cel/ml a partir dels precultius de cadascuna de les soques (vinificacions: V3, V4, V5 i V6). També es van dur a terme microvinificacions testimoni on no es va inocular cap soca de *Metschnikowia* ni SO₂ (vinificació: V1) o es van dosificar únicament SO₂ (SO₂ total 60 mg/l i SO₂ lliure 31 mg/l) (vinificació: V2) durant les 96 h de fase prefermentativa, tant a 8 °C com a 12 °C. Transcorregudes les 96 h, es van temperar les 24 microvinificacions fins a 20 °C i es va inocular la soca de *S. cerevisiae* P29 en totes elles a una població de $3 \cdot 10^6$ cel/ml per a que es dugués a terme la FA. Les fermentacions es van realitzar a una temperatura constant de 20 °C.

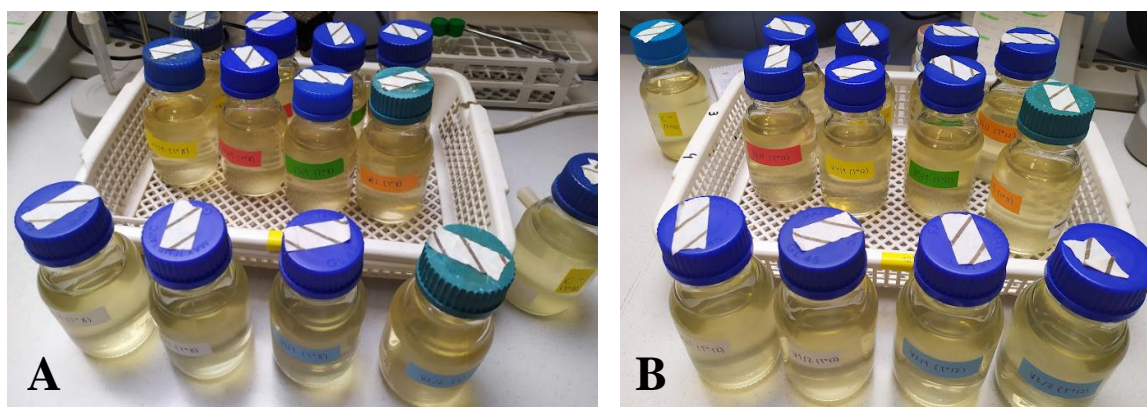


Figura 3 Microfermentadors de 250 ml abans de la fermentació amb el most afegit. A) Fermentadors on es va aplicar 8 °C durant la fase prefermentativa. B) Fermentadors on es va aplicar 12 °C durant la fase prefermentativa.

Taula 3 Codificació de les microvinificacions amb els diferents inòculs i temperatures.

Codi	Duplicats	Condicció microvinificació	Temperatura (°C)	
				MPF
V1	V1/1	Testimoni sense SO ₂ + Sc P29	8	12
	V1/2			
V2	V2/1	Testimoni amb SO ₂ (30 mg/L SO ₂ lliure) + Sc P29	8	12
	V2/2			
V3	V3/1	<i>Mp</i> INITIA™ + Sc P29	8	12
	V3/2			
V4	V4/1	<i>Mp Vitis</i> + Sc P29	8	12
	V4/2			
V5	V5/1	<i>Mp</i> Berués + Sc P29	8	12
	V5/2			
V6	V6/1	<i>Mf Vitis</i> + Sc P29	8	12
	V6/2			



Figura 4 Microfermentacions amb fase prefermentativa a 12 °C durant el transcurs de la fermentació (després de l'inoculació de Sc P29). Es pot observar l'escuma característica producte del cosum de sucres per part dels llevats.

El seguiment de les FA es va dur a terme per pèrdua de pes dels fermentadors. Un cop es va detectar un alentiment en la pèrdua de pes, es va procedir a determinar la concentració de sucres mitjançant determinació enzimàtica (Miura 200, TDT S.L, Gavà, Espanya). La fermentació es va donar per finalitzada quan la concentració de sucres va ser inferior a 2 g/L.

Els vins es van establir amb fred (4 °C) durant 48 hores i es va realitzar la clarificació d'aquests amb gelatina i bentonita (Station œnotechnique de champagne, Magenta, França) a una concentració de 5 g/hl i 60 ml/hl, respectivament, a 4 °C durant 48 h.

5.3 Anàlisis microbiològiques

5.3.1 Recompte de població de llevats

Es van portar a terme controls de la població microbiana de cadascuna de les microvinificacions mitjançant recompte en placa de microorganismes viables en el medi de cultiu agar WLN + cloramfenicol (recompte llevats totals). El medi agar WLN permet diferenciar per aspecte colonial (color de la colònia) possibles grups d'espècies de llevats, concretament, a *Metschnikowia* pel seu color rosat característic. Els recomptes es van realitzar en els mostreigs de les 96 h (just abans d'inocular la *S. cerevisiae* P29), a meitat de FA i a final de FA. Concretament, en cada punt de mostreig, es va agafar una alíquota de cada microvinificació, es van realitzar dilucions seriades amb tampó Ringer i es van sembrar diferents dilucions en agar WLN per obtenir un creixement d'entre 30 - 300 ufc/placa. Les plaques es van incubar durant 48 h a 28 °C pel posterior recompte.

5.3.2 Anàlisis d'implantació de llevats

Per a dur a terme l'anàlisi d'implantació de les soques de llevat inoculades: *Metschnikowia* (INITIA™, *Mp Vitis*, *Mp Berués* i *Mf Vitis* (no-*Saccharomyces*)) i P29 (*S. cerevisiae*), es va fer una selecció de 12 colònies per cada punt de mostreig (96 h, meitat FA i final FA) tenint en compte la proporció de les colònies de cada morfologia i color en els recomptes obtinguts anteriorment en el medi agar WLN. A continuació, es va realitzar l'estudi del perfil de restricció de l'ADN mitocondrial (RFLP-mtDNA) de les colònies seleccionades (Guillamon et al., 1994) (veure Annex 2).

5.4 Anàlisis físico-químiques dels vins

Un cop acabades les FA, es va fer l'anàlisi dels paràmetres físico-químics bàsics dels vins obtinguts, determinant: grau alcohòlic (% v/v) mitjançant l'equip WineScan (Foss Iberia S.A., Barcelona, Espanya), els sucres residuals (g/L), àcid acètic (g/L), àcid màlic (g/L) i

àcid làctic (g/L) utilitzant l'equip Miura 200 (TDT S.L, Gavà, Espanya), pel que fa a l'acidesa total (g/L) i el pH (g/L) es van determinar amb l'equip CRISON Compact Titrator (CRISON instruments S.A., Barcelona, Espanya) i finalment, el sulfurós total amb l'equip CRISON Titromatic (CRISON instruments S.A., Barcelona, Espanya).

5.5 Anàlisi sensorial dels vins

Finalment, es va realitzar una anàlisi organolèptica descriptiva amb un panell de 4 tastadors on es van avaluar per una part descriptors d'intensitat i qualitat (color, olor, gust i post-gust) i per una altra, descriptors aromàtics (notes florals, fruita blanca, cítrica, fruita tropical...) dels 24 vins resultants amb l'ajuda d'una fitxa de tast (veure Annex 3).

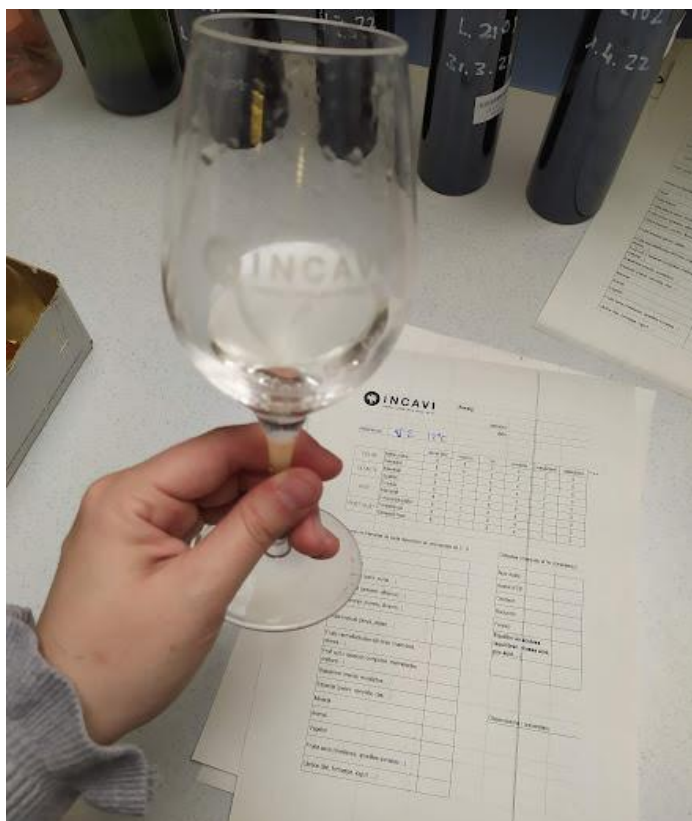


Figura 5 Tast del vi final per avaluar els descriptors generals i aromàtics amb l'ajuda d'una fitxa de tast.

6. Resultats

6.1 Diferenciació a nivell de soca de *M. fructicola*

Es va fer un estudi dels 12 aïllats de *M. fructicola* mitjançant la tècnica RAPD-PCR per diferencia'ls a nivell de soca, amb l'objectiu de seleccionar-ne un per inocular-lo en la fase prefermentativa de les microvinificacions (V6) a 8 °C i 12 °C. En la *figura 2* es mostren els patrons de bandes dels 12 aïllats corresponents a cada *primer* (M13, M14, COC, OPA02 i OPA09). En cadascuna de les imatges dels gels es van observar 7 perfils diferents: A, B, C, D, E, F, G i H coincidint amb un total de 7 localitzacions geogràfiques diferents d'on havien estat aïllades. La selecció de la soca a inocular es va basar en aquell perfil que més vegades s'havia repetit. Concretament, el perfil seleccionat va ser el D, corresponent a l'aïllat 12 (*Figura 6*).

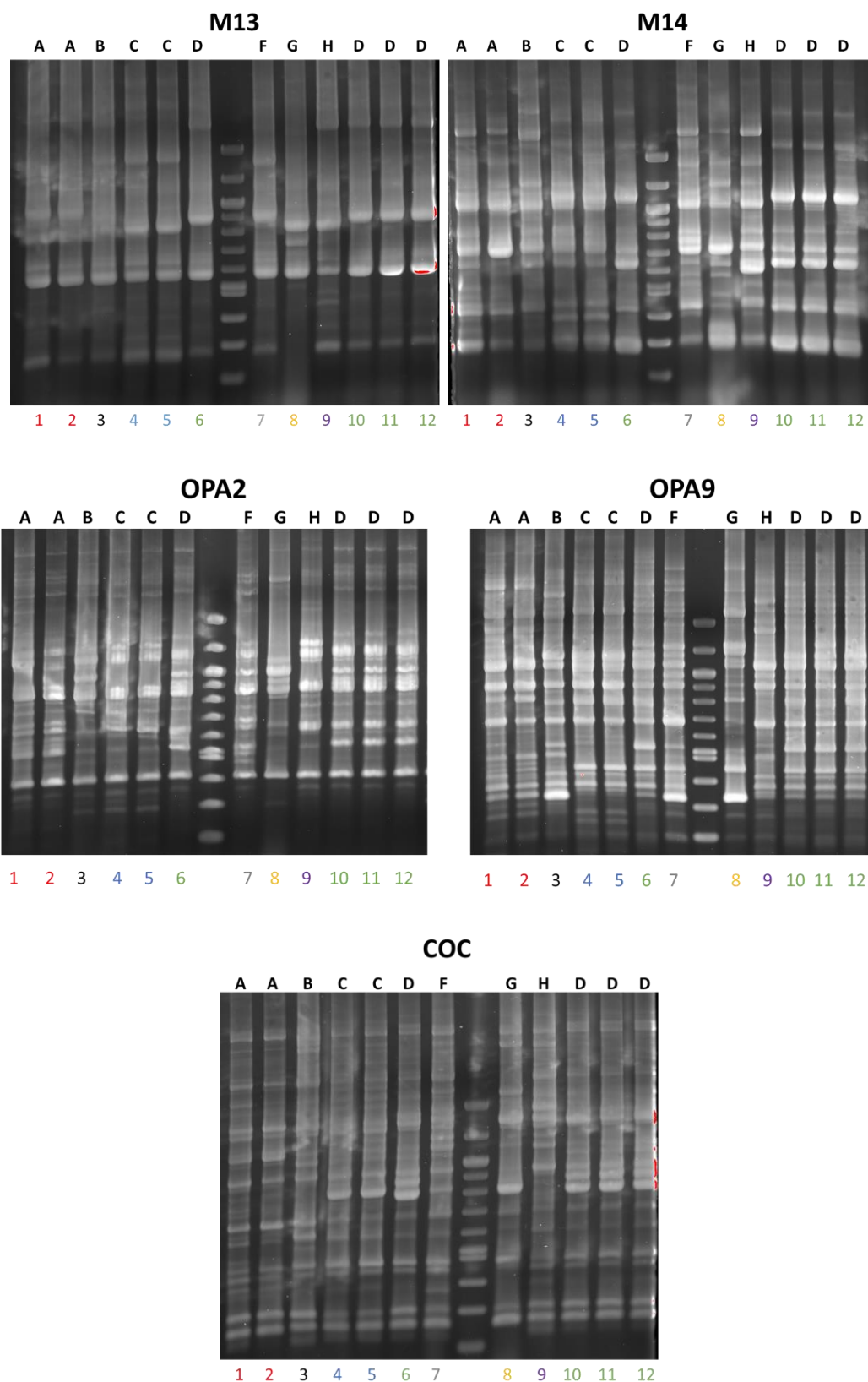


Figura 6 Perfils de bandes resultants de RAPD-PCR usant els primers M13, M14, COC, OPA02 i OPA09 dels 12 aïllats estudiats de *M. fructicola*.

6.2. Cinètica fermentativa de les microvinificacions

Per tal d'estudiar l'efecte bioprotector de *Metschnikowia*, es van inocular diferents soques (INITIA™, *Mp Vitis*, *Mp Berués* i *Mf Vitis*) en la fase prefermentativa durant 96 hores a dues temperatures diferents, 8 °C i 12 °C. En la *Figura 7* es mostren les cinètiques de fermentació de les microvinificacions expressades com a pèrdua de pes en funció del temps.

Durant les primeres 96 hores, *M. pulcherrima* i *M. fructicola* no fermenten, doncs son llevats no fermentatius i per tant no es va observar pèrdua de pes. Passades 96 hores, es va inocular *S. cerevisiae* P29 on hi va haver un increment del pes dels fermentadors degut a l'addició de volum de cultiu, i a partir de llavors va començar la FA pròpiament dita. Amb el transcurs dels dies es va poder observar un descens en el pes de les microvinificacions i transcorreguts 18 dies es van donar per finalitzades totes les fermentacions amb una concentració de sucres residuals inferior a 2 g/l. Tant la *Figura 7 A* (8°C) com la *Figura 7 B* (12°C) mostren que V5, inocularada amb *M.p Berués* durant la fase prefermentativa, presentava una cinètica de fermentació més lenta que la resta de condicions després de la inoculació de *S. cerevisiae*. La resta de microvinificacions no van mostrar diferències rellevants pel que fa al seguiment de la pèrdua de pes al llarg del temps.

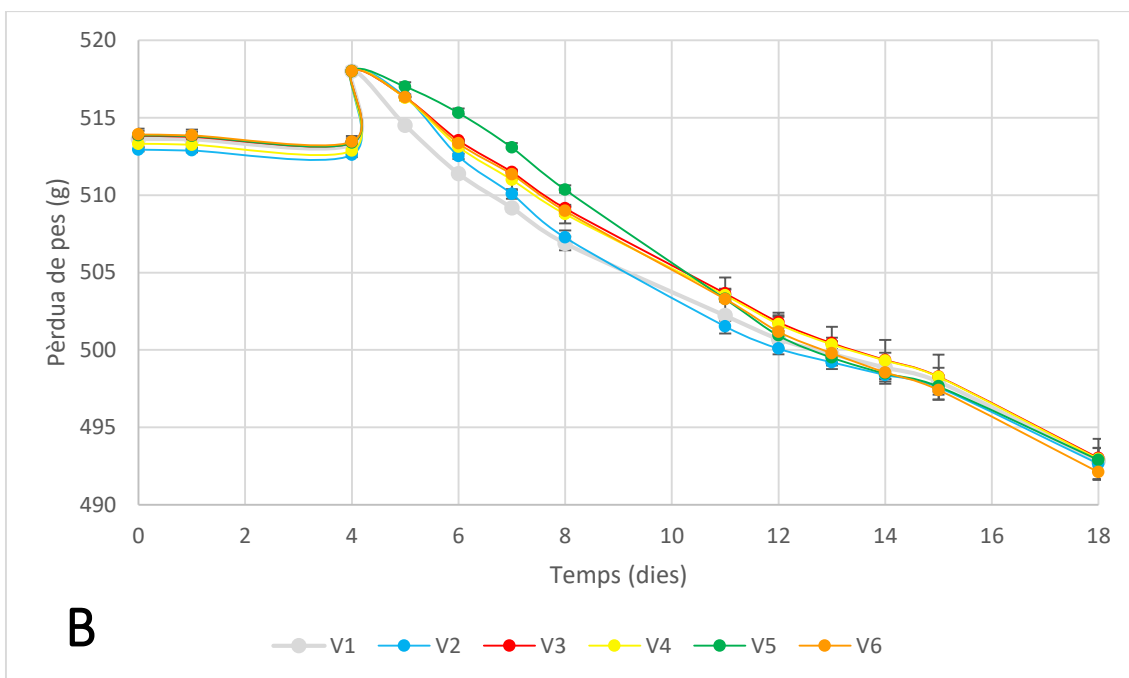
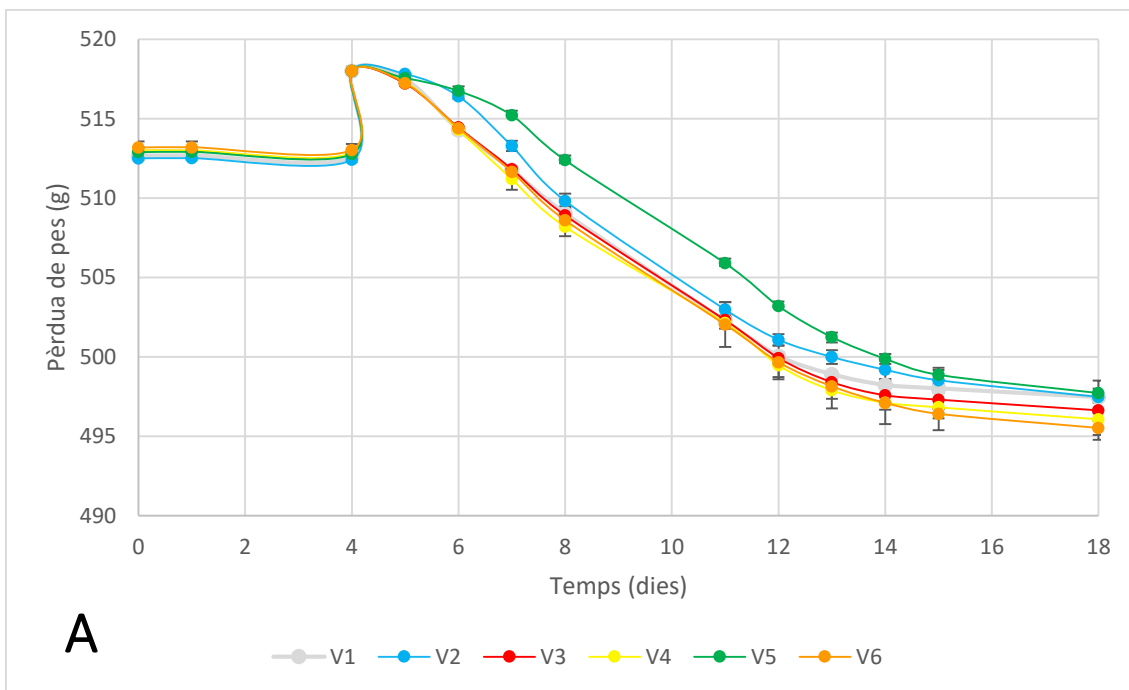


Figura 7 Cinètica fermentativa de les microvinificacions (V1, V2, V3, V4, V5 i V6), expressada com a pèrdua de pes en funció del temps. A) Fase prefermentativa a 8°C, B) Fase prefermentativa a 12°C.

6.3 Recompte de població de llevats

La *Figura 8* mostra els controls de la població microbiana de cadascuna de les microvinificacions duts a terme mitjançant recompte en placa de microorganismes viables en el medi de cultiu agar WLN, el qual conté FeCl_3 . Està descrit que les colònies de *Metschnikowia* crescudes en presència de ferro, adquireixen una tonalitat rosada causada per la secreció d'un pigment anomenat pulcherrimina que les permet diferenciar d'altres llevats (Sipiczki, 2006). Concretament, en aquest estudi es van observar diferents morfologies colonials: blanques grans (G), blanques petites (p), verdoses i rosades.

En general, tots els duplicats, tant els de les microvinificacions amb fase prefermentativa a 8 °C com a 12 °C, van mostrar una evolució molt semblant de la població de llevats al llarg de tota la FA.

Pel que fa als gràfics corresponents a les microvinificacions amb fase prefermentativa a 8°C, es pot veure com transcorregudes les 96 h, hi va haver una diferència d'un logaritme en la població total de llevats (colònies blanques grans (G) i blanques petites (p)) entre les microvinificacions V1 i V2. Aquest resultat concorda amb l'esperat ja que en la V2 s'havia addicionat SO_2 a l'inici de la FA, mentre que la microvinificació V1 no s'hi havia addicionat res, facilitant així el desenvolupament dels llevats indígenes. Cal relacionar aquest fet amb l'anàlisi d'implantació per veure si les colònies detectades corresponen majoritàriament a no-Sc o a Sc (veure apartat 6.4). Pel que fa a la resta de microvinificacions (V3, V4, V5 i V6) es van detectar $3 - 8 \cdot 10^6$ ufc/ml de colònies rosades, corresponents a *Metschnikowia*, $5 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^5$ ufc/ml de colònies blanques grans (G) i $1 \cdot 10^4 - 8 \cdot 10^4$ ufc/ml de colònies blanques petites (p), corresponents a altres llevats (no-Sc i Sc).

Un cop inoculada *S. cerevisiae* P29 i assolida la meitat de la FA es va observar un increment significatiu de les colònies no-rosades, concretament blanques ($5 \cdot 10^7$ ufc/ml) i verdoses ($1 - 5 \cdot 10^6$ ufc/ml) i que feien referència a la resta de llevats que no son *Metschnikowia*. D'altra banda, es va observar una disminució de 2 logaritmes de les colònies rosades en les V3, V4 i V5. No es van detectar colònies rosades en la vinificació V6 (*M. fructicola*).

Al final de la FA, no es va observar creixement de colònies rosades, degut a que les *Metschnikowia* no son capaces de sobreviure en graus alcohòlics tant elevats de final de la FA (Vicente et al., 2020). Pel que fa la resta de morfologies colonials detectades, es

van seguir observant colònies blanques i verdoses, de l'ordre de 10^6 ufc/ml i $5 \cdot 10^7$ ufc/ml, aproximadament.

Per altra banda, en els gràfics corresponents a les microvinificacions amb fase prefermentativa a 12°C (*Figura 8 B*), passades les 96 h, es van detectar colònies blanques grans (G) i blanques petites (p) en els testimonis amb i sense sulfurós (V1 i V2). Les poblacions de llevats a 12°C van ser, com era d'esperar, més elevades que a 8°C . I també, com era lògic, la vinificació V2 amb SO_2 presentava uns nivells més elevats que V1 (sense SO_2). En la resta de microvinificacions (V3, V4, i V6) es van detectar $5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$ ufc/ml de colònies rosades i un logaritme menys de colònies blanques grans (G) (3 - $8 \cdot 10^5$ ufc/ml). En la microvinificació V5, la diferència entre la quantitat de colònies rosades i blanques grans (G) era més notòria, de l'ordre de 2 logaritmes, $5 \cdot 10^6$ ufc/ml i $5 \cdot 10^4$ ufc/ml, respectivament. Aquesta tendència s'havia observat també a 8°C , podent hipotetitzar que la soca de *M. pulcherrima* Berués testada exerceix un efecte de bioprotecció més potent que les altres soques de *Mp* i *Mf* estudiades.

Un cop assolida la meitat de la FA, en les microvinificacions V1 i V2 es va observar un increment de la població de llevats respecte a les 96 h. Concretament, es van detectar de l'ordre de $5 \cdot 10^7$ ufc/ml de colònies blanques i $7 \cdot 10^7$ ufc/ml de colònies verdoses, probablement corresponents a *S. cerevisiae*. Pel que fa a les colònies rosades, aquestes van disminuir entre 1 i 2 logaritmes en les microvinificacions V3, V4, V5 i V6 mentre que se'n van detectar de verdoses i blanques (*S. cerevisiae*) al voltant de $1 \cdot 10^7$ ufc/ml i $5 \cdot 10^7$ ufc/ml, respectivament. En el cas de V5, inoculada amb *Mp* Berués, la relació entre colònies blanques i verdoses era diferent de la resta (V1, V2, V3, V4 i V6), sent en aquest cas $8 \cdot 10^7$ ufc/ml de colònies verdoses i $1 \cdot 10^6$ ufc/ml de colònies blanques aproximadament.

Al final de la FA, de la mateixa manera que s'observa en la *figura 3 A*, no es van detectar colònies rosades. Ara bé, es van detectar colònies verdoses i blanques amb una concentració aproximada d' $1 \cdot 10^7$ ufc/ml i $5 \cdot 10^7$ ufc/ml, respectivament, en les microvinificacions en V1, V2, V3, V4 i V5, mentre que en la V6 la concentració de colònies verdoses va ser d'un logaritme inferior.

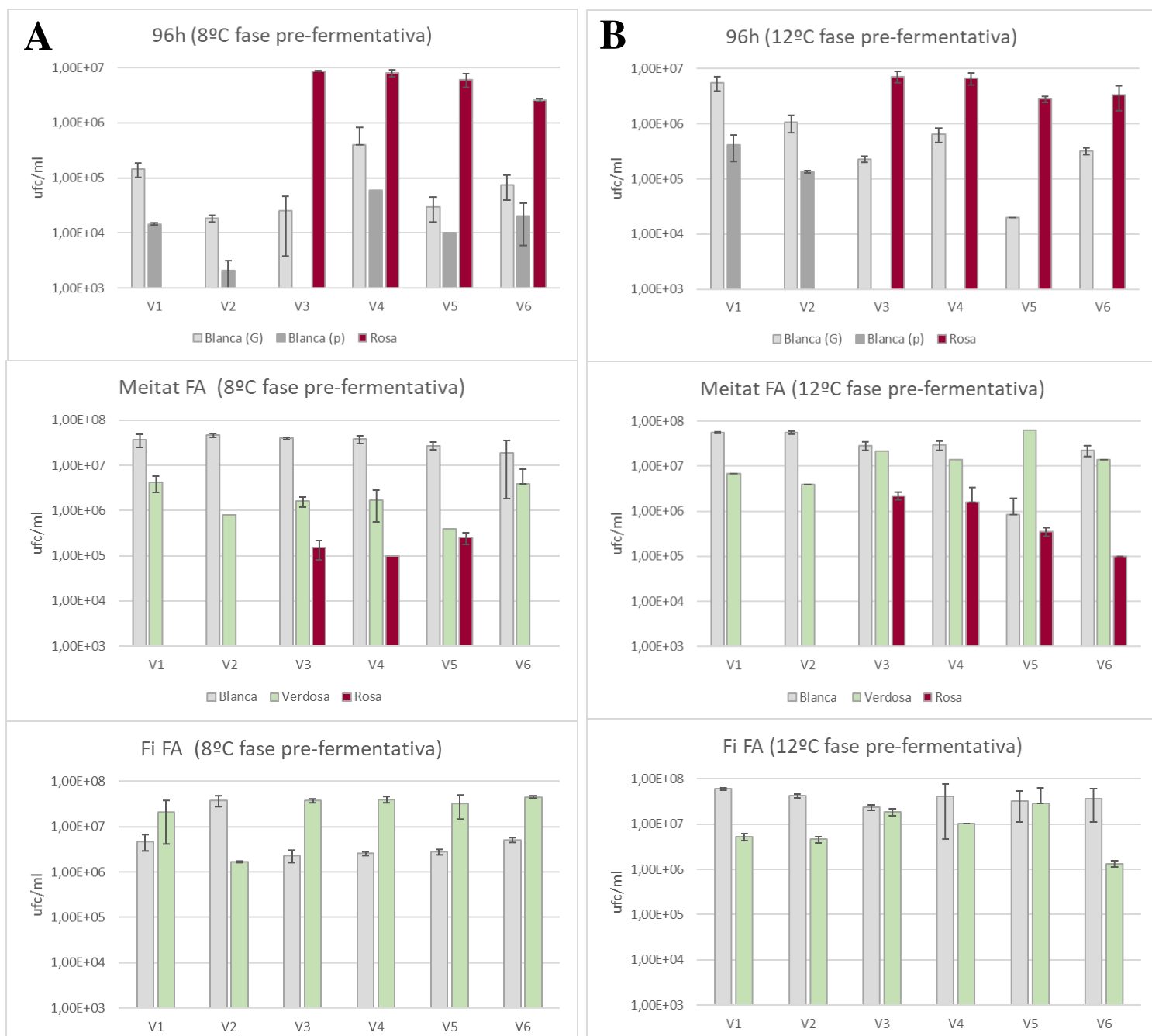


Figura 8 Representació de les poblacions de llevats en ufc/ml en els 3 mostreigs: 96 hores, 1/2 FA i final FA. A) Microvinificacions amb fase prefermentativa a 8 °C, B) microvinificacions amb fase prefermentativa a 12 °C.

6.4. Anàlisi d'implantació de llevats

En les *Taules 4 i 5* es presenten els resultats d'implantació de les soques de llevat inoculades: *Metschnikowia* (INITIA™, *Mp Vitis*, *Mp Berués* i *Mf Vitis* (no-*Saccharomyces*)) i P29 (*S. cerevisiae*), obtinguts a partir de l'estudi del perfil de restricció de l'ADN mitocondrial d'una població de llevats representativa (12 colònies per punt de mostreig) en diferents punts de la FA: transcorregudes 96 h de fase prefermentativa (abans d'inocular *Sc P29*), meitat FA i final FA. L'elecció de les 12 colònies per a l'anàlisi d'implantació per a cada microvinificació ens els 3 punts de mostreig, es va dur a terme en proporció de la tipologia de colònies dels recomptes de llevats obtinguts en l'apartat 6.3.

També es van analitzar els perfils dels patrons de *Mp* INITIA™, *Mp Vitis*, *Mp Berués* i *Mf Vitis* inoculades en V3, V4, V5 i V6, respectivament, i de la soca de *S. cerevisiae* P29, a partir de cultius purs (*Figura 9*) per tal de poder identificar aquells perfils patró que corresponguessin a les diferents soques inoculades.

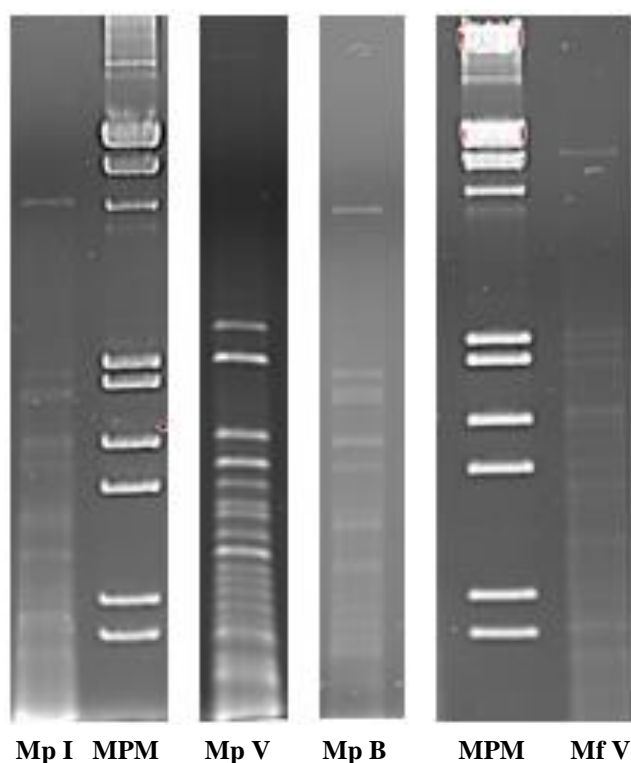


Figura 9 Perfils de restricció de les soques de *Metschnikowia*: *Mp* INITIA™ (*Mp I*), *Mp Vitis* (*Mp V*), *Mp Berués* (*Mp B*) i *Mf Vitis* (*Mf V*) inoculades en V3, V4, V5 i V6, respectivament. En els carrils 2 i 5 hi ha present el marcador de pes molecular (MPM).

En la *taula 4*, es mostren els percentatges d'implantació de les diferents soques inoculades en les microvinificacions amb fase prefermentativa a 8 °C.

Els perfils obtinguts a 96 h abans de la inoculació de *S. cerevisiae*, van mostrar una implantació del 100% de les soques de *Metschnikowia* (INITIA™, *Mp Vitis*, *Mp Berués* i *Mf Vitis*) inoculades inicialment en V3, V4, V5 i V6. En les microvinificacions testimoni amb i sense sulfurós (V1 i V2), només es van detectar altres llevats *Saccharomyces cerevisiae* indígenes, però cap no-*Saccharomyces* indígena. Aquests resultats poden ser deguts a que els mostos s'havien mantingut congelats durant varis mesos, podent provocar la pèrdua de viabilitat d'aquest grup de llevats. A més, al deixar temperar el most de Xarel·lo durant 72 h va possibilitar el desenvolupament de *Saccharomyces* indígenes.

A meitat de FA, V1 va mostrar una implantació de 75% de *S. cerevisiae* P29 i un 25% d'altres *Saccharomyces* indígenes, mentre que en V2, *S. cerevisiae* P29 no es va implantar i el 100% corresponia a altres llevats *Saccharomyces* indígenes. Es creu que això podria ser degut a l'excessiva presència de SO₂ lliure en el medi que podia haver inhibit el desenvolupament de la P29. Pel que fa a V3, V4, V5 i V6, es va observar un grau d'implantació superior al 78% de *S. cerevisiae* P29 i la resta d'altres llevats *Saccharomyces* indígenes. Només en la V5 es va determinar un 8,33% de *Mp Berués*, coincidint en què era la microvinificació que a meitat de FA va mostrar un recompte de població de *Metschnikowia* més elevats ($4 \cdot 10^5$ ufc/ml) (veure *figura 3 A*).

A final de FA es van observar resultats molt semblants a meitat de FA, amb petits increments i disminucions del percentatge d'implantació de *S. cerevisiae* P29 i d'altres llevats, sense ser significatius. Coincidint amb els resultats de recompte de llevats a final de FA, no es va detectar cap perfil dels avaluats que correspongués a cap soca de *Metschnikowia* inoculada.

Taula 4 Implantació de les diferents soques de llevats (Sc P29, Metschnikowia) en els diferents punts de mostreig: 96 hores, 1/2 FA i final FA en fase prefermentativa a 8 °C.

Vinificació	Condicció	Implantació 96 h	Implantació 1/2 FA	Implantació Fi Fa
V1	Testimoni SO2 (-)	100 % altres Sc (19)	25 % altres Sc (5) 75 % P29	31,25 % altres Sc (5) 68,75 % P29
V2	Testimoni SO2 (+)	100 % altres Sc (6)	100 % altres Sc (7)	100 % altres Sc (6)
V3	Mp I + Sc	100 % <i>Metschnikowia</i>	95,45 % P29 4,54 % altres Sc (1)	92,86 % P29 7,14 % altres Sc (1)
V4	Mp V + Sc	100 % <i>Metschnikowia</i>	78,79 % P29 17,04 % altres Sc (3)	87,5 % P29 12,5 % altres Sc (2)
V5	Mp B + Sc	100 % <i>Metschnikowia</i>	83,33 % P29 8,33 % <i>Metschnikowia</i> 8,33 % altres Sc (2)	93,75 % P29 6,25 % altres Sc (1)
V6	Mf V + Sc	100 % <i>Metschnikowia</i>	87,5 % P29 12,5 % altres Sc (3)	70,83 % P29 29,17 % altres Sc (3)

(). Número de soques diferents respecte el total d'altres llevats Sc.

En la *taula 5*, es mostren els percentatges d'implantació de les diferents soques inoculades en les microvinificacions amb fase prefermentativa a 12 °C.

A les 96 h, en les microvinificacions testimoni amb sulfurós i sense (V1 i V2), només es van detectar altres llevats *Saccharomyces* indígenes. D'altra banda, en aquest cas, la implantació de les soques de *Metschnikowia* en V3, V4, V5 i V6 va ser molt elevada, d'entre un 87,5% i un 100%. L'efecte de la temperatura més elevada (12 °C) amb relació a l'altra condició (8°C) fa que la implantació de *Mp* i *Mf* no sigui total en tots els casos a causa de la probabilitat més gran de desenvolupament de llevats indígenes a 12 °C.

A meitat de FA, en el testimoni sense sulfurós, V1, no es van detectar llevats *S. cerevisiae* P29 de les colònies analitzades, el 100% corresponien a altres llevats *Saccharomyces* indígenes. En V2 hi va haver una implantació de Sc P29 del 8,33% a diferència de la mateixa microvinificació amb fase prefermentativa a 8°C, que va resultar del 0%. Els resultats indiquen que en les microvinificacions amb una fase prefermentativa a una major temperatura (12 °C), es va facilitar el desenvolupament de llevats indígenes que van competir amb la soca de *S. cerevisiae* P29 inoculada, impeding la seva implantació. D'altra banda, el percentatge d'implantació de *Metschnikowia* en les microvinificacions V3, V4 i V6 a meitat de la FA és més elevat que en aquestes mateixes amb fase prefermentativa a 8 °C. En el seu lloc es va detectar un grau d'implantació de *S. cerevisiae* P29 menor en general. Els resultats suggereixen que la temperatura pot tenir un efecte positiu en el desenvolupament i en conseqüència en la implantació de les soques de *Metschnikowia* durant la fase prefermentativa. Finalment, la microvinificació V5, inoculada inicialment amb *Mp* Berués, va presentar el millor grau d'implantació de *S. cerevisiae* P29 respecte a la resta de microvinificacions amb un 87,5%.

A final de la FA, els percentatges d'implantació dels testimonis sense i amb sulfurós (V1 i V2) es continuaven mantenint de manera similar. De la mateixa manera, V3, V4, V5 i V6 van obtenir uns percentatges d'implantació de *S. cerevisiae* P29 i altres *Saccharomyces* semblants, amb algunes petites variacions, que els obtinguts a meitat de FA.

Cal destacar que de les colònies seleccionades, majoritàriament aquelles que tenien coloració blanca corresponien a altres llevats *Saccharomyces* indígenes i aquelles que tenien una tonalitat verdosa corresponien a la soca de *S. cerevisiae* P29. Un cas molt clar és la microvinificació V5 a meitat de la FA amb fase prefermentativa a 12°C. En la *figura*

3 B (veure apartat 6.3) es pot veure com hi va haver un increment de colònies verdoses respecte a les blanques en V5, fet que es veu reflectit també en el percentatge d'implantació de *S. cerevisiae* P29 en aquesta mateixa microvinificació mostrat a la *taula* 5.

Taula 5 Implantació de les diferents soques de llevats (Sc P29, *Metschnikowia* i altres Sc) en els diferents punts de mostreig: 96 hores, 1/2 FA i final FA en fase prefermentativa a 12°C

Vinificació	Condicció	Implantació 96 h	Implantació ½ FA	Implantació Fi Fa
V1	Testimoni SO2 (-)	100 % altres Sc (11)	100 % altres Sc (9)	100 % altres Sc (9)
V2	Testimoni SO2 (+)	100 % altres Sc (5)	91,67 % altres Sc (6) 8,33 % P29	86,61 % altres Sc (2) 13,29 % P29
V3	Mp I + Sc	95,45 % <i>Metschnikowia</i> 4,54 % altres Sc (1)	35,23 % P29 17,42 % <i>Metschnikowia</i> 47,35 % altres Sc (9)	68,75 % altres Sc (5) 31,25 % P29
V4	Mp V + Sc	91,66 % <i>Metschnikowia</i> 8,33 % altres Sc (2)	83,33 % altres Sc (14) 12,50 % <i>Metschnikowia</i> 4,17 % P29	75 % altres Sc (8) 25 % P29
V5	Mp B + Sc	100 % <i>Metschnikowia</i>	87,5 % P29 8,33 % <i>Metschnikowia</i> 4,17 % altres Sc (1)	93,75 % P29 6,25 % altres Sc (1)
V6	Mf V + Sc	87,5 % <i>Metschnikowia</i> 12,5 % altres Sc (3)	70,83 % altres Sc (8) 25 % P29 4,17 % <i>Metschnikowia</i>	62,5 % P29 37,5 % altres Sc (4)

(). Número de soques diferents respecte el total d'altres llevats Sc.

Al final de la fermentació es va observar una certa terbolesa en les microvinificacions (*Figura 10 B*), això és a causa dels mateixos llevats o a la matriu del most. Per a obtenir uns vins finals de millor qualitat es va realitzar una clarificació amb gelatina i bentonita. Comparant la *figura 10 B* amb la *figura 11 B* es pot veure com la clarificació fa disminuir considerablement la terbolesa i millora el color i l'aspecte del vi elaborat.

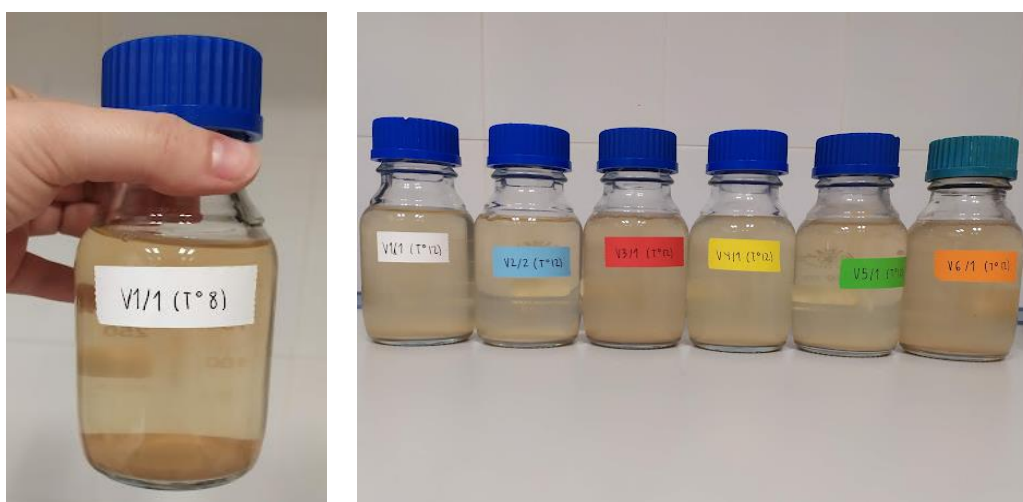


Figura 10 Microvinificació V1/1 (fase pr-fermentativa a 8°C) al final de la FA. B) Microvinificacions (fase prefermentativa a 12°C) al final de la FA..

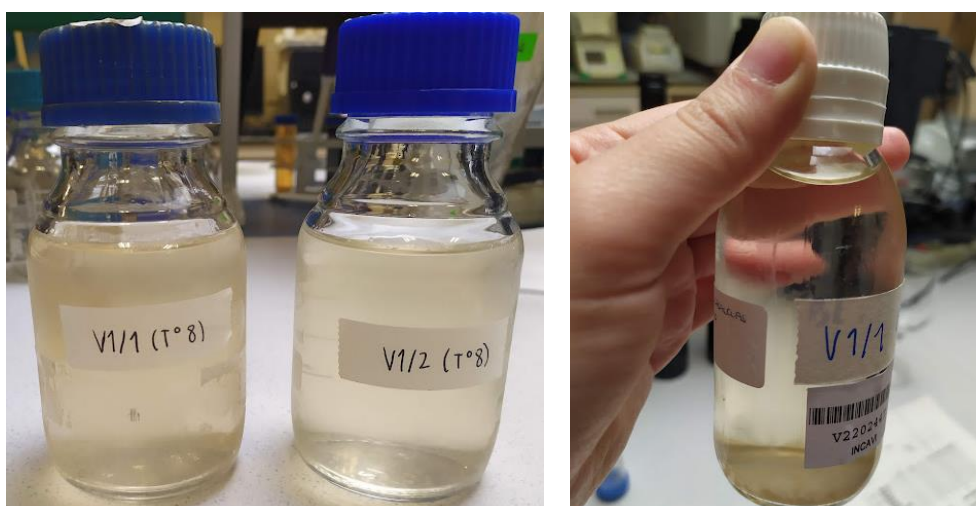


Figura 11 A) Duplicats de V1 (testimoni sense sulfurós), després d'haver-hi afegit la gelatina i la bentonita amb repòs en fred durant 48 h. B) Vi final després de la clarificació i decantació.

6.5 Anàlisis físico-químiques dels vins

Un cop finalitzades les FA es va procedir a la caracterització físico-química dels vins (*Taules 6 i 7*).

Els resultats obtinguts mostren que en les microvinificacions amb fase prefermentativa a 8 °C (*Taula 6*), l'àcid acètic va ser significativament major en el testimoni sense sulfurós, aquest increment pot ser degut a l'absència de l'addició de sulfurós a l'inici de la fermentació. Pel que fa al glicerol, es va observar una diferència significativa entre el testimoni sense sulfurós (V1) i la resta de vinificacions (V2, V3, V4, V5 i V6) amb fase prefermentativa a 8 °C, amb una tendència clara en contingut més elevat de glicerol en les fermentacions dutes a terme amb bioprotecció amb *Mp* o *Mf*. En les microvinificacions de la *taula 7*, les quals es van mantenir a 12 °C durant la fase prefermentativa, no es van veure aquestes diferències entre la microvinificació testimoni sense sulfurós i la resta de microvinificacions pel que fa a l'àcid acètic i el glicerol. En estudis anteriors on es van utilitzar soques de *M. pulcherrima* com a cultiu multi-estàrter amb *S. cerevisiae*, s'havia observat un augment en la producció de glicerol en aquells vins on s'havia emprat aquest cultiu mixt (Comitini et al., 2011).

Totes les microvinificacions van acabar amb una concentració de sucres inferior a 1 g/l així com un valor de pH entre 2,92-2,97. La resta de paràmetres (acidesa total (AT), grau alcohòlic (GAV), àcid màlic i àcid làctic) no van presentar diferències significatives entre microvinificacions, tant les que s'havien mantingut a 8 °C o a 12 °C durant la fase prefermentativa (96 h). Finalment, en les microvinificacions V2 (8 °C i 12 °C), en la qual s'havia addicionat inicialment 30 mg/l de sulfurós lliure, es va detectar un SO₂ total residual significativament major que la resta de microvinificacions.

Taula 6 Anàlisi físico-químic de les microvinificacions amb fase prefermentativa a 8°C. Es mostren els paràmetres físico-químics bàsics: sucres (G+F) (g/l), grau alcohòlic (GAV) (% (v/v)), pH, acidesa total (AT)(g/l), àcid acètic (g/l), àcid màlic (g/l), àcid làctic (g/l), glicerol (g/l) i SO₂ total (mg/l). Els resultats son la mitjana ± desviació estàndard de dos assajos independents. Els valors que contenen diferents lletres en el superíndex (^{a, b}) dins de cada columna, son significativament diferents segons ANOVA, test Tuckey p<0,05.

V (8°C)	Sucres (G+F) g/l	GAV % (v/v)	pH	AT (g/l)	Àc. Acètic (g/l)	Àc. Màlic (g/l)	Àc. Làctic (g/l)	Glicerol (g/l)	SO₂ T (mg/l)
V1	0,50±0,00 ^a	9,70±0,13 ^a	2,94±0,00 ^a	6,10±0,28 ^a	0,33±0,01 ^a	1,40±0,00 ^a	0,10±0,00 ^a	4,70±0,14 ^a	16,0±1,41 ^a
V2	0,50±0,00 ^a	9,37±0,02 ^b	2,95±0,00 ^a	6,35±0,21 ^a	0,19±0,01 ^b	1,55±0,07 ^a	0,10±0,00 ^a	4,90±0,14 ^b	42,0±0,00 ^b
V3	0,60±0,00 ^a	9,72±0,04 ^a	2,96±0,01 ^a	6,15±0,07 ^a	0,19±0,03 ^b	1,50±0,00 ^a	0,10±0,00 ^a	5,35±0,07 ^b	15,5±2,12 ^a
V4	0,60±0,00 ^a	9,75±0,02 ^a	2,97±0,01 ^a	5,95±0,21 ^a	0,18±0,02 ^b	1,45±0,07 ^a	0,10±0,00 ^a	5,40±0,00 ^b	17,0±0,00 ^a
V5	0,50±0,00 ^a	9,64±0,06 ^a	2,97±0,02 ^a	5,90±0,00 ^a	0,21±0,01 ^b	1,45±0,07 ^a	0,10±0,00 ^a	5,25±0,21 ^b	14,0±1,41 ^a
V6	0,50±0,00 ^a	9,71±0,11 ^a	2,95±0,00 ^a	6,10±0,14 ^a	0,20±0,01 ^b	1,45±0,07 ^a	0,10±0,00 ^a	5,30±0,00 ^b	16,0±1,41 ^a

Les incerteses dels paràmetres mesurats son les següents: Àc. Làctic i àc Màlic: ±0,2 g/l; Glicerol: ±0,5 g/l; Grau alcohòlic (GAV): ±0,11% v/v; Acidesa total (AT): ±0,2 g/l; Sucres: ±0,2 g/l; SO₂: 42 ±8 i 14-17±3 mg/l; Àc. Acètic: 0,18-0,26 ±0,04 g/l i >0,27 ±0,05 g/l.

Taula 7 Anàlisi físico-químic de les microvinificacions amb fase prefermentativa a 12°C. Es mostren els paràmetres físico-químics bàsics: sucres (G+F) (g/l), grau alcohòlic (GAV) (% (v/v)), pH, acidesa total (AT)(g/l), àcid acètic (g/l), àcid màlic (g/l), àcid làctic (g/l), glicerol (g/l) i SO₂ total (mg/l). Els resultats són la mitjana ± desviació estàndard de dos assajos independents. Els valors que contenen diferents lletres en el superíndex (^{a, b}) dins de cada columna, són significativament diferents segons ANOVA, test Tuckey $p < 0,05$.

V (12°C)	Sucres (G+F) g/l	GAV % (v/v)	pH	AT (g/l)	Àc. Acètic (g/l)	Àc. Màlic (g/l)	Àc. Làctic (g/l)	Glicerol (g/l)	SO₂ T (mg/l)
V1	0,90±0,014 ^a	9,60±0,03 ^a	2,92±0,00 ^a	6,75±0,07 ^a	0,20±0,01 ^a	1,75±0,01 ^a	0,10±0,00 ^a	5,25±0,07 ^a	17,0±0,00 ^a
V2	0,50±0,00 ^a	9,55±0,09 ^a	2,94±0,01 ^a	6,35±0,21 ^a	0,21±0,01 ^a	1,7±0,14 ^a	0,10±0,00 ^a	4,85±0,21 ^a	44,5±2,12 ^b
V3	0,50±0,00 ^a	9,51±0,08 ^a	2,96±0,01 ^a	6,20±0,00 ^b	0,21±0,03 ^a	1,65±0,07 ^a	0,10±0,00 ^a	5,00±0,14 ^a	13,0±1,41 ^a
V4	0,75±0,21 ^a	9,57±0,09 ^a	2,96±0,01 ^a	6,10±0,14 ^b	0,18±0,03 ^a	1,75±0,07 ^a	0,10±0,00 ^a	5,35±0,07 ^a	16,5±0,71 ^a
V5	0,50±0,00 ^a	9,54±0,04 ^a	2,96±0,01 ^a	6,20±0,00 ^b	0,26±0,00 ^a	1,5±0,00 ^a	0,10±0,00 ^a	5,35±0,21 ^a	15,0±1,41 ^a
V6	0,5±0,00 ^a	9,62±0,05 ^a	2,97±0,02 ^a	5,80±0,01 ^b	0,20±0,01 ^a	1,4±0,00 ^a	0,10±0,00 ^a	4,90±0,14 ^a	14,5±3,54 ^a

Les incerteses dels paràmetres mesurats són les següents: Àc. Làctic i àc Màlic: ±0,2 g/l; Glicerol: ±0,5 g/l; Grau alcohòlic (GAV): ±0,11% v/v; Acidesa total (AT): ±0,2 g/l; Sucres: ±0,2 g/l; SO₂: 44 ±8 i 13-17±3 mg/l; Àc. Acètic: 0,18-0,26 ±0,04 g/l.

6.6 Anàlisi sensorial dels vins

Els resultats de l'anàlisi organolèptica descriptiva dels vins es mostren en les *Figures 12* i *13*.

Pel que fa als descriptors generals de les microvinificacions amb fase prefermentativa a 8 °C (*Figura 12 A*), tots els vins tenien una aroma i gust correcte. Una de les microvinificacions millor valorada pels tastadors va ser la V5, inoculada inicialment amb *Mp* Berués, la qual va obtenir la puntuació més alta en els descriptors: entrada, intensitat i equilibri del gust; intensitat i qualitat d'aroma i sensació final. Respecte als descriptors aromàtics (notes florals, fruita blanca, cítrica, tropical...) (*Figura 12 B*), els vins obtinguts tendien cap a característiques afruitades, ja que els tastadors van donar major puntuació als descriptors: fruita fresca i fruita blanca. Les microvinificacions V2 i V5 van rebre gairebé dos punts més en els descriptors fruita amb pinyol i fruita tropical en comparació amb la resta de microvinificacions (V1, V3, V4 i V6).

En la *Figura 13 A* estan representats els descriptors generals de les microvinificacions amb fase prefermentativa a 12 °C. La majoria de descriptors van rebre una puntuació lleugerament més elevada que en les microvinificacions amb fase prefermentativa a 8 °C. Concretament, la microvinificació V4, inoculada inicialment amb *Mp* Vitis va destacar més en els següents descriptors: intensitat, evolució/equilibri i persistència post-gust, tots ells referents al gust. En canvi, la microvinificació V6, inoculada inicialment amb *Mf* Vitis, va rebre millor puntuació en els descriptors d'intensitat i qualitat de l'aroma i sensació final. Respecte als descriptors aromàtics (*Figura 13 B*), es pot veure com, de nou, els vins tendien a aromes afruitades (fruita fresca i fruita blanca). Cal destacar que els tastadors van puntuar millor les microvinificacions V4 i V6, inoculades inicialment amb *Mp* Vitis i *Mf* Vitis respectivament, pels descriptors aromàtics de fruita amb pinyol i fruita tropical.

Al tractar-se de vins blancs, altres descriptors aromàtics com fruits vermells o balsàmics no van ser detectats pels tastadors en cap de les dues temperatures en fase prefermentativa, ja que son descriptors aromàtics característics dels vins negres.

Una característica comuna en les *Figures 12 B* i *13 B*, és que les microvinificacions en les dues condicions de temperatura en fase prefermentativa van obtenir puntuacions altes en descriptors afruitats. En altres estudis, es va veure com *M. pulcherrima* contribuïa a millorar els perfils aromàtics dels vins gràcies a la producció de compostos volàtils com

acetat de fenil-etil, responsable de aromes dolces i florals, que en quantitats moderades contribueixen a la millora dels perfils aromàtics dels vins (Escribano et al., 2018).

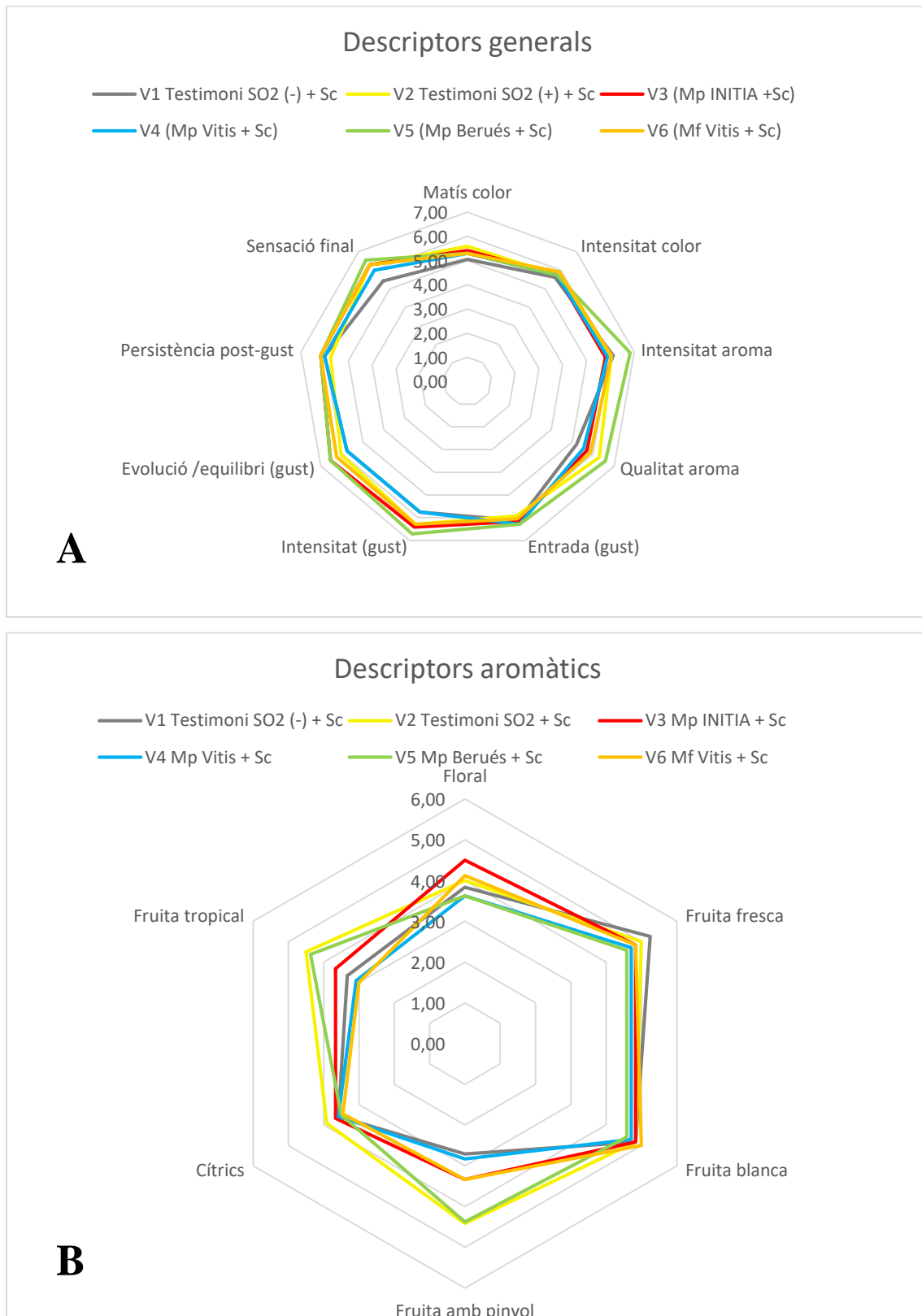


Figura 12 Anàlisi sensorial de les microvinificacions amb fase prefermentativa a 8 °C. A) Descriptors generals B) descriptors aromàtics.

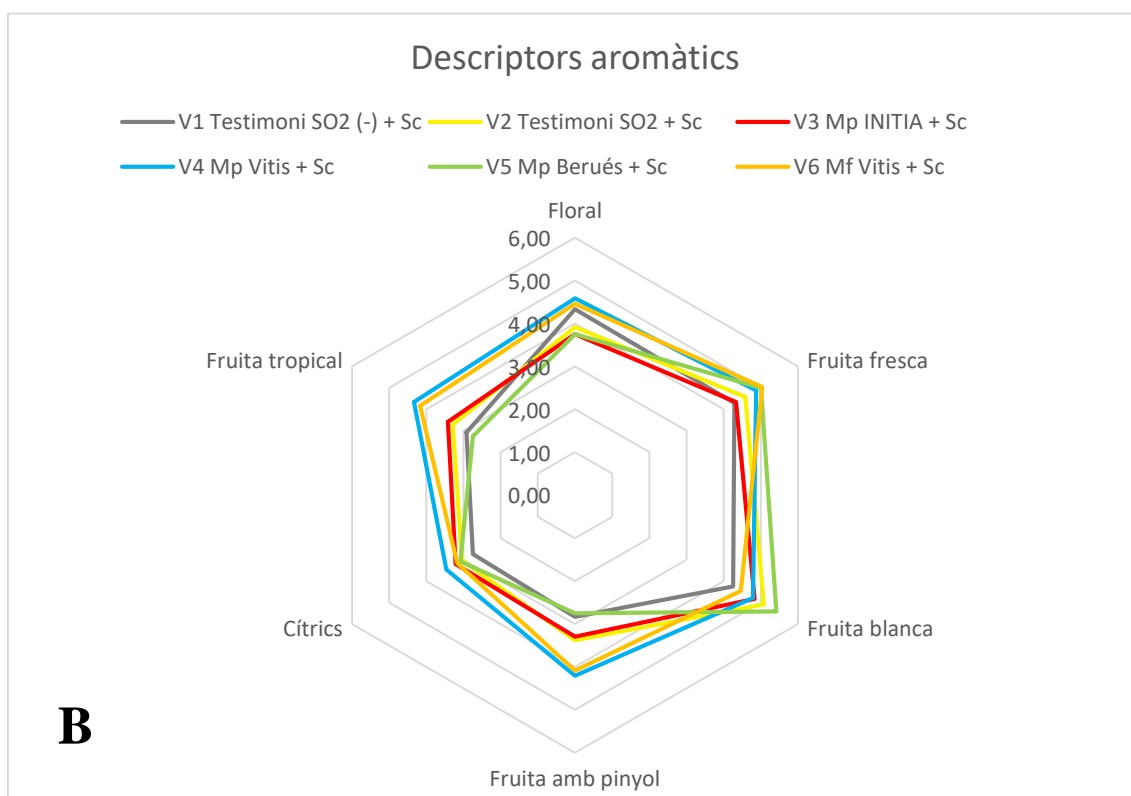
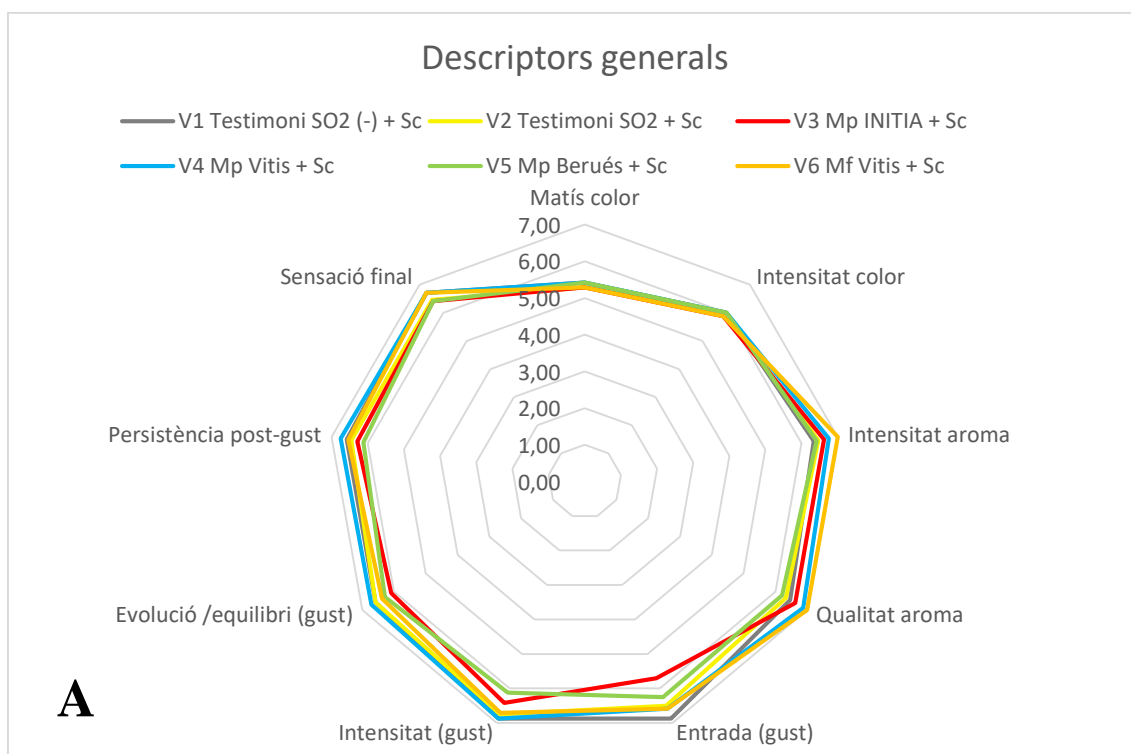


Figura 13 Anàlisi sensorial de les microvinificacions amb fase prefermentativa a 12 °C. A) Descriptors generals B) descriptors aromàtics

7. Conclusions

Es confirma la hipòtesi plantejada en alguns dels casos estudiats en aquest treball. La soca *Mp* Berués sembla tenir un paper de bioprotecció en prefermentació òptim, frenant el desenvolupament de llevats indígenes les primeres 96 h abans d'iniciar la FA tant a 8 °C com a 12 °C. Aquesta soca en concret, és la que ha donat millors resultats en el biocontrol de la microbiota indígena i en la implantació de *S. cerevisiae* P29.

L'efecte de la temperatura també és un factor a tenir en compte, ja que la bioprotecció a 8 °C sembla funcionar millor que l'efectuada a 12 °C. Els llevats indígenes presents al most van poder desenvolupar-se millor en una temperatura lleugerament més elevada, fet que va dificultar la implantació de les soques de *Metschnikowia* abans de la fermentació.

També es va veure com la presència de *Metschnikowia* com agent bioprotector tendia a incrementar la concentració de glicerol en els vins finals a 8 °C durant les primeres 96 h de prefermentació. No es van detectar altres diferències significatives importants pel que fa a l'anàlisi fisico-química de les microvinificacions.

En l'anàlisi sensorial, la microvinificació on s'hi havia inoculat la soca de *Mp* Berués (V5) a 8 °C durant les primeres 96 h, va destacar en els descriptors aromàtics respecte a les altres soques de tal manera que el vi resultant va ser valorat d'igual manera que aquell on se li havia afegit SO₂.

La soca *Mp* Berués va destacar tant pel que fa a la implantació com sensorialment. A més, s'ha vist que és recomanable utilitzar temperatures més baixes a l'hora d'aplicar un tractament de bioprotecció amb inoculació de llevats en fase prefermentativa.

8. Autoavaluació

Durant la meua estada de pràctiques a l'INCAVI, on també he tingut l'oportunitat de fer aquest treball, he posat en pràctica alguns dels coneixements que he adquirit estudiant el Grau de Biotecnologia. Ha estat una experiència molt enriquidora on he pogut estar en contacte amb gent experta en la recerca enològica de Catalunya. Finalitzar aquest treball no només vol dir que demostro els meus coneixements sinó que he complert els objectius que em vaig proposar cinc anys enrere al matricular-me en aquest grau, superant tots els obstacles que m'he trobat pel camí. Encara he de millorar alguns aspectes com ara la

constància i la dedicació, però finalitzar aquesta etapa em motiva a continuar ampliant la meva formació en aquest camp de la biotecnologia.

9. Bibliografia

- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2019). The Influence of Non-Saccharomyces Species on Wine Fermentation Quality Parameters. *Fermentation* 2019, Vol. 5, Page 54, 5(3), 54. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION5030054>
- Benucci, I., Cerreti, M., Liburdi, K., Nardi, T., Vagnoli, P., Ortiz-Julien, A., & Esti, M. (2018). Pre-fermentative cold maceration in presence of non-Saccharomyces strains: Evolution of chromatic characteristics of Sangiovese red wine elaborated by sequential inoculation. *Food Research International*, 107, 257–266. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.02.029>
- Casas-Godoy, L., Arellano-Plaza, M., Kirchmayr, M., Barrera-Martínez, I., & Gschaedler-Mathis, A. (2021). Preservation of non-Saccharomyces yeasts: Current technologies and challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3464–3503. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12760>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.12.001>
- Contreras, A., Curtin, C., & Varela, C. (2015). Yeast population dynamics reveal a potential “collaboration” between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1885–1895. <https://doi.org/10.1007/S00253-014-6193-6>
- Cordero-Bueso, G., Mangieri, N., Maghradze, D., Foschino, R., Valdetara, F., Cantoral, J. M., & Vigentini, I. (2017). Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02025/FULL>
- Divol, B., du Toit, M., & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3), 601–613. <https://doi.org/10.1007/S00253-012-4186-X/FIGURES/4>

- 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. *Journal of Applied Microbiology*, *124*(6), 1521–1531. <https://doi.org/10.1111/JAM.13735>
- González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2017). Genetic and phenotypic intraspecific variability of non-Saccharomyces yeasts populations from La Rioja winegrowing region (Spain). *Journal of Applied Microbiology*, *122*(2), 378–388. <https://doi.org/10.1111/JAM.13341>
- Guillamon, J. M., Barrio, E., Huerta, T., & Querol, A. (1994). Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *44*(4), 708–714. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-708/CITE/REFWORKS>
- Kántor, A., Hutková, J., Petrová, J., Hleba, L., & Kačániová, M. (2016). Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *05*(03), 282–285. <https://doi.org/10.15414/JMBFS.2015/16.5.3.282-285>
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Tian, S., Hershkovitz, V., & Tworkoski, T. (2011). Effect of heat shock treatment on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Metschnikowia fructicola*. *FEMS Microbiology Ecology*, *76*(1), 145–155. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2010.01037.X>
- McKay, M., Buglass, A. J., & Gook Lee, C. (2010). Introduction: Overview of Fermentation and Microorganisms. *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects*, *1*, 65–71. <https://doi.org/10.1002/9780470976524.CH4>
- Morata, A., Escott, C., Bañuelos, M. A., Loira, I., del Fresno, J. M., González, C., & Suárez-lepe, J. A. (2019). Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to Wine Freshness. A Review. *Biomolecules* *2020*, Vol. 10, Page 34, *10*(1), 34. <https://doi.org/10.3390/BIOM10010034>

- Nadai, C., Fernandes Lemos, W. J., Favaron, F., Giacomini, A., & Corich, V. (2018). Biocontrol activity of *Starmerella bacillaris* yeast against blue mold disease on apple fruit and its effect on cider fermentation. *PLOS ONE*, *13*(9), e0204350. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0204350>
- Nardi, T. (2020). Microbial Resources as a Tool for Enhancing Sustainability in Winemaking. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 507, 8(4), 507. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8040507>
- Oro, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, *116*(5), 1209–1217. <https://doi.org/10.1111/JAM.12446>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008>
- Salaha, M. I., Kallithraka, S., Marmaras, I., Koussissi, E., & Tzourou, I. (2008). A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(8), 660–666. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2008.03.010>
- Simonin, S., Alexandre, H., Nikolantonaki, M., Coelho, C., & Tourdot-Maréchal, R. (2018). Inoculation of *Torulaspora delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking. *Food Research International*, *107*(February), 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.034>
- Sipiczki, M. (2006). *Metschnikowia* Strains Isolated from Botrytized Grapes Antagonize Fungal and Bacterial Growth by Iron Depletion. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(10), 6716. <https://doi.org/10.1128/AEM.01275-06>
- Tempère, S., Marchal, A., Barbe, J. C., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Marullo, P., & Albertin, W. (2018). The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2018 102:9, 102(9), 3995–4007. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-8914-8>

Vicente, J., Ruiz, J., Belda, I., Benito-Vázquez, I., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A., & Benito, S. (2020). The Genus *Metschnikowia* in Enology. *Microorganisms*, 8(7), 1–19. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8071038>

10 Annexos

Annex 1: Anàlisi RAPD-PCR No – *Saccharomyces* (González-Arenzana et al., 2017; Renault et al., 2009)

Extracció ADN

D'una placa amb colònies se'n pren una per cada vial amb una nansa groga i es fa créixer en 800 µl de YPD líquid durant 2 dies a 28°C. Abans de posar els vials a l'estufa, agitar en el vòrtex.

1. Centrifugar a 14.000 rpm 3 minuts.
2. Llençar sobrenedant i afegir 800 µl d'H₂O destil·lada estèril. Agitar en el vòrtex per resuspendre el pellet.
3. Centrifugar a 14.000 rpm 3 min.
4. Llençar el sobrenedant i afegir 300 µl de Tampó 1 (182 g/L Sorbitol, 200 ml/L EDTA 0.1 M, pH 7,5) i 40 µl de Liticasa (Sigma-Aldrich corp., Missouri, EUA).
5. Agitar per resuspendre el pellet i incubar en termomixer o bany a 37°C durant 30 minuts.
6. Centrifugar a 7.000 rpm 1 min.
7. Llençar el sobrenedant i resuspendre el pellet amb 300 µl en Tampó 2 (50 ml/L Tris 1M, 40 ml/L EDTA 0,5M, pH 7,4) i 50 µl de SDS al 10%. Agitar vigorosament amb el vòrtex.
8. Incubar a 65°C 15 minuts en el termomixer o bany.
9. Afegir 300 µl d'acetat potàssic, agitar vigorosament amb el vòrtex i posar els vials al congelador un mínim de 30 min.
10. Centrifugar 15 min a 14.000 rpm.
11. A l'acabar de centrifugar, traspasar per decantació el sobrenedant en un eppendorf d'1,5 ml que conté 600 µl d'isopropanol. Agitar els vials per inversió 2-4 vegades.
12. Centrifugar 10 min a 14.000 rpm.
13. Llençar el sobrenedant i rentar el petit sediment que ha quedat amb 300 µl EtOH al 70 % fred. Agitar per inversió, procurant desenganxar el pellet del fons del vial.
14. Centrifugar 5 min a 14.000 rpm.
15. Llençar el sobrenedant i fer spin amb la centrífuga i acabar d'assecar el pellet eliminant restes d'EtOH amb pipeta.

16. Afegir 15 µl de TE procurant que el pellet quedi ben cobert. Guardar els vials al congelador un mínim de 30 minuts.

RAPD-PCR

La reacció va tenir lloc en un volum final de 50 µL (48 µL de barreja amb 2 µL d'ADN extret) on cada barreja de reacció contenia 3mM MgCl₂, Buffer Taq 1X, 0,4 mg/ml BSA, 0,1 % Triton 100X, 12,5 mM dNTPs, 2,5U Taq-polimerase (Bioline, London, UK). Les concentracions dels primers van ser 2 µM per M13 i M14, 4 µM per OPA02 i OPA09 i 0,8 µM per COC. Finalment s'afegeix H₂O bd estèril fins a assolir els 50 µL. A GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) thermocycler was used for amplification. Following amplification, 10-µl samples of the PCR products were analysed on 1·5% agarose gels in TBE 0·5X at 110 V for 1·5 h, with Image Store (UVP) equipment (Bio-Rad, Madrid, Spain).

A continuació s'especifiquen les condicions (temperatura, temps i cicles) del programa RAPD-PCR per a cada *primer* (COC, M13, M14, OPA02 i OPA09).

Taula annex 1 Condicions de RAPD-PCR. Taula adaptada de (Renault et al., 2009).

Cicles PCR				
Primers	Desnaturalització	Cicle	Núm de cicles	Extensió
M13	94 °C, 5 min	D: 94°C, 1 min	40	72 °C, 5 min
		A: 45°C, 1 min		
		E: 72°C, 2 min		
M14	94 °C, 5 min	D: 94°C, 1 min	40	72 °C, 5 min
		A: 45°C, 1 min		
		E: 72°C, 2 min		
Coc	94 °C, 5 min	D: 94°C, 1 min	32	72 °C, 10 min
		A: 40°C, 1 min		
		E: 72°C, 2 min		
OPA02	94 °C, 5 min	D: 94°C, 1 min	39	72 °C, 10 min
		A: 36°C, 1 min		
		E: 72°C, 2 min		

OPA09	94 °C, 5 min	D: 94°C, 1 min	39	72 °C, 10 min
		A: 36°C, 1 min		
		E: 72°C, 2 min		

Condicions Electroforesis

Preparar els gels d'agarosa al 1,5 % (p/v) amb TBE 0,5X (Tris 0,089 M; Àcid Bòric 0,089 M; EDTA 0,002 M, pH 8,3) (Canvax, Córdoba, Espanya), usant Bromur d'etidi (Sigma-Aldrich corp., Missouri, EUA) com agent intercalant i Molecular Weight Marker 100pb (Roche, Mannheim, Alemanya) com a marcador de pes molecular. Visualitzar els gels gràcies al transil·luminador Gel Doc Go imaginge system de Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, EUA). Gràcies a la diferència de longitud i nombre de bandes obtingudes es poden diferenciar les diferents soques.

Annex 2: Anàlisi de restricció del ADN mitocondrial (Guillamon et al., 1994)

Extracció ADN

L'extracció d'ADN es va realitzar seguint el protocol descrit a l'annex 1.

Digestió del DNA total amb l'enzim de restricció Hinf I:

Abans de començar amb la digestió, treure els vials del congelador, deixar descongelar i resuspendre bé el pellet pipetejant varies vegades.

Per cada mostra:

- 1,5 µl de Tampó de Hinf I (New England BioLabs inc., Massachusetts, EUA)
- 1,5 µl de Hinf I (New England BioLabs inc., Massachusetts, EUA)
- 0,75 µl de RNasa (concentració 500 µg/ml) (Roche, Mannheim, Alemanya)

Aliquotar 3,8 µl DNA/vial:


1. Deixar els 3,8 µl de DNA en la paret del vial.
2. Fer spin per a què la gota vagi al fons del vial i es mescli amb el mix prèviament aliquotat.
3. Agitar amb el vòrtex.

4. Tornar a fer spin.
5. Posar el termomixer o bany a 37°C durant 3 hores.

Electroforesis mtDNA

Preparar els gels d'agarosa al 1 % (p/v) amb TBE 1X (Tris 0,089 M; Àcid Bòric 0,089 M; EDTA 0,002 M, pH 8,3) (Canvax, Córdoba, Espanya), usant Bromur d'etidi (Sigma-Aldrich corp., Missouri, EUA) com agent intercalant i Molecular Weight Marker III (Roche, Mannheim, Alemanya) com a marcador de pes molecular. Visualitzar els gels gràcies al transil·luminador Gel Doc Go imaging system de Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, EUA). Gràcies a la diferència de longitud i nombre de bandes obtingudes es poden diferenciar les diferents soques.

Annex 3: Fitxa de tast de l'anàlisi sensorial dels vins (INCAVI)

 INCAVI Institut Català de la Vinya i el Vi		Assaig:					
Referència:		tastador:					
		data:					
		excel·lent	molt bo	bo	correcte	insuficient	defectuos
COLOR	Matis (color)	8	6	5	3	2	0
	Intensitat	8	6	5	3	2	0
OLFACTE	Intensitat	8	7	6	4	2	0
	Qualitat	8	7	6	4	2	0
GUST	Entrada	8	7	6	4	2	0
	Intensitat	8	7	6	4	2	0
	Evolució/equilibri	8	7	6	4	2	0
POST GUST	Persistència	8	7	6	4	2	0
	Sensació final	8	7	6	4	2	0
Valoreu la intensitat de cada descriptor en una escala de 0 - 9					Defectes (marqueu si ho considereu)		
Floral						Àcid Acètic	
Fruita fresca						Acetat d'Etil	
Fruita blanca (pera, poma,...)						Oxidació	
Fruita pinyol (pressec, albercoc,...)						Reducció	
Cítrics (taronja, pomelo, llimona...)						Fenòlic	
Fruita tropical (pinya, plàtan,...)						Equilibri en acidesa (equilibrat , massa àcid, poc àcid, ...)	
Fruits vermells/fruïtes del bosc (maduixes, cireres,...)							
Fruit cuit o assecat (compotes, mermelades, orellons...)							
Balsàmics (menta, eucaliptus,...)							
Especiat (pebre, canyella, clau...)						Observacions i comentaris:	
Mineral							
Animal							
Vegetal							
Fruita seca (avellanes, ametlles torrades...)							
Làctics (llet, formatge, iogurt,...)							