

**Joan Santacana Bolet**

**BIOPROTECCIÓ DE MOSTOS I VINS DE RAÏM BLANC DE LA  
VARIETAT MOSCATELL COM ALTERNATIVA AL DIÒXID DE SOFRE;  
ÚS DE LLEVATS *NO-SACCHAROMYCES* COMERCIALS AMB  
ESTRATÈGIES DE INOCULACIÓ SEQÜENCIAL**

**TREBALL DE FI DE GRAU  
dirigit pel Dr. Jordi Gombau Roigé**

**Grau en Enologia**



**UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI**

**Tarragona**

**Juny 2025**

# Agraïments

En finalitzar aquest Treball de Fi de Grau, voldria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones i entitats que han contribuït a fer possible aquesta experiència.

En primer lloc, vull donar les gràcies al meu tutor Jordi Gombau, per la seva dedicació, suport constant i orientació al llarg de tot el procés. La seva disponibilitat, els seus consells i la seva visió crítica han estat fonamentals per a la realització d'aquest treball.

També vull agrair al professorat del grau d'enologia per haver-me transmès els coneixements i les eines necessàries durant aquests anys de formació. El seu compromís amb l'ensenyament m'ha motivat a aprofundir en els temes que més m'interessen.

Als meus companys i companyes, gràcies per compartir aquest camí ple de reptes i aprenentatges. El vostre suport, tant acadèmic com personal, ha estat clau en els moments més intensos.

A la meva família, especialment als meus pares, la meva germana, l'Ailí, al Josep i demás gent que m'envolta en el meu dia a dia i em motiva, gràcies pel vostre amor incondicional, paciència i per creure sempre en mi. Sense el vostre suport constant, res d'això hauria estat possible.

Gràcies a tots i totes per acompanyar-me en aquest viatge.

# Índex

Resum .....	3
1.Introducció .....	4
2. Hipòtesis .....	8
3. Objectius .....	8
4. Materials i mètodes.....	9
4.1 Productes químics i llevats .....	9
4.2 Mostres de raïm.....	9
4.3 Disseny experimental.....	9
4.4 Anàlisis fisicoquímics dels vins .....	12
4.4.1 Anàlisis estàndards del vi .....	12
4.4.2 Determinació del color dels vins .....	12
4.4.3 Extracció i determinació dels polisacàrids del vi per HRSEC-RID .....	12
4.4.4 Extracció i determinació de les proteïnes dels vins per HRSEC-DAD ..	12
5. Resultats i discussió .....	14
5.1 Paràmetres estàndards.....	14
5.2 Àcids orgànics majoritaris.....	15
5.3 Paràmetres colorimètrics i polifenols .....	18
5.4 Polisacàrids i proteïnes .....	20
6. Conclusions .....	22
7. Bibliografia .....	24

# Resum

El pardejament enzimàtic és un procés bioquímic en el qual els ortodifenols s'oxiden i es condensen, passant consegüentment el color del vi a tonalitats marronoses. Aquest procés oxidatiu esdevé una problemàtica de caràcter important en vins blancs. L'eina universal utilitzada per evitar el pardejament és el diòxid de sofre, el qual té propietats, antioxidants, antioxidants i antisèptiques. Tot i resultar un additiu molt necessari i complet, el seu ús resulta cada cop més problemàtic degut a ser un al·lergen que pot provocar problemes de salut. Així doncs, s'han plantejat diferents eines com a alternativa al diòxid de sofre, una de les quals és la bioprotecció. Aquesta eina, a través de la coinoculació o la inoculació seqüencial de diferents espècies de llevats o bacteris pretén controlar el desenvolupament de microorganismes indesitjats i protegir el vi enfront de l'oxidació. En aquest estudi s'han inoculat de manera seqüencial soques de llevat de les espècies *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima* i *Torulaspora delbrueckii* en tres vins a una dosi de 2 g/hl de diòxid de sofre, 48 hores abans de la *Saccharomyces cerevisiae*, per tal de comparar amb 2 condicions control, a 2 i 5 g/hl de diòxid de sofre i amb inoculació convencional amb *Saccharomyces cerevisiae*. Dels vins resultants s'han analitzat diferents paràmetres fisicoquímics.

A partir dels anàlisis efectuats s'ha determinat que la condició inoculada amb *Lachancea thermotolerans* ha generat 2,8 g/l d'àcid làctic, ha generat una menor quantitat d'àcid acètic i ha conservat l'àcid màlic, inhibint la fermentació malolàctica, així doncs ha actuat com a bioprotector. Les condicions inoculades amb *Metschnikowia pulcherrima* i la *Torulaspora delbrueckii* han mostrat una degradació de l'àcid màlic i, per tant, han efectuat la fermentació malolàctica. Pel que fa al pardejament, s'han analitzat els paràmetres colorimètrics i s'ha determinat que les condicions mitjançant inoculació seqüencial amb els llevats *no-Saccharomyces* mostren un menor pardejament respecte els controls. Tanmateix s'ha determinat que les condicions amb inoculació seqüencial han mostrat concentracions més elevades de polisacàrids i proteïnes respecte al control.

En conclusió, la inoculació seqüencial de les tres espècies de llevat *no-Saccharomyces* han resultat efectives en quant al pardejament del color del vi. A més a més, la *Lachancea thermotolerans* ha mostrat la capacitat inhibidora enfront els bacteris làctics. Per tant, les inoculacions seqüencials amb les espècies de llevat *no-Saccharomyces* estudiades és una eina biotecnològica útil per a disminuir les dosis de diòxid de sofre.

# 1.Introducció

El pardejament enzimàtic dels mostos de raïm blanc és un dels principals problemes en enologia (Li et al., 2008). El pardejament es descriu com un procés oxidatiu en el qual els aliments adquireixen tonalitats marrons, modificant-se el gust, l'aroma i el valor comercial d'aquests. Aquesta modificació de les característiques sensorials dels aliments pot produir que el consumidor rebutgi el producte. En el cas del most de raïm blanc, el pardejament és el procés bioquímic d'oxidació enzimàtica dels polifenols presents al most, essent les polifenoloxidasas les principals responsables d'aquest procés. En aquest sentit, les polifenoloxidasas principals responsables del pardejament enzimàtic dels mostos són: per una banda, la tirosinasa, present de forma natural en els mostos, i per altra banda, la lacasa, que es troba en aquells raïms que hi ha hagut una infecció per *Botrytis cinerea*. Aquesta última té una eficàcia més alta (Steel et al., 2013) degut a que presenta un espectre d'oxidació de substrats més ampli i una major velocitat d'oxidació (Oliveira et al., 2011) i, per tant, esdevindrà un repte al celler protegir el most d'aquest enzim.

Les polifenoloxidasas, en presència d'oxigen, tenen la capacitat d'oxidar els orto-difenols a orto-diquinones. Aquesta reacció enzimàtica es mostra a la Figura 1. A la vegada, aquestes orto-diquinones (incolores) poden condensar o reaccionar en altres compostos fenòlics formant pigments cada vegada més grans de tonalitats marroneses. Aquests pigments es coneixen amb el nom de melanines, les quals són les responsables del pardejament del most/vi. Per tant, a nivell tecnològic, la composició en polifenols del most, la exposició a l'oxigen d'aquest, i les tècniques enològiques aplicades en el celler, les quals acabaran determinant tant l'exposició a l'oxigen com la composició fenòlica, seran factors determinants per a evitar el pardejament enzimàtic del most. Així mateix, l'ús d'additius tals com el diòxid sofre i altres alternatives que descriurem a posteriori jugaran un rol important en el pardejament gràcies a la capacitat que tenen d'inhibir les polifenoloxidasas.

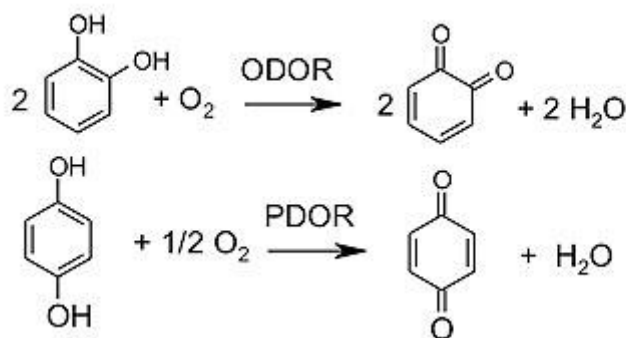


Figura 1. Reacció enzimàtica d'oxidació dels difenols presents en el vi en diquinones. Figura adaptada de Laurie y Peña-Neira (2012)

L'eina comunament i universalment utilitzada per evitar el pardejament dels mostos de raïm blanc és el diòxid de sofre, ja que gràcies a les seves propietats antioxidant, que s'han descrit a la bibliografia, pot inhibir les polifenoloxidases (Dubernet & Ribéreau-Gayon, 1973). No obstant, a aquest additiu també se li han descrit capacitats antioxidant i antimicrobianes. Gràcies a aquestes propietats el diòxid de sofre permet evitar l'oxidació química de most/vi i controlar el creixement de microorganismes alterants, els quals poden repercutir negativament a la qualitat sensorial del vi. No obstant, el diòxid de sofre és un al·lergen que pot provocar problemes de salut (Guerrero i Cantos-Villar, 2015), així doncs l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) recomana no superar els 0,7 mg de SO<sub>2</sub> per kilogram de pes corporal i dia (EFSA, 2016). Per aquest motiu la indústria agroalimentària i enològica busca reduir o substituir l'ús de SO<sub>2</sub>, i així ho demostren l'increment d'investigacions en aquest aspecte.

Algunes alternatives al diòxid de sofre per tal d'evitar el pardejament del most de raïm blanc han sigut descrites a la bibliografia. Entre elles trobem l'àcid ascòrbic, els tanins enològics, el glutatió (GSH), els gasos inerts i la bioprotecció amb *Metschnikowia pulcherrima*, ja que s'ha descrit una alta capacitat de consum d'oxigen d'algunes soques d'aquesta espècie, evitant la disponibilitat d'oxigen per les polifenoloxidases (Giménez et al., 2024). En el cas de l'àcid ascòrbic, al tenir una alta capacitat de consumir oxigen, produeix que aquest no estigui disponible per les polifenoloxidases. No obstant, l'oxidació de l'àcid ascòrbic pot donar lloc a peròxid d'hidrogen, produint oxidacions posteriors en el most. Aquest fet fa que l'àcid ascòrbic sigui una alternativa que s'hagi d'utilitzar en combinació amb diòxid de sofre. Per altra banda, Chen et al. (2016) han descrit que els tanins enològics poden inhibir l'activitat de les polifenoloxidases i, per tant, evitar el pardejament enzimàtic. A la bibliografia s'ha estudiat la inhibició de diferents tanins enològics sobre la lacasa de *Botrytis cinerea* (Vignault et al., 2020). El GSH es considerat també una alternativa al diòxid de sofre, ja que té capacitat de reaccionar

amb les orto-diquinones produïdes en el procés d'oxidació enzimàtica, evitant la formació de melanines i, per tant, el pardejament enzimàtic. El GSH es pot suplementar al vi en forma pura o en forma de llevat sec inactiu ric en glutatió (OIV [International Organization of Vine and Wine], (2017a), essent aquesta última alternativa més econòmica en relació al GSH pur. No obstant, les dues alternatives són acceptades per la OIV (OIV, 2015).

Per últim, els gasos inerts esdevenen una altra alternativa que permeten desplaçar l'oxigen present al most fent que aquest no estigui disponible per les polifenoloxidasas.

Per altra banda, per evitar el creixement de microorganismes alterants i, per tant, per evitar l'alteració microbiològica del most/vi també han sigut descrites diferents alternatives al diòxid de sofre, entre elles, la lisozima, el quitosà, l'àcid fumàric o l'estratègia de bioprotecció entre d'altres.

Centrant-nos en la bioprotecció, aquesta es basa en una estratègia biotecnològica que permet reduir o eliminar l'ús de diòxid de sofre en la vinificació (Simonin et al., 2020). En aquest sentit, l'Organització Internacional de la Vinya i el Vi (2024) descriu la bioprotecció com una estratègia biotecnològica que permet reduir o eliminar l'ús de diòxid de sofre en la vinificació (Simonin et al., 2020). Recentment, el grup d'experts en microbiologia de l'OIV ha definit la bioprotecció com la utilització de microorganismes enològics específics per controlar el desenvolupament d'altres microorganismes indesitjables i/o evitar les oxidacions, amb l'objectiu de reduir les dosis de diòxid de sofre i preservar la qualitat sensorial del vi (Simonin et al., 2020).

A la bibliografia s'han descrit diferents espècies de llevats no-*Saccharomyces* i de bacteris làctics com a eines per a la bioprotecció de mostos i vins. En aquest sentit, l'ús de llevats no-*Saccharomyces* és una pràctica autoritzada per la OIV (OIV, 2017b).

Cal mencionar que aquests llevats normalment s'utilitzen en estratègies de coinoculació o inoculació seqüencial juntament amb llevats de l'espècie *Saccharomyces cerevisiae*, degut al seu lleu o moderat poder fermentatiu. En aquest sentit, la inoculació de *Saccharomyces cerevisiae* permet assegurar la finalització satisfactòria de la fermentació alcohòlica.

Tal com es descriu a la bibliografia, les espècies de llevats més comunament utilitzades com a bioprotectors són *Lachancea thermotolerans*, *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*. En aquest sentit, diversos estudis han descrit la capacitat de diferents soques de l'espècie *Lachancea thermotolerans* de produir àcid L-làctic en fermentacions seqüencials amb *Saccharomyces cerevisiae*. La producció d'àcid L-làctic

per part de *Lachancea thermotolerans* permet disminuir el pH dels vins. Aquesta disminució del pH del vi fa que la proporció de diòxid de sofre molecular sigui major a una mateixa concentració, fet que augmenta les propietats antisèptiques d'aquest additiu i, per tant, evita en gran mesura el creixement de microorganismes alterants o indesitjats que poden comprometre la qualitat sensorial del vi.

Per altra banda, a pH més baixos, l'activitat de les polifenoloxidasas és menor, augmentant així la protecció del most/vi enfront del pardejament enzimàtic (Macheix et al., 1991). A més a més, diversos estudis indiquen que concentracions altes d'àcid L-làctic exerceixen un efecte inhibitor sobre la fermentació malolàctica. Cal mencionar, en aquest sentit, que en vinificació en blanc aquest tipus de fermentació no és buscada, ja que produeix una pèrdua de frescor dels vins, i més encara en el context actual de canvi climàtic.

Una altra espècie de llevat que s'ha descrit com una bona eina per a la bioprotecció de mostos i vins és *Torulaspota delbrueckii*. En aquest sentit s'ha descrit que, degut a la seva capacitat de consumir oxigen, permet evitar el pardejament enzimàtic i els microorganismes indesitjats, deixant de ser disponibles per a les polifenoloxidasas i per al creixement de microorganismes alterants.

Tanmateix, soques de *Metschnikowia pulcherrima* s'han descrit com capaces de consumir ràpidament l'oxigen (Windholtz et al., 2023) En aquest sentit, actuaria igual que l'espècie *Torulaspota delbrueckii*, consumint oxigen de forma que aquest no estaria disponible per les polifenoloxidasas. En un estudi de Bustamante et al., 2024 s'ha avaluat l'efecte bioprotector de la soca comercial Initia Level 2 de Lallemand d'aquesta espècie de llevat per evitar el pardejament enzimàtic produït per les polifenoloxidasas. En aquest mateix estudi es va poder avaluar la taxa de consum d'oxigen del most en presència d'aquesta soca i com es produïa una reducció del pardejament enzimàtic.

També s'han descrit espècies de bacteris làctics com a bones candidates per a la bioprotecció. En aquest sentit, en fermentacions on l'espècie de bactèria làctica *Lactiplantibacillus plantarum* ha sigut inoculada juntament amb *Saccharomyces cerevisiae*, s'ha vist una reducció de la població de bacteris acètics (Ge et al., 2025). Aquesta reducció de la població de bacteris acètics, juntament amb el fet que aquesta espècie de bactèria làctica és heterofermentativa, va donar lloc a una reducció de l'àcid acètic en vi.

En aquest treball s'estudia l'efecte de l'ús de llevats no-*Saccharomyces comercials* en estratègies d'inoculació seqüencial juntament amb *Saccharomyces cerevisiae* sobre el pardejament enzimàtic i la composició i qualitat química del vi.

## 2. Hipòtesis

La inoculació seqüencial amb llevats *no-Saccharomyces* juntament amb *Saccharomyces cerevisiae* es una eina biotecnològica útil per a la bioprotecció del most/vi de raïm blanc evitant el pardejament enzimàtic i el desenvolupament de microorganismes indesijats que repercuteixin negativament sobre la qualitat química i sensorial del vi. Així mateix aquesta eina biotecnològica permet reduir les dosis de diòxid de sofre.

## 3. Objectius

Segons la hipòtesi formulada, els objectius que es plantegen són:

- Estudiar l'efecte de l'ús de llevats *no Saccharomyces* mitjançant inoculació seqüencial amb *Saccharomyces cerevisiae* sobre color del vi blanc i el pardejament enzimàtic.
- Estudiar l'efecte de l'ús de llevats *no Saccharomyces* mitjançant inoculació seqüencials amb *Saccharomyces cerevisiae* sobre la composició química i qualitat del vins blancs.

## 4. Materials i mètodes

En aquest apartat s'explicaran els materials y mètodes utilitzats per l'estudi realitzat.

### 4.1 Productes químics i llevats

Hidròxid de sodi, format d'amoni, acetat d'amoni, etanol i àcid clorhídric proveïts per Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Els llevats utilitzats van ser la *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin EC-1118, Lallemand), *Torulaspota delbrueckii* (LEVEL<sup>2</sup> BIODIVA, Lallemand), *Lachancea thermotolerans* (LEVEL<sup>2</sup> LAKTIA, Lallemand) i *Metschnikowia pulcherrima* (LEVEL<sup>2</sup> INITIA, Lallemand).

### 4.2 Mostres de raïm

El raïm utilitzat va ser de la varietat Moscatell d'Alexandria empeltat en el peu 110 Richter recol·lectat de la finca experimental del mas dels frares de la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili a Constantí (AOC Tarragona; 41°08'44.1" N i 1°11'51.0" E) durant la verema del 2024. Els ceps creixen sobre un terreny argilo llimós a 59 m sobre el nivell del mar i estan formats en doble cordó royat amb un marc de plantació de 2,80 m d'amplada per 1,20 m d'allargada. La vinya s'ha treballat d'acord amb les estàndards de viticultura de la zona, anyada i varietat. Els tractaments químics utilitzats han sigut enfront al mildiu (*Uncinula necator*), l'oïdi (*Plasmopara viticola*), el corc (*Lobesia botrana*) i el podrit (*Botrytis cinerea*). Les condicions climatològiques de la zona són les següents: Pluviometria anual: 330 mm; temperatura mitja: 16,6°C.

### 4.3 Disseny experimental

Els raïms es van recol·lectar manualment en caixes de 20 kg quan es va considerar una maduresa tecnològica adequada (amb un grau alcohòlic probable del 12,3 % i una acidesa total en àcid tartàric del 3,5 %). El raïm es va despalillar i trepitjar amb una desrapadora automàtica (Delta F2, Bucher Vaslin SA, Chalonnes sur Loire, France) i, seguidament, premsat en una premsa pneumàtica (Marzola, Navarrete, La Rioja, Spain). A la sortida de la premsa, el most es va sulfitar a una dosi de 2 g/hl de diòxid de sofre en forma de metabisulfit de potassi. Es va fer un desfangat estàtic de 24 hores amb l'addició d'1 g/hl d'enzims pectolítics (Ilalzime HC) per a permetre una ràpida clarificació dels mosts. El most desfangat, a una dosi de 2 g/hl de diòxid de sofre, es va distribuir en damajoanes de 5 l per a realitzar les microvinificacions per a cada condició o grup experimental per triplicat.

La primera condició va ser el control a una dosificació total de 5 g/hl de diòxid de sofre. Aquest grup experimental, conegut com a control 5 (C5), es va dosificar amb 3 g/hl de diòxid de sofre addicionals per arribar a una concentració total de 5 g/hl, ja que el most

ja contenia 2 g/hl de diòxid de sofre en el desfangat. L'objectiu d'aquest grup experimental és tenir un control amb una dosi comunament usada en enologia per a protegir el most/vi del pardejament enzimàtic i del creixement de microorganismes indesitjats. Aquest Control-5 va ser inoculat amb l'espècie *Saccharomyces cerevisiae* per a realitzar la fermentació alcohòlica.

Els altres grups experimentals van ser microvinificacions en què la fermentació alcohòlica (FAL) es va realitzar amb 2 g/hl de diòxid de sofre (dosi que ja contenia el most desfangat), per tant, no hi va haver una suplementació addicional d'aquest additiu abans de començar la fermentació alcohòlica. Per una banda, un grup experimental va ser el control 2 (C2), inoculat amb *Saccharomyces cerevisiae* per a la realització de la FAL. Els altres tres grups experimentals van ser dissenyats també a una dosi de 2 g/hl de diòxid de sofre. No obstant, en aquests grups experimentals la fermentació alcohòlica va ser realitzada amb l'estratègia d'inoculació seqüencial utilitzant diferents espècies de llevats no-*Saccharomyces* juntament amb *Saccharomyces cerevisiae*.

En aquest sentit, aquests 3 grups experimentals van ser inoculats el primer dia amb les espècies de llevat *Lachancea thermotolerans*, *Torulaspota delbrueckii* i *Metschnikowia pulcherrima*, respectivament. A les 48 hores van ser inoculats aquests grups experimentals amb l'espècie *Saccharomyces cerevisiae*, usada en els grups experimentals C2 i C5. Per tant, aquests grups experimentals van ser microvinificacions fermentades amb inoculació seqüencial de *Lachancea thermotolerans* (LT), *Torulaspota delbrueckii* (TD) i *Metschnikowia pulcherrima* (MP), juntament amb *Saccharomyces cerevisiae* a les 48 hores i a una dosi de 2 g/hl de diòxid de sofre.

Al acabar la fermentació alcohòlica en tots els grups experimentals, els vins van ser sulfitats a 3 g/hl de diòxid de sofre i estabilitzats en fred durant un mes per a ser embotellats per al seu anàlisi fisicoquímic.

Els llevats comercials utilitzats, en tots els casos, es van hidratar prèviament amb 10 cops el seu pes en aigua a la temperatura requerida per la casa comercial per cadascun d'ells. Els mostos es van fermentar amb les mateixes condicions de temperatura (18°C). Seguidament en la Figura 2 es mostra l'esquema del disseny experimental.

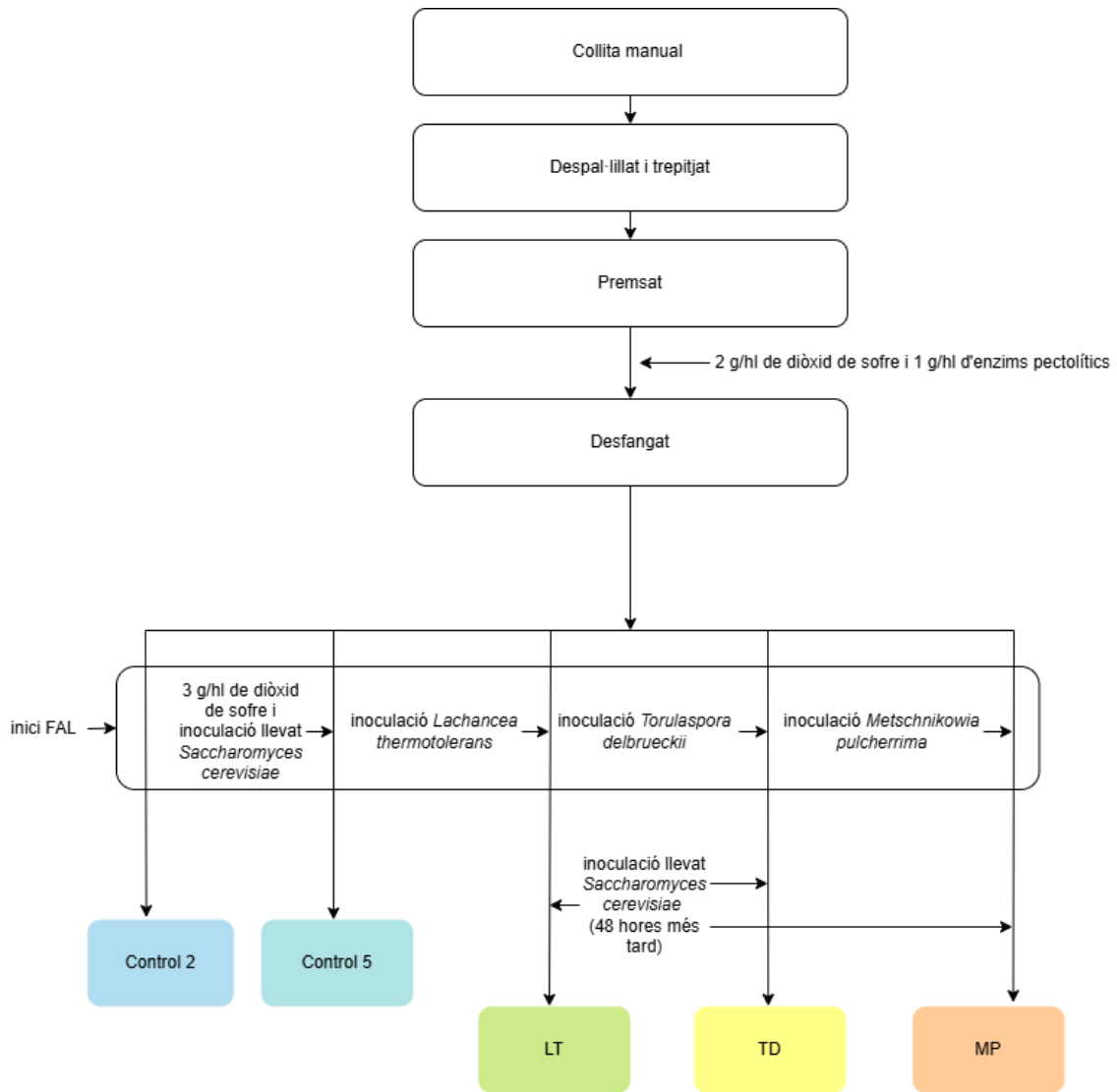


Figura 2. Diagrama de flux del disseny experimental, Elaboració pròpia.

En resum, hi ha 5 condicions o grups experimentals. Per una banda, el control 5 (C5) i el control 2 (C2), inoculats els dos amb *Saccharomyces cerevisiae* i sulfitats a dosis de 5 i 2 g/hl de diòxid de sofre al principi de la fermentació alcohòlica, respectivament. Per altra banda, les fermentacions seqüencials utilitzant els diferents llevats no-*Saccharomyces* comercials juntament amb *Saccharomyces cerevisiae* a una dosis de 2 g/hl de diòxid de sofre a principi de fermentació alcohòlica. En aquest sentit, les condicions o grups experimentals amb inoculació seqüencial són emprant *Lachancea thermotolerans* (LT), *Torulaspora delbrueckii* (TD) i *Metschnikowia pulcherrima* (MP).

## **4.4 Anàlisis fisicoquímics dels vins**

### **4.4.1 Anàlisis estàndards del vi**

Els mètodes analítics recomanats per la OIV (2014) han sigut utilitzats per a la determinació del contingut en etanol, l'acidesa total i el pH.

L'àcid acètic, l'àcid D-làctic, l'àcid L-làctic, l'àcid L-màlic, glucosa, fructosa i el glicerol van ser determinats mitjançant un autoanalitzador automàtic (Y15, Biosystems).

### **4.4.2 Determinació del color dels vins**

El color es va determinar per la metodologia descrita per Glories. Específicament es van determinar les absorbàncies a 420nm, 520nm i 620 nm. No obstant, la longitud amb més interès va ser a 420 nm, ja que dona idea del color groc del vi. A més a més, es van determinar les coordenades CieLab d'acord amb Ayala et al. i amb el software MSCV.

### **4.4.3 Extracció i determinació dels polisacàrids del vi per HRSEC-RID**

Les mostres van ser processades utilitzant la metodologia descrita per L. Ayestarán et al. (2004). Es van agafar 1 ml de mostra de vi i es va centrifugar 20 min a 10.000 rpm en un Biofuge Primo (Heraeus, Hanau, Germany) per a posteriorment ser liofilitzades fins a la dessecació total. El residu sòlid obtingut es va resolubilitzar en un eppendorf amb una dissolució d'etanol i 0,3M HCl i mantinguts durant 24 hores a 4°C per tal de precipitar els polisacàrids. Les mostres es van centrifugar (10.000 rpm, 15 min) i el sobrenedant es va eliminar. Finalment els precipitats es van assecar amb un bany sec, es van resolubilitzar amb una solució de 150mM de formiat d'amoni (solvent utilitzat en la tècnica cromatogràfica) i finalment es van sublimar en un liofilitzador (Christ Alpha 1–4, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany).

La fracció de polisacàrids soluble de cada mostra va ser analitzada per cromatografia d'alta resolució d'exclusió molecular (HRSEC) amb detecció mitjançant un detector d'índex de refracció, descrita per L. Ayestarán et al. (2004) per a determinar la distribució i concentració dels polisacàrids obtinguts en la mostra.

### **4.4.4 Extracció i determinació de les proteïnes dels vins per HRSEC-DAD**

Es van agafar alíquotes de 15 ml de cada mostra i es van centrifugar (10 min a 12.000 rpm) en un Sorvall RC-5C (Heraeus, Hanau, Germany). Els 15 ml de es van dialitzar durant 4 dies en una membrana d'un tamany de porus de 3500 Da (Membrane Filtration Products Inc., San Antonio, TX, USA). El solvent de la diàlisi va ser acetat d'amoni (50mM) durant dos dies i aigua ultrapura els següents dos dies. Seguidament es va

liofilitzar la mostra de l'interior del sac de diàlisi (Christ Alpha 1–4, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany) en plaques de petri, es va congelar, liofilitzar i resolubilitzada en acetat d'amoni 50 mM. La fracció soluble de cada mostra va ser analitzada per una cromatografia d'alta resolució d'exclusió molecular (HRSEC) amb detecció amb un detector ultravioleta a una longitud d'ona de 230nm, descrita per L. Ayestarán et al. (2004) per a determinar la distribució i quantificació de les proteïnes obtingudes en la mostra.

## 5. Resultats i discussió

### 5.1 Paràmetres estàndards

La Taula 1 mostra els paràmetres estàndards dels vins per cada un de les condicions.

Taula 1. Paràmetres generals del vi

Mostra	alcohol (%v/v)	acidesa total (g/l)	pH	Glucosa/Fructosa (g/L)	Glicerol (g/L)
C5	12,2 ± 0,2 a	4,2 ± 0,2 b	3,61 ± 0,01 b	1,36 ± 0,40 b	5,27 ± 0,06 a
C2	12,3 ± 0,2 a	3,5 ± 0,1 a	3,70 ± 0,01 c	1,44 ± 0,06 b	5,56 ± 0,12 b
LT	12,0 ± 0,3 a	6,9 ± 0,0 c	3,27 ± 0,01 a	0,69 ± 0,13 a	6,17 ± 0,39 d
TD	12,3 ± 0,2 a	3,4 ± 0,1 a	3,69 ± 0,01 c	0,96 ± 0,46 ab	5,94 ± 0,16 c
MP	12,3 ± 0,3 a	3,4 ± 0,1 a	3,70 ± 0,01 c	1,11 ± 0,46 ab	5,24 ± 0,52 a

Diferents lletres indiquen diferències significatives entre tractaments o grups experimentals a un  $p \leq 0.05$

Respecte al grau alcohòlic dels diferents vins corresponents als diferents grups experimentals, no s'observen diferències significatives. No obstant, s'ha descrit a la bibliografia la capacitat d'algunes soques de *Metschnikowia pulcherrima* (*M. pulcherrima*) (Contreras et al., 2014) i de *Lachancea thermotolerans* (*L. thermotolerans*) (Gobbi et al., 2013) de reduir el grau alcohòlic dels vins en fermentacions seqüencials d'aquestes juntament amb *Saccharomyces cerevisiae*. Respecte a l'acidesa total dels vins, la condició inoculada amb l'espècie *L. thermotolerans* va mostrar una acidesa total major, essent aquesta significativament superior en un 100% aproximadament respecte els valors de les condicions C2, *Torulaspora delbrueckii* (*T. Delbrueckii*) i *M. pulcherrima*. El grup experimental C5, igual que la condició LT, va mostrar una acidesa estadísticament superior que les condicions C2, TD i MP. No obstant, aquest augment no va ser tan pronunciat com en el cas de la condició LT. En resum, l'acidesa total va ser 6,9 g/l i 4,2 g/l en les condicions LT i C5 respectivament, mentre que en els altres grups experimentals va ser aproximadament de 3,5 g/L.

Aquest augment de l'acidesa total en cas de vi fermentat amb inoculació seqüencial de *L. thermotolerans* juntament amb *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) s'atribueix, com veurem posteriorment a la Taula 2, a la producció d'àcid L-làctic per part d'aquesta soca comercial. En aquest sentit, a la bibliografia ja s'ha descrit la capacitat d'algunes soques d'aquesta espècie de produir quantitats elevades d'àcid L-làctic, tal i com s'ha comentat a la introducció. A més a més, en aquest grup experimental la fermentació malolàctica (FML) no va tenir lloc (tal com veurem a posteriori a la Taula 2), en comparació a les altres condicions experimentals. Per tant, una major acidesa total també es pot associar a que part de l'àcid L-màlic es va conservar. D'altra banda, una major acidesa total en la condició C5 també s'atribueix que en aquesta condició, part de l'àcid màlic es va conservar, i per tant es va inhibir parcialment la fermentació

malolàctica, tal i com es mostrarà a posteriori a la Taula 2. Aquest fet es possiblement degut a que dosis més altres del diòxid de sofre (5 g/hl) han inhibit parcialment la FML.

Respecte al pH dels vins, la condició LT va mostrar un menor pH (3,27) seguit en ordre creixent per la condició C5 (3,61) y per últim les condicions C2, TD i MP amb pH de 3,70, 3,69 i 3,70 respectivament, essent aquestes tres mostres iguals significativament. El menor pH en la condició LT, tal i com s'ha explicat anteriorment, es justifica per l'increment de concentració d'àcid L-làctic, el qual augmenta la proporció de protons en el medi i produeixi la disminució del pH. En cas del valor de pH de la condició C5 es justifica, com es veurà a continuació en la Taula 2, en la inhibició parcial de la fermentació malolàctica, evitant la degradació d'àcid màlic degut a les capacitats antisèptiques del diòxid de sofre enfront de les bacteries làctiques.

Un menor pH en la condició LT, confirma la capacitat d'aquesta espècie de bioprotegir el most. En aquest sentit un menor pH dona lloc a una proporció de SO<sub>2</sub> molecular major i per tant s'està bioprotegint aquest d'alteracions microbiològiques o de possibles alteracions amb bacteries làctiques.

Pel que fa a la glucosa i fructosa, en tots els casos es menor a 2 g/L, per tant es considera que s'ha acabat satisfactòriament la FAL en tots els grups experimentals. En quant a la concentració de glicerol del vins, provinent de la fermentació gliceropirúvica, les diferències són mínimes entre grups experimentals. No obstant, es pot observar que les condicions TD i LT són amb diferències significatives, les que tenen una major concentració d'aquest metabòlit. En aquest sentit, diferents articles a la bibliografia descriuen soques de l'espècie *T. delbrueckii* amb la capacitat de produir vins amb una major concentració de glicerol (Giovani et al., 2012; Jolly et al., 2006).

## 5.2 Àcids orgànics majoritaris

La Taula 2 mostra les concentracions d'àcid L-màlic, àcid D-i L- Làctic i àcid acètic dels vins.

Taula 2. Concentració de diferents àcids del vi.

Mostra	àcid L-màlic (g/L)		àcid L-làctic (g/L)	àcid D-làctic (g/L)		àcid acètic (g/L)				
C5	0,65	± 0,19	b	0,48	± 0,12	a	0,105 ± 0,002	a	0,29 ± 0,03	ab
C2	≤ 0.1		a	1,00	± 0,01	b	0,152 ± 0,006	b	0,33 ± 0,01	bc
LT	1,19	± 0,06	c	2,80	± 0,12	c	0,104 ± 0,003	a	0,25 ± 0,01	a
TD	≤ 0.1		a	1,01	± 0,05	b	0,281 ± 0,021	d	0,44 ± 0,04	d
MP	≤ 0.1		a	1,03	± 0,03	b	0,203 ± 0,026	c	0,38 ± 0,04	cd

Diferents lletres indiquen diferències significatives entre tractaments o grups experimentals a un  $p \leq 0.05$

En primer lloc, l'àcid màlic resulta un dels paràmetres fisicoquímics més importants per poder determinar si s'ha efectuat o no la fermentació malolàctica (FML). En aquest sentit, cal mencionar que la FML no és buscada normalment en vins blancs, ja que produeix una disminució de l'acidesa la qual pot provocar una baixada de frescor desitjada en aquest tipus de vins. A més a més, en el context actual de canvi climàtic cada cop s'elaboren vins amb menor acidesa total. Conseqüentment, tal i com es pot observar a la Taula 2, els únics vins que conserven totalment o parcialment l'àcid L-màlic són la condició C5, parcialment, i la condició LT, amb la seva totalitat. Aquestes evidències indiquen que amb una dosi de 5 g/hl de diòxid s'estaria inhibint parcialment la fermentació malolàctica. També es pot afirmar que la soca utilitzada de *Lachancea thermotolerans* té una funció bioprotectora enfront dels bacteris làctics, ja que ha inhibit totalment la FML, degut a que en la condició LT s'ha conservat la totalitat de l'àcid màlic. Aquesta inhibició de la FML estaria relacionada amb la baixada de pH que s'ha observat a la taula 1 per aquesta condició. La baixada de pH en aquest cas comportaria que existís una major proporció de diòxid de sofre molecular, segurament suficient per inhibir l'activitat dels bacteris làctics.

Aquest resultat és força interessant degut a la capacitat de baixar la dosi de sulfurós a l'entrada de verema i a la vegada evitar l'activitat dels bacteris làctics, ja que cal mencionar que la condició LT contenia una dosi de 2 g/hl de diòxid de sofre mentre que la condició C5 tenia una dosi de 5 g/hl. Per tant, la inoculació seqüencial amb *L. thermotolerans* juntament amb *S. cerevisiae* és una eina biotecnològica útil per a la bioprotecció dels vins blancs.

Les condicions C2, TD i MP van realitzar la FML, ja que no es va detectar àcid L-màlic en cap dels vins d'aquestes condicions. Diversa bibliografia relacionen l'espècie *T. delbrueckii* i la *M. pulcherrima* amb la capacitat per a promoure la fermentació malolàctica (Loira et al., 2018; Ruiz de Villa et al., 2023; Balmaseda et al., 2021). Per tant, sembla que les condicions experimentals que s'han realitzat en aquest treball amb dosis de 2 g/hl de diòxid de sofre no serien idònies per inhibir la FML, tant en fermentació convencional amb solament la inoculació de *S. cerevisiae*, com en inoculacions seqüencials d'aquesta amb les espècies de llevats de *T. delbrueckii* i la *M. pulcherrima*.

La FML es basa en la degradació de l'àcid L-màlic donant lloc principalment a l'isòmer àcid L-làctic i diòxid de carboni. En aquest sentit, les condicions C2, TD i MP, que són les condicions on es va realitzar totalment la FML van mostrar concentracions d'àcid L-làctic iguals estadísticament (1 g/L) i majors a la C5, condició que només va realitzar la FML parcialment.

No obstant, en el cas de la condició LT, la concentració d'àcid L-làctic observada és a causa de la producció d'aquest àcid per part de l'espècie *L. thermotolerans* i no pas degut a la realització de la FML ja que l'àcid L-màlic es va conservar completament. En aquesta condició la producció de l'àcid L-làctic va ser molt superior a les altres condicions. En aquest sentit, tal com s'ha comentat a la introducció, concentracions altes de L-làctic poden inhibir la fermentació malolàctica. Per tant, la inhibició de la FML en aquesta condició no només podria ser a causa d'una disminució del pH sinó també per la producció elevada d'àcid L-làctic.

Centrant-nos en el metabolisme de les bacteries làctiques aquestes poden metabolitzar la glucosa en piruvat i aquest a lactat principalment. Depenent del tipus de bactèria làctica hi hauran modificacions dels productes finals. Així doncs trobem dues famílies: homofermentativa, on produeix principalment lactat a partir de glucosa i heterofermentativa si produeix altres molècules a part del lactat. Aquesta última família es pot classificar segons facultatives, on a partir d'una molècula de glucosa genera dues molècules d'àcid làctic i de les pentoses, generen àcid làctic i àcid acètic, i obligatòries on es produeix àcid làctic, àcid acètic, etanol i diòxid de carboni. (Hidalgo Togores, 2008). La presència d'àcid D-làctic es pot associar al metabolisme dels sucres per part de les d'algunes espècies de bacteries làctiques. A més a més, un augment la producció d'àcid D-làctic juntament amb un augment de l'àcid acètic per part del metabolisme dels sucres de les bacteries làctiques es coneix en enologia amb el nom de picat làctic.

A la Taula 2 es poden observar els vins amb menor concentració d'àcid D-làctic, que són les condicions LT (0,104 g/l) i C5 (0,105 g/l), sense diferències significatives, seguit de la condició C2, MP i TD, amb valors de 0,152, 0,203 i 0,281 g/l respectivament. Els valors obtingut per part de les condicions MP i TD indiquen la capacitat de *M. pulcherrima* i *T. delbrueckii* de promoure els bacteris làctics degut a una major concentració d'àcid D -làctic en comparació amb els altres grups experimentals. Diferents articles a la bibliografia descriuen aquestes capacitats d'aquestes espècies de llevat per promoure la FML (Loira et al., 2018; Ruiz de Villa et al., 2023; Balmaseda et al., 2021). En el cas de la condició LT, s'observa un valor significativament igual a la condició C5, fet que evidencia la capacitat de *L. thermotolerans* d'inhibir els bacteris làctics i, per tant esdevenir com a bioprotector, tal com s'ha descrit en diferents articles (Synder et al., 2021).

Pel que fa a la concentració d'àcid acètic aquest pot ser degut al metabolisme del llevat, ja que els diferents llevats tenen diferent capacitat de síntesi d'àcid acètic. Aquest metabolit també pot vindre del metabolisme dels sucres per part de les bacteries

làctiques heterofermentatives o per la contaminació microbiològica amb bacteries acètiques. Els grups amb una major concentració d'àcid acètic són el MP y TD, seguit per el grup C2, el qual es pot associar probablement a la contaminació per bacteries làctiques i específicament al metabolisme del sucre per bacteries làctiques heterofermentatives, ja que aquests grups van ser els que van mostrar una major concentració d'àcid D-làctic. De fet, en aquest grups anteriors es va consumir tot l'àcid L-màlic present al most, el que confirma la presència de bacteries làctiques en aquests grups experimentals. Per altra banda, la concentració d'àcid acètic en les condicions LT i C5 van ser menors que en la resta de mostres. Aquest fet reafirma diversos estudis sobre la bioprotecció de la *L. thermotolerans*, lo qual permet rebaixar la dosis de diòxid de sofre (Morata et al., 2018). En aquest sentit, la baixada de pH en el grup LT i en menor mesura el grup C5 (observat a la Taula 1) ha inhibit probablement el creixement de bacteries làctiques, veient-se reflectit en una menor concentració d'àcid acètic.

### 5.3 Paràmetres colorimètrics i polifenols

La Taula 3 mostra diferents paràmetres colorimètrics i l'índex de polifenols totals

Taula 3. Paràmetres colorimètrics.

Mostra	abs 420nm	L*	b*	IPT	abs at 320nm
C5	0,112 ± 0,006 b	97,4 ± 0,2 a	7,55 ± 0,11 d	7,24 ± 1,15 a	3,30 ± 0,64 a
C2	0,103 ± 0,005 b	97,4 ± 0,1 a	6,71 ± 0,18 c	7,20 ± 0,70 a	3,25 ± 0,24 a
LT	0,095 ± 0,001 a	98,1 ± 0,1 b	6,42 ± 0,01 b	7,51 ± 0,91 a	3,23 ± 0,25 a
TD	0,089 ± 0,002 a	98,0 ± 0,1 b	5,93 ± 0,06 a	6,88 ± 0,46 a	3,22 ± 0,17 a
MP	0,094 ± 0,002 a	97,9 ± 0,1 b	6,16 ± 0,19 ab	7,04 ± 0,72 a	3,23 ± 1,47 a

Diferents lletres indiquen diferències significatives entre tractaments o grups experimentals a un  $p \leq 0.05$

A la taula 3 es pot observar la coordenada  $b^*$  del sistema CIEL\*a\*b\*. Aquesta coordenada situa el color del vi en un eix transversal dins de l'esfera de l'espai CIEL\*a\*b\* que va des de tonalitats blaves a tonalitat grogues. En aquest sentit, un valor major de  $b^*$  està indicant tonalitats més grogues-marronoses i, per tant, un major pardejament del color dels most/vi. Per una banda els valors de  $b^*$  més elevats van ser pels grups experimentals C5 (7,55) i C2 (6,71), no existint diferències significatives entre ells. Per tant, aquest resultats indiquen, que en les condicions experimentals realitzades aquest treball, amb dosis de 2 g/hl de diòxid de sofre s'estaria protegint els vins del pardejament del color en comparació a dosis de 5 g/hl de diòxid de sofre. Per altra banda, sorprenentment, els grups experimentals amb fermentacions seqüencials amb llevats no-*Saccharomyces* van presentar valors significativament menors que els controls, (LT (6,42), MP (6,16) i TD (5,93)) i iguals estadísticament entre elles. Aquests valors més baixos en les condicions TD, LT i MP indiquen un menor color groc-marronós en aquests

vins i, per tant, un menor pardejament del color. A més a més, aquests resultats estarien indicant la capacitat dels llevats no-*Saccharomyces* inoculats en aquest estudi per prevenir el pardejament del vi en estratègies d'inoculació seqüencial juntament amb *S. cerevisiae*. Aquest resultats són prometedors ja que aquest menor pardejament en aquest vins respecte el grup C5, estaria conclouent que la inoculació seqüencial d'aquests llevats amb *S. cerevisiae* és una eina útil per reduir les dosis de diòxid de sofre. A més a més, el menor pardejament respecte al grup C2 estaria indicant que la presència dels llevats no-*Saccharomyces* en la fermentació seria un eina útil per a la bioprotecció.

La coordenada  $L^*$  d'altra banda, defineix la lluminositat del vi (valors més alts indiquen major claredat). Aquesta coordenada es relaciona amb la intensitat del color. En aquest sentit, un menor valor de  $L^*$  correspon a una major intensitat del color. Tal com es mostra en la taula 3, les condicions amb inoculació seqüencial obtenen valors significativament superiors als dels controls. Per tant aquest resultat confirmen que inoculacions seqüencials amb aquests llevats no-*Saccharomyces* estarien protegint el color del vi enfront de l'oxidació.

Finalment, l'absorbància a 420 nm, una mesura clàssica per determinar el color groc en vins, mostra un comportament coherent amb la coordenada  $L^*$  i la coordenada  $b^*$ . En aquest sentit, els vins amb presència de *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima* i *T. delbrueckii* presenten una menor absorbància en aquesta longitud d'ona, la qual cosa reforça la hipòtesi d'una menor oxidació del color o pardejament, com a resultat de l'acció protectora d'aquests llevats, tal com ja han assenyalat diversos estudis de Bustamante et al., 2024 sobre la soca Initia level 2 de *M. pulcherrima*, també utilitzada en aquest treball.

En referència a l'absorbància a 320 nm, longitud d'ona on els àcids hidroxicinàmics tenen un màxim d'absorció, no s'han mostrat diferències significatives entre vins, igual que amb l'índex de polifenols totals.

## 5.4 Polisacàrids i proteïnes

A la Figura 3 es troben les concentracions de proteïnes i polisacàrids en les diferents condicions experimentals.

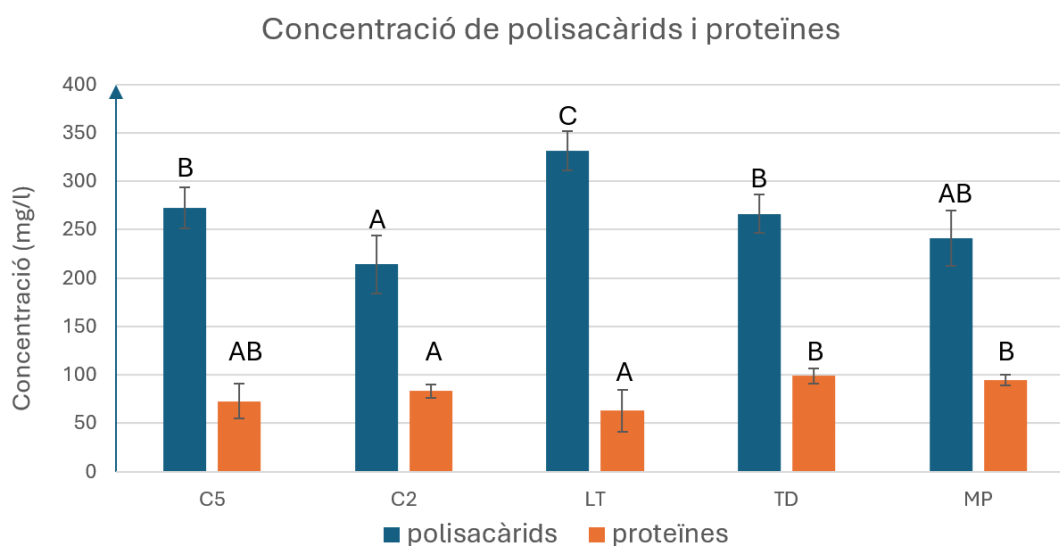


Figura 3. Concentracions de proteïnes i polisacàrids en les diferents condicions.

Els polisacàrids desenvolupen un rol important en les qualitats sensorials del vi. Aquests tenen la capacitat d'augmentar la percepció del cos i la untuositat del vi, disminuir l'astringència i l'amargor en el cas dels vins negres i millorar la persistència. També poden actuar com a col·loides protectors evitant la inestabilitat proteica i la precipitació de sals de l'àcid tartàric, formant complexos i impeding la cristallització, respectivament. En vins escumosos esdevenen una funció crucial, ja que es relacionen amb la presa i l'estabilitat de l'escuma (Ivit et al., 2018).

La concentració de polisacàrids va mostrar diferències significatives entre les diferents condicions de l'estudi (Figura 3). La condició LT va presentar la concentració més elevada, amb diferències significatives respecte a les altres condicions, les quals no van mostrar diferències significatives entre elles. Aquests resultats mostren la capacitat *L. thermotolerans* per alliberar polisacàrids durant la fermentació alcohòlica, tal com s'ha evidenciat en múltiples investigacions (Benito et al., 2019). En aquest sentit, els llevats durant la fermentació alcohòlica i durant la seva autòlisi poden alliberar polisacàrids, entre ells, principalment manoproteïnes, procedents de la paret cel·lular del llevat. Tot i que no s'han trobat diferències en la concentració de polisacàrids en els vins inoculats amb *M. pulcherrima* i *T. delbrueckii* respecte els controls, estudis anteriors han

documentat un increment d'aquests amb els llevats d'aquestes espècies (Belda et al., 2017; Granchi et al., in press).

Pel que fa a les proteïnes, aquestes poden ser responsables de terboleses i precipitacions en el vi degut a la seva inestabilitat, però són importants per a la formació i estabilitat en la presa d'escuma en vins escumosos (Condé et al., 2017).

Tal i com es mostra a la Figura 3, les inoculacions seqüencials amb *M. pulcherrima* i *T. delbrueckii* van mostrar una concentració major de proteïnes respecte al grup fermentat solament amb *Saccharomyces cerevisiae* (C2). Aquest resultat estaria corroborant resultats prèviament reportats per González -Royo (2015), en el qual s'havia observat un alliberament de proteïnes al vi procedents de llevats d'aquestes dues espècies.

El fet d'un major alliberament de polisacàrids (grup LT) i de proteïnes (pels grups TD i MP) pels llevats *no-Saccharomyces*, augmentant la concentració d'aquests col·loides en el vi, suggereix que inoculacions seqüencials d'aquestes soques de llevat juntament amb *Saccharomyces cerevisiae*, podria ser una eina biotecnològica útil per augmentar la concentració de proteïnes i polisacàrids en vins, tal i com han mostrat diversos estudis (Hranilović et al., 2020), així afectant positivament sobre les propietats escumants dels vins escumosos, l'estructura i la untuositat dels vins.

## 6. Conclusions

Aquest treball ha permès avaluar l'efecte de l'ús de llevats no-*Saccharomyces* en estratègies d'inoculació seqüencial amb *Saccharomyces cerevisiae* com a eina biotecnològica per a la bioprotecció de mostos i vins blancs, amb especial atenció a la seva capacitat per substituir o reduir l'ús de diòxid de sofre. Dels resultats obtinguts es poden extreure les següents conclusions:

- La *Lachancea thermotolerans* ha mostrat una gran capacitat per a metabolitzar sucre donant lloc a àcid L-làctic. L'augment de concentració d'àcid L-làctic en la condició LT ha comportat un augment de l'acidesa total en un 100%, en comparació amb els vins que han efectuat la FML i, com a conseqüència, una disminució del pH. Aquesta disminució del pH, ha comportat probablement una major fracció de diòxid de sofre molecular respecte al diòxid de sofre total, resultant en una major protecció enfront del desenvolupament de microorganismes alternats en el vi, com ha sigut en el cas de bacteris làctics. Aquests fets fan que la *L. thermotolerans* esdevingui un rol fonamental en la bioprotecció dels vins
- Les inoculacions seqüencials amb *Torulaspora delbrueckii* i *Metschnikowia pulcherrima* no han evitat la fermentació malolàctica, ja que la concentració d'àcid L-màlic va ser nul·la en aquests grups experimentals. A part, aquests grups van presentar concentracions més elevades d'àcid D-làctic i àcid acètic, indicant una activitat de bacteris làctics metabolitzant part dels sucres.
- A nivell colorimètric, s'ha demostrat la capacitat bioprotectora per part dels tres llevats no-*Saccharomyces* a través del paràmetre L\* i b\* del Cielab i de la mesura espectrofotomètrica a una longitud d'ona de 420 nm, obtenint una major lluminositat i una reducció de tonalitats grogues-marronoses de les fermentacions seqüencials amb llevats no-*Saccharomyces* respecte als vins control.
- Els llevats no-*Saccharomyces* han evidenciat capacitat d'alliberament de col·loides. La condició inoculada amb *L. thermotolerans* ha aconseguit la concentració més alta de polisacàrids, mentre que les condicions amb *T. delbrueckii* i *M. pulcherrima* han aconseguit una concentració més gran de proteïnes que la fermentació convencional amb *S. cerevisiae*. Aquests increments de concentracions de col·loides podrien comportar una major estabilitat proteica i tartàrica, una major untuositat i estructura en els vins i, una major i estable presa d'escuma en vins escumosos.

Per tant, es pot concloure que les inoculacions seqüencials amb llevats no-*Saccharomyces* és una eina biotecnològica útil per a la bioprotecció de mostos i vins, podent reduir les dosis de diòxid de sofre. En aquest sentit, la inoculació seqüencial amb *Lachancea thermotolerans* a una dosi de 2 g/hl de diòxid de sofre ha permès inhibir la FML (no buscada en vins blancs) i protegir enfront del pardejament el color els vins amb una reducció de la concentració de diòxid de sofre suplementada respecte el control (5 g/hl al control). A més a més, les inoculacions seqüencials amb *Metschnikowia pulcherrima* i la *Torulaspota delbrueckii* a una dosi de 2 g/hl de diòxid de sofre han bioprotegit el most /vi en termes de protecció enfront el pardejament enzimàtic del color, reduint també les dosis de diòxid de sofre respecte al control (5 g/hl).

No obstant, cal considerar que aquestes característiques bioprotectors poden variar segons molts factors tals com les soques de llevat utilitzades, les condicions experimentals i la varietat de raïm, entre altres. Per tant, seria adient ampliar l'estudi per tal de poder analitzar i comprendre quines soques són més adients i perquè, per a diversos perfils de vins.

Així doncs, com a perspectives de futur per seguir investigant aquesta línia caldria realitzar la determinació del perfil volàtil del vi a nivell analític i a nivell sensorial. A més a més, es podria realitzar el mateix estudi en vins negres. Aquests exemples de línies de treball a seguir serien interessants per tal d'aprofundir i ampliar coneixement sobre aquest tema, amb cada cop major utilitat per als cellers.

## 7. Bibliografía

- Ayala, F., Echavarri, J. F., & Negueruela, A. I.** (1997). A new simplified method for measuring the color of wines. II. White wines and brandies. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 364–369.
- Ayestarán, B., Guadalupe, Z., & León, D.** (2004). Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo V.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 513, 29–39.
- Balmaseda, A., Rozès, N., Leal, M. Á., Bordons, A., & Reguant, C.** (2021). Impact of changes in wine composition produced by non-Saccharomyces on malolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108954.
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S.** (2019). *Mixed alcoholic fermentation of Schizosaccharomyces pombe and Lachancea thermotolerans and its influence on mannose-containing polysaccharides wine composition*. AMB Express, (2019)
- Bustamante, M., Giménez, P., Just-Borràs, A., Solé-Clua, I., Gombau, J., Heras, J. M., ... Zamora, F.** (2024). Inoculation with a selected strain of *Metschnikowia pulcherrima* as a bioprotective alternative to sulphites for preventing browning of white grape must. *OENO One*, 58(1). <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2024.58.1.7830>
- Canalejo, D., Guadalupe, Z., Martínez-Lapuente, L., Ayestarán, B., Pérez-Magariño, S., & Doco, T.** (2022). Characterization of polysaccharide extracts recovered from different grape and winemaking products. *Food Research International*, 157, 111480.
- Chen, K., Escott, C., Loira, I., del Fresno, J., Morata, A., Tesfaye, W., Calderón, F., Benito, S., & Suárez-Lepe, J. A.** (2016). The effects of pre-fermentative addition of oenological tannins on wine components and sensorial qualities of red wine. *Molecules*, 21(11), 1445. <https://doi.org/10.3390/molecules21111445>
- Claus, H., Sabel, A., & König, H.** (2014). Wine phenols and laccase: An ambivalent relationship. In Y. E. Rayess (Ed.), *Wine—Phenolic Composition, Classification and Health Benefits* (pp. 155–185). Nova Science Publishers.
- Condé, B. C., Bouchard, E., Culbert, J. A., Wilkinson, K. L., Fuentes, S., & Howell, K. S.** (2017). Soluble protein and amino acid content affects the foam quality of sparkling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(41), 9110–9119. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02675>.
- Contreras, A., Hidalgo, C. H., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C.** (2014). Evaluation of non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80. <https://doi.org/10.1128/AEM.03780-13>
- Dubernet, M., & Ribéreau-Gayon, P.** (1973). Inhibition of polyphenol oxidase activity in grape musts by sulfur dioxide. *Journal of Enology and Viticulture*, 24(3), 125–132.
- Ge, Y., Wu, Y., Aihaiti, A., Wang, L., Wang, Y., Xing, J., Zhu, M., & Hong, J.** (2025). The metabolic pathways of yeast and acetic acid bacteria during fruit vinegar

fermentation and their influence on flavor development. *Microorganisms*, 13(3), 477. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13030477>

- Gonzalez Royo E, Pascual O, Kontoudakis N, Esteruelas M, EsteveZarzoso B, Mas A, Canals JM, Zamora F** (2015) Oenological consequences of sequential inoculation with non-Saccharomyces yeasts (*Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food Res. Technol.*, 240, 999–1012
- Giovani, G., Rosi, I., & Bertuccioli, M.** (2012). Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-Saccharomyces yeast strains during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 113–118.
- Giménez, P., Just-Borràs, A., Solé-Clua, I., Bustamante, M., Fort, F., & Zamora, F.** (2024). Inoculation with a selected strain of *Metschnikowia pulcherrima* as a bioprotective alternative to sulphites for preventing browning of white grape must. *OENO One*, 58(1), 1–14.
- 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, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- González, G., Guzzon, R., Ongaro, M., Paolini, M., Nardin, T., Malacarne, M., ... Larcher, R.** (2023). Biological acidification of “Vino Santo di Gambellara” by mixed fermentation of *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae*. Role of nitrogen in the evolution of fermentation and aroma profile. *OENO One*, 57(3), 205–217. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2023.57.3.7376>
- Granchi, D., et al.** (in press). *Comparison between Metschnikowia pulcherrima and Torulaspora delbrueckii: sequential fermentation effects*. *Frontiers in Microbiology*. Accepted 3 Jun 2025.
- Hidalgo Togores, Jose.** (2008). *Tratado de enología. Vol. II: Microbiología del vino y vinificaciones especiales (3a ed.)*. Mundi-Prensa.
- Hranilović, A., Gambetta, J. M., Jeffery, D. W., Grbin, P. R., & Jiranek, V.** (2020). Lower-alcohol wines produced by *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentations: The effect of sequential inoculation timing. *International Journal of Food Microbiology*, 329, 108651. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108651
- Ivit NN, Kemp B.** *The Impact of Non-Saccharomyces Yeast on Traditional Method Sparkling Wine. Fermentation.* 2018; 4(3):73. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030073>
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S.** (2006). The role and use of non-Saccharomyces yeasts in wine production. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 27, 15–38.
- Laurie, V. F., & Peña-Neira, Á.** (2012). *Oxígeno y vinos tintos*. En Dossier: Oxígeno y vino. Universidad de Talca & Universidad de Chile.

- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). Effect of non-Saccharomyces on the performance of malolactic fermentation in white and red wines under winery conditions. *OENO One*, 52(4), 267–275.
- Macheix, J. J., Sapis, J. C., & Fleuriet, A. (1991). Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(1), 1–37. <https://doi.org/10.1080/10408399109527552de.wikipedia.org+2tandfonline.com+2en.wikipedia.org+2>
- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M. A., González, C., & Suárez Lepe, J. A. (2018). *Lachancea thermotolerans* applications in wine technology. *Fermentation*, 4(3), 53. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030053>
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C., de Freitas, V., & Silva, A. M. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5), 1115–1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.002>
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin [OIV]. (2014). *Methods of analysis of wines and must*. <http://www.oiv.int/oiv/info/enmethodesinternationalesvin>
- OIV (International Organization of Vine and Wine). (2015a). *Resolution OIV-OENO 445-2015. Treatment of must with glutathione*. <https://www.oiv.int/node/3225>
- OIV (International Organization of Vine and Wine). (2017a). *Resolution OIV-OENO 533-2017. Treatment of wine using inactivated yeasts with guaranteed glutathione levels*. <https://www.oiv.int/node/3157>
- OIV (International Organization of Vine and Wine). (2017b). *Resolution OIV-OENO 576B-2017. Monograph of non-Saccharomyces yeasts*. <https://www.oiv.int/node/3152>
- Organització Internacional de la Vinya i el Vi. (2024). *Ús de soques de bioprotecció en l'elaboració de vi* (1<sup>a</sup> ed.). OIV. [https://www.oiv.int/sites/default/files/2024\\_04/OIV\\_Expertise\\_Document\\_USE\\_OF\\_BIOPROTECTION\\_STRAINS\\_IN\\_WINEMAKING\\_0.pdf](https://www.oiv.int/sites/default/files/2024_04/OIV_Expertise_Document_USE_OF_BIOPROTECTION_STRAINS_IN_WINEMAKING_0.pdf)
- Ruiz-de-Villa, C., Poblet, M., Cordero-Otero, R., Bordons, A., Reguant, C., & Rozès, N. (2023). Screening of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* strains in relation to their effect on malolactic fermentation. *Food Microbiology*, 112, 104212. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104212>
- 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, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.034>
- Simonin, S., Roullier-Gall, C., Ballester, J., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Peyron, D., Alexandre, H., & Tourdot-Maréchal, R. (2020). Bio-protection as an alternative to sulphites: Impact on chemical and microbial characteristics of red wines. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1308.
- Steel, C. C., Blackman, J. W., & Schmidtke, L. M. (2013). Grapevine bunch rots: Impacts on wine composition, quality, and potential procedures for the removal

of wine faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 5189–5206. <https://doi.org/10.1021/jf400558p>

**Snyder, E. C., Jiranek, V., & Hranilovic, A.** (2021). Impact of *Lachancea thermotolerans* strain and lactic acid concentration on *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation in wine. *OENO One*, 55(2), 365–380. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.2.4657>

**Tangüler, H., Yetisen, M., Sanyol, A. G., Tuncel, A. E., Türkmaya, T., Bal, V., & Erten, H.** (2023). The effect of adding different amounts of *Lachancea thermotolerans* together with *Saccharomyces cerevisiae* on simultaneous fermentation in Emir wine production. *Journal of Enology Research*, 15, 55–63. <https://doi.org/10.xxxx/joer.2023.15.55>

**Vignault, A., et al.** (2020). Oenological tannins to prevent *Botrytis cinerea* damage in grapes and musts: Kinetics and electrophoresis characterization of laccase. *Food Chemistry*, 316, 1–9.

**Vicente, J., Navascués, E., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., & Benito, S.** (2021). An integrative view of the role of *Lachancea thermotolerans* in wine technology. *Foods*, 10(11), 2878. <https://doi.org/10.3390/foods10112878>

**Windholtz, S., Redon, P., Lacampagne, S., Farris, L., Lytra, G., Cameleyre, M., Barbe, J.-C., Coulon, J., Thibon, C., & Masneuf-Pomarède, I.** (2021). Non-*Saccharomyces* yeasts as bioprotection in the composition of red wine and in the reduction of sulfur dioxide. *Food Research International*, 150, 110749. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110749>

**Windholtz, S., Nioi, C., Coulon, J., & Masneuf-Pomarède, I.** (2023). Bioprotection by non-*Saccharomyces* yeasts in oenology: Evaluation of O<sub>2</sub> consumption and impact on acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 405, 110338. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110338>