

Violeta Pena Batlle

EFFECTE COMBINAT DE L'ÀCID FUMÀRIC I pH EN LA FERMENTACIÓ DEL MOST SINTÈTIC

TREBALL FINAL DE MÀSTER

dirigit per Nicolas Rozès

Màster en BEGUDES FERMENTADES

Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

12 de juny del 2023

EFFECTE COMBINAT DE L'ÀCID FUMÀRIC I pH EN LA FERMENTACIÓ DEL MOST SINTÈTIC

Pena Batllell, V., Rozès, N.

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

violeta.pena@estudiants.urv.cat

paraules clau: *Saccharomyces cerevisiae*; *Oenococcus oeni*; fermentació alcohòlica; fermentació malolàctica; àcid fumàric; lies de llevat

Índex

Resum	1
Abstract.....	1
1. Introducció	2
2. Objectius	5
3. Materials i mètodes	6
3.1. Most sintètic	6
3.2. Microorganismes	6
3.2.1. Llevats.....	6
3.2.2. Bacteris làctics	6
3.3. Lies de llevat.....	7
3.4. Condicions de fermentació	7
3.4.1. Fermentació Alcohòlica	7
3.4.2. Fermetació Malolàctica amb i sense lies de llevat	8
3.4.3. Fermentació Malolàctica amb xocs d'àcid fumàric	8
3.5. Determinacions de les poblacions en llevats i bacteris làctics	9
3.5.1. Població dels llevats.....	9
3.5.2. Població de bacteris làctics	9
3.6. Seguiment de les Fermentacions alcohòlica i malolàctica.....	9
3.6.1. Fermentació Alcohòlica	9
3.6.2. Fermentacions Malolàctiques amb o sense lies de llevat i amb xocs d'àcid fumàric...	10
3.6.3. Càlcul de les àrees de sota la corba (AUC).....	10
3.7. Anàlisi dels principals paràmetres enològics	10
3.7.1. Mesura del pH.....	10
3.7.2. Anàlisis enzimàtics i colorimètrics	10
3.7.3. Anàlisi per HPLC.....	10
3.8. Anàlisi estadístic	11
4. Resultats i discussió	11
4.1. Fermentació alcohòlica.....	11
4.1.1. Cinètica, població i evolució de l'àcid fumàric durant la fermentació alcohòlica	11
4.1.2. Paràmetres químics dels vins	13
4.2. Fermentació malolàctica amb i sense lies de llevat	16

4.2.1.	Cinètica de la fermentació malolàctica i àrea sota la corba (AUC)	17
	17
4.2.2.	Velocitat de consum d'àcid L-màlic	19
4.2.3.	Població viable de bacteris làctics	20
4.2.4.	Paràmetres químics del vi	21
4.3.	Fermentació malolàctica amb xocs d'àcid fumàric	22
4.3.1.	Xoc d'àcid fumàric amb vi en absència d'àcid fumàric	22
4.3.2.	Xoc d'àcid fumàric amb vi en presència d'àcid fumàric	25
5.	Conclusions	27
6.	Perspectives	28
7.	Agraïments	28
8.	Referències	29
9.	Annex 1	31

RESUM

La vinificació és un procés biotecnològic clau que implica la fermentació alcohòlica i la fermentació malolàctica, realitzades pels llevats i els bacteris làctics respectivament. No obstant això, no tots els vins requereixen la fermentació malolàctica, fet que ressalta la importància de conèixer els factors que afecten a la fermentació alcohòlica i als llevats implicats, així com als bacteris làctics que realitzen la fermentació malolàctica i els factors que influeixen en aquesta reacció. És crucial entendre els factors associats a aquests processos per poder conèixer les interaccions entre microorganismes i els factors del medi.

L'objectiu d'aquest treball es estudiar l'efecte de l'addició d'àcid fumàric i de lies de llevat en el most i el vi durant la fermentació alcohòlica i la fermentació malolàctica a dues condicions diferents de pH. Es busca analitzar l'evolució de l'àcid fumàric i els diferents pH en la cinètica de la fermentació alcohòlica i en la població de *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. També s'analitza l'efecte de l'àcid fumàric en diferents etapes de la fermentació malolàctica i la població d'*Oenococcus oeni* VP41. Es realitza un anàlisi dels paràmetres principals del vi al final de la fermentació alcohòlica i de les dues fermentacions malolàctiques en les diferents condicions establertes.

ABSTRACT

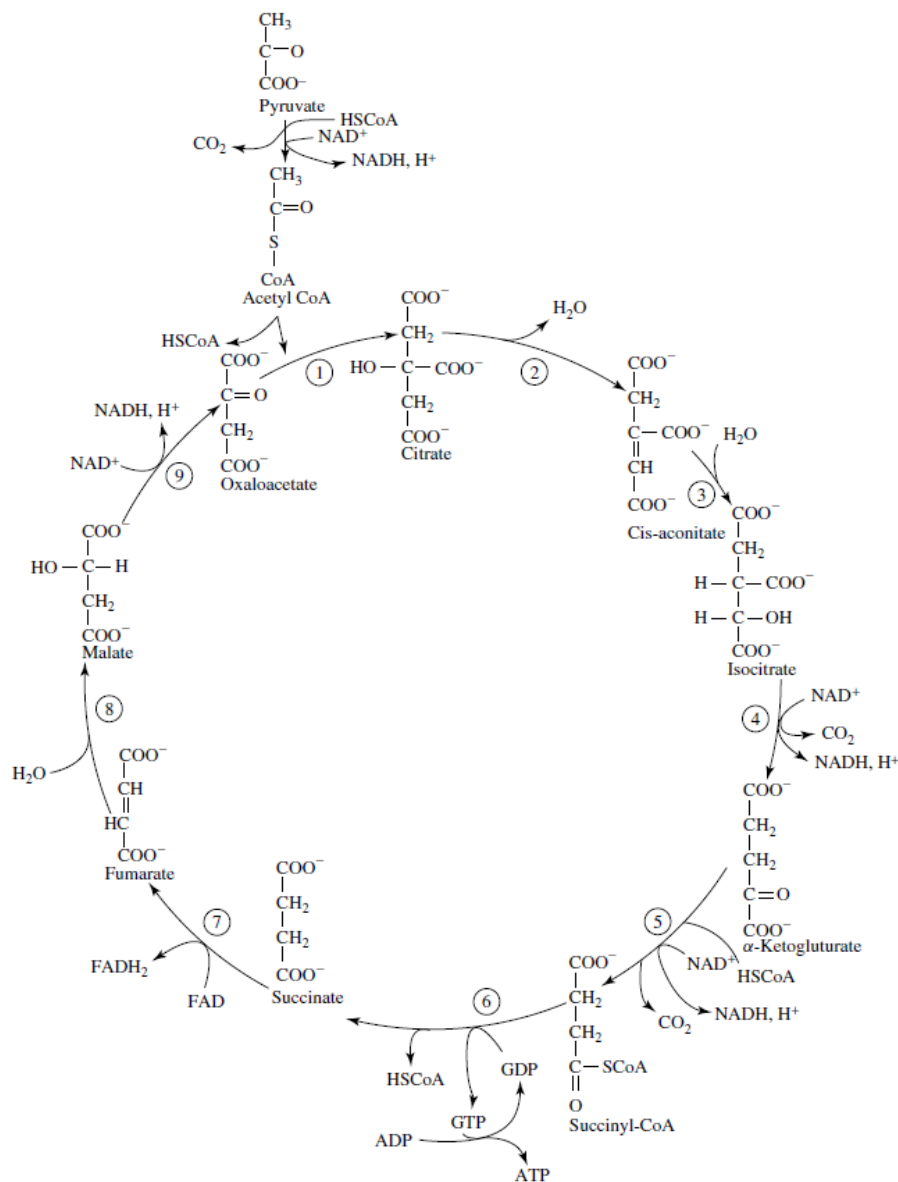
Winemaking is a key biotechnological process involving alcoholic fermentation and malolactic fermentation, carried out by yeasts and lactic acid bacteria respectively. However, not all wines require malolactic fermentation, which highlights the importance of knowing the factors that affect alcoholic fermentation and the yeasts involved, as well as the lactic bacteria that carry out malolactic fermentation and the factors that influence its reaction. It is crucial to understand the factors associated with these processes in order to understand the interactions between microorganisms and environmental factors.

The aim of this work is to study the effect of the addition of fumaric acid and yeast lees in must and wine during alcoholic fermentation and malolactic fermentation at two different pH conditions. The aim is to analyze the evolution of fumaric acid and the different pH in the kinetics of alcoholic fermentation and in the population of *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. The effect of fumaric acid on different stages of malolactic fermentation and the population of *Oenococcus oeni* VP41 is also analyzed. An analysis of the main parameters of the wine is carried out at the end of the alcoholic fermentation and of the two malolactic fermentations under the different established conditions.

1. INTRODUCCIÓ

Catalunya, situada al nord-est d'Espanya, és una regió del Mediterrani que ofereix un clima favorable per al conreu de la vinya i per a la producció de vins de qualitat. Aquest petit territori té una llarga i rica tradició vitivinícola que data segles enrere. El sector vitivinícola català és conegut per la seva diversitat varietal de raïm i per la seva qualitat. Una de les principals característiques que destaca del sector és la presència de nombroses Denominacions d'Origen (DO) i una Denominacions d'Origen Qualificada (DOQ); algunes de les més reconegudes són DOQ Priorat, DO Montsant, DO Penedès, DO Costers del Segre i DO Empordà, entre d'altres. Segons dades oficials de l'any 2021 de la Generalitat de Catalunya, de l'INCAVI i de l'Observatori de la vinya, el vi i el cava, Catalunya té una superfície total de 57.250 ha en producció, 18.637 ha per a varietats negres i 38.391 ha per a varietats blanques. Respecte la collita de raïm es van recollir un total de 421.316 Tn i es van produir 3.246.197 hL de vi, un 33,4% superior a l'any anterior. Les exportacions de vi van ser de 619.218 M d'€, un 19% superior a l'any anterior. Tot i tenir dades molt gratificants i distintives del sector, cal destacar l'efecte del canvi climàtic a la indústria vitivinícola.

El procés de vinificació el constitueixen un seguit d'etapes i operacions que es realitzen per a l'obtenció de vi a partir de la fermentació alcohòlica (FA) del most de raïm i la posterior fermentació malolàctica (FML) del vi. La FA del most és un procés bioquímic que es realitza en tots els vins, en el qual els llevats metabolitzen els sucres en etanol i diòxid de carboni [$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CO_2 + 2 C_2H_6O + 2 ATP$]. Aquest procés es produeix principalment gràcies als llevats del grup *Saccharomyces cerevisiae*, els quals tenen requeriments nutricionals i de creixement variables segons les soques de *S. cerevisiae* ([sucres], [nitrogen], [microelements], temperatura, oxigen i substàncies inhibidores o tòxics) (Kenneth C. Fugelsang & Charles G. Edwards, 2007). La glucosa present en el medi, mitjançant la via metabòlica de la glucòlisi, es degradada en dues molècules d'àcid pirúvic, les quals s'oxiden per obtenir acetaldehid i en el procés de la FA a partir d'aquest obtenir com a producte l'etanol. El cicle de Krebs (CK), també conegut com a cicle de l'àcid cítric, el formen un seguit de processos que es duen a terme a l'interior de les cèl·lules tant dels llevats com dels bacteris làctics durant la FA i la FML, a través dels quals s'obté energia, coenzims i molècules necessàries per al creixement i l'activitat dels llevats. Degut a les característiques del medi en condicions enològiques el CK no es completa i es troba dividit en dos parts. Per una banda es duen a terme les reaccions fins la de formació de l'àcid succínic, i per altra banda, es duen a terme les reaccions fins la formació d' α -cetoglutarat. Es pot observar en l'esquema del CK següent (Figura 1.1).



Aquest cicle s'inicia amb el metabolisme de l'acetil-CoA, una molècula clau en el CK la qual es pot obtenir a partir del metabolisme del piruvat, dels àcids grassos i dels aminoàcids. A través del cicle de Krebs es poden obtenir metabòlits importants per al metabolisme de les cèl·lules; com l'àcid cítric: el metabolisme del qual dona inici al CK, l'àcid α -cetoglutàric: que és un intermediari important per a la producció d'energia i per al metabolisme dels aminoàcids, l'àcid fumàric, l'àcid màlic, l'àcid oxalacètic, per tancar el CK. Per altra banda, la FML, és un procés de descarboxil·lació de l'àcid L-màlic a àcid L-làctic catalitzada pels bacteris làctics, principalment per *Oenococcus oeni* [àcid L-màlic \rightarrow àcid L-làctic + CO_2] (Bauer & Dicks, 2004). Les condicions òptimes per *O. oeni* són: pHs d'entre 3,3-3,6, medi amb aminoàcids, grau alcohòlic d'entre 10-14% (v/v), diòxid de sofre (SO_2) inferior a 50 mg/L, evitar àcids grassos de cadena mitja al medi i temperatures d'entre 18-20°C. Aquest tipus de bacteris poden utilitzar els sucres del medi generant àcid L-làctic i àcid acètic, ja que són heterofermentatius. A més, també poden metabolitzar l'àcid cítric donant lloc al diacetil, un compost volàtil amb aroma a mantega. La FML es realitza en la majoria de vins negres i en alguns tipus de vins blancs per disminuir l'acidesa, empobrir el medi per evitar

microorganismes competidors i augmentar la complexitat aromàtica. No obstant, el canvi climàtic presenta diverses problemàtiques força rellevants per al sector vinícola i la qualitat dels vins. Actualment els productors han d'implementar estratègies adaptatives per continuar amb la producció i mitigar els impactes. Aquestes problemàtiques són l'augment del pH dels vins, l'elevat grau alcohòlic, la disminució de la concentració d'àcid màlic, l'alta quantitat de nitrogen i l'elevada producció d'amines biògenes, entre d'altres. Així doncs, per minimitzar i eludir aquest seguit de problemes en el món del vi i per evitar la FML en vins blancs i rosats, una de les principals alternatives que s'ha proposat es modificar el procés de vinificació e inhibir la FML del vi. (Ubeda et al., 2020)

Per tant, l'alternativa que els productors utilitzen per contrarestar la disminució de l'acidesa total dels vins i el fet d'inhibir la FML en els vins poc àcids és afegir àcids orgànics al vi. Els àcids orgànics tenen un paper fonamental tant en la FA com en la FML del vi. La seva importància no es limita només al fet que són productes metabolitzats pels microorganismes implicats en aquests processos, sinó que també tenen un impacte significatiu en la química i en el perfil general del vi. Per això és important conèixer les propietats d'aquests compostos i especialment els pK_a (Figura 1.2 següent).

Taula 1.2 – Dades del pK_a dels principals àcids orgànics en el vi. Font: (Gancel et al., 2022)

Àcids orgànics	pK_a a 20°C	Àcids orgànics	pK_a a 20°C
Àcid tartàric	2,98-4,34	Àcid cítric	3,09-4,39-5,74
Àcid L-màlic	3,40-5,05	Àcid fumàric	3,03-4,44
Àcid L-làctic	3,81	Àcid succínic	4,18-5,23

Els àcids orgànics autoritzats per la Organització Internacional de la Vinya i del Vi (OIV) són els àcids D- i L-làctic, l'àcid L-tartàric, l'àcid cítric, i des del 2021, l'àcid fumàric. L'àcid fumàric, E297, és un àcid de baixa solubilitat (6,6-8,1 g/L) en comparació amb els altres àcids que en baixes concentracions es capaç d'inhibir el procés de la FML mitjançant el control del creixement i de l'activitat dels bacteris làctics (Morata et al., 2020). A més, té una acció acidificant i pot ser una forma complementaria per reduir l'addició d'anhídrid sulfurós durant el procés de vinificació. L'àcid fumàric es pot afegir en vins a una dosis màxima permesa de 0,6 g/L sense repercutir en les característiques organolèptiques (International Organization of Vine and Wine, 2021a, 2021b) . A part de l'acció inhibidora de l'àcid fumàric, en els casos que es duu a terme la FML, hi ha diferents condicionants que influeixen en el procés de la FML i que s'han de tenir en compte. Alguns d'aquests condicionants son: la temperatura, el pH, els àcids orgànics i la presència o absència de lies de llevat.

- La temperatura és un factor essencial per al procés fermentatiu i per al desenvolupament d'*O. oeni* VP41. Les temperatures òptimes solen estar entre els 18-20°C, ja que els valors massa baixos poden alentir l'activitat dels bacteris làctics i les temperatures massa altes poden afectar negativament el perfil organolèptic del vi (Bauer & Dicks, 2004).
- El pH del vi és un factor imprescindible per l'activitat d'*O. oeni*, per aquest motiu es necessari que els valors del pH siguin superiors a 3,3 i així facilitin la supervivència i l'activitat dels bacteris làctics; un pH més baix provoca inconvenients en l'activitat metabòlica de la soca VP41 (Bauer & Dicks, 2004).

- Els àcids orgànics principals que es troben en el vi són l'àcid L-màlic, l'àcid tartàric, l'àcid succínic i, en el cas de ser afegit, l'àcid fumàric. Els nivells d'àcid L-màlic disponibles en el vi són essencials per a la realització de la FML; l'àcid tartàric és un dels principals àcid orgànics del vi, el qual només pot ser metabolitzat pels bacteris làctics en condicions aeròbiques. L'àcid succínic és produït durant la FA per part dels llevats, tant mateix, aquest àcid no és metabolitzat pels bacteris làctics durant la FML. L'àcid fumàric és un àcid que pot estar present en el vi per dos fets: degut al metabolisme dels llevats en el CK a partir del succinat o degut a l'addició d'aquest àcid en el vi (Bauer & Dicks, 2004).
- Les lies de llevat provenen de la biomassa i de les restes dels llevats durant la FA. L'addició d'aquestes durant la FML pot estimular el rendiment d'*O. oeni* VP41 degut a la major disponibilitat de manoproteïnes i compostos nitrogenats. Aquestes macromolècules presents en el medi poden ser assimilades pels bacteris làctics com a font de nitrogen, afavorint en el seu metabolisme (Balmaseda et al., 2021).

2. OBJECTIUS

L'addició d'àcid fumàric de moment només s'autoritza en vins afectats com s'ha descrit anteriorment. S'ha demostrat en els estudis realitzats que l'àcid fumàric es metabolitza poc pels bacteris làctics i que té un efecte inhibitori dels mateixos en els vins, no obstant, falta sobre l'efecte de l'àcid fumàric respecte als llevats, tant a nivell del desenvolupament de la FA com en el metabolisme dels llevats durant el procés, ja que sabem que l'àcid fumàric és un metabòlit del CK. Per altra banda, com s'ha mencionat anteriorment a la Taula 1.2, aquest àcid té un pK_{a1} de 3,03 i un pK_{a2} de 4,44, el seu efecte es dona lloc a pHs extremes tant pels llevats com pels bacteris làctics. Per tant, seria interessant estudiar l'efecte de l'àcid fumàric en mostos i vins a pH 3 i 4. La presència de les lies de llevat, pòsit constituït principalment pels llevats que realitzen la FA, seria un paràmetre interessant d'estudiar per conèixer la seva influència en l'eficiència de l'àcid fumàric en els vins.

Per tant, l'objectiu principal d'aquest treball és estudiar l'efecte de l'addició d'àcid fumàric i de lies de llevat en el most i el vi durant la FA i la FML en dues condicions de pH.

Els objectius específics són:

- Estudi de l'efecte i de l'evolució de l'àcid fumàric i els diferents pH en la cinètica de la FA i en la població de *Saccharomyces cerevisiae* EC1118.
- Estudi de l'efecte i de l'evolució de l'àcid fumàric, els diferents pH i l'addició de lies de llevat en la cinètica de la FML i en la població d'*Oenococcus oeni* VP41.
- Estudi de l'efecte de xocs d'àcid fumàric en diferents moments de la FML respecte la cinètica de la fermentació i la població d'*Oenococcus oeni* VP41.
- Anàlisi de l'efecte de les diferents condicions en els principals paràmetres del vi al final de la FA i de les dues FML.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. MOST SINTÈTIC

El most sintètic que es va utilitzar per a realitzar la fermentació alcohòlica es va preparar segons Ruiz-de-Villa et al., 2023 110 g/L glucosa (Panreac, Barcelona, Espanya): 110 g/L fructosa (Panreac), 5 g/L d'àcid tartàric (Sigma-Aldrich, Barcelona, Espanya), 2 g/L d'àcid L-màlic (VWR, Barcelona, Espanya), 0,5 g/L d'àcid cítric (Panreac), 1,7 g/L de Yeast Nitrogen Base sense aminoàcids ni sulfat d'amoni (Difco,), 50 mg N/L de clorur d'amoni (Panreac) i 1,56 mg N/L d'un stock d'aminoàcids (tots de Sigma-Aldrich, composició en Annex 1-Taula A3). Per tal de reproduir les condicions més semblants a les del most natural es va ajustar una part del most a pH 3 i l'altra part a pH 4.

Un cop ajustat el pH, es va filtrar el most amb una membrana de 0,22 µm (Sigma) amb una bomba de vuit en un recipient estèril. Posteriorment, es va afegir una solució de β-sitosterol (Ref: 85541, Sigma-Aldrich) i àcid linoleic (Ref: 62240, Sigma-Aldrich) per obtenir una concentració final de 5 i 100 mg/L respectivament. Finalment, els dos mostos preparats a pH 3 i 4 es van separar en dos condicions, adició d'àcid fumàric (Ravago Chemicals, Barcelona, España) (3MF i 4MF) amb una dosi de 0,6 g/L i sense àcid fumàric (3M i 4M); (Figura 3.1.1).

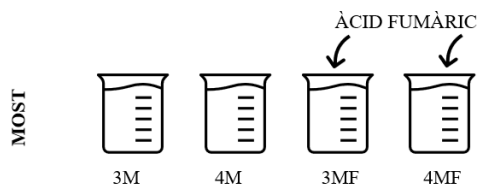


Figura 3.1.1 - Esquema de les condicions del most. Font: pròpia.

3.2. MICROORGANISMES

3.2.1. Llevats

Per dur a terme la FA es va utilitzar la soca de llevat *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (Lallemand S.A., Montreal, Canadà), llevat sec actiu (LSA) comercial. Per preparar els inòculs es van seguir les instruccions del fabricant per rehidratar-la a 38°C durant 30 minuts amb aigua destil·lada estèril. La tasa d'inoculació va ser $1 \cdot 10^6$ cèl·lules/mL.

3.2.2. Bacteris làctics

Per realitzar la FML es va escollir la soca VP41 d'*Oenococcus oeni* (Lallemand), ja que aquesta soca ha demostrat obtenir bons resultats en estudis anteriors de Ruiz-de-Villa et al., 2023. Per les FML amb i sense lies de llevat, *O.oeni* VP41 (conservada amb 15% (v/v) de glicerol a -80°C) es van reactivar en medi líquid modificat de Man Rogosa Sharpe (MRS) a 28°C. La composició del MRS és la següent: 55 g/L MRS (Scharlau, Barcelona, Espanya) complementat amb 4 g/L d'àcid D,L-màlic (Sigma-Aldrich,) i 5 g/L de fructosa (Panreac) a pH 5. Les fermentacions es van inocular amb una població inicial de d'*O. oeni* d' $1 \cdot 10^7$ cèl·lules/mL.

Per realitzar la FML amb xocs d'àcid fumàric també es va utilitzar *O.oeni* VP41 liofilitzada (Lallemand). Per rehidratar els bacteris es van seguir les instruccions del fabricant: 20°C durant 10 minuts amb aigua destil·lada estèril. La població inicial de bacteris va ser d' $1 \cdot 10^7$ cèl/mL.

3.3. LIES DE LLEVAT

Els vins resultants de la FA es van centrifugar a 10.000 rpm durant 15 minuts, un cop centrifugats, es va obtenir el pellet de cada condició, que és la biomassa i les restes dels llevats. Aquests pellets es van congelar i liofilitzar per tal d'obtenir les lies de llevats de cada condició. L'esquema de l'obtenció de les lies de llevat a partir dels vins es pot veure en la Figura 3.3.1.

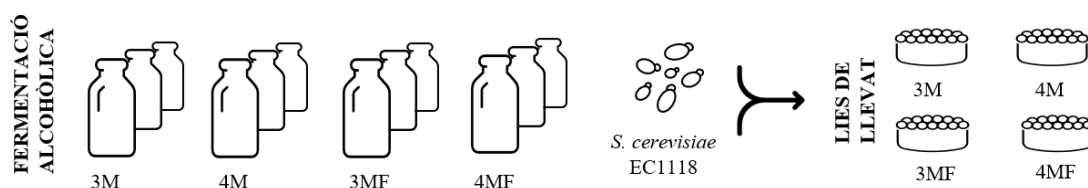


Figura 3.3.1 - Esquema de l'obtenció de les lies de llevat. Font: pròpia

3.4. CONDICIONS DE FERMENTACIÓ

3.4.1. Fermentació Alcohòlica

Per dur a terme les FA dels mostos sintètics es van preparar quatre condicions: dos valors de pH, 3 i 4, i dos tipus de most, un most control (M) i un most en el qual s'afegia 0,6 g/L d'àcid fumàric (MF). Per dur a terme la fermentació alcohòlica es van utilitzar fermentadors de 500 mL, es van afegir 400 mL de most sintètic a cada fermentador i es van posar a una agitadora-incubadora (Infors HT, Bottmingen, Suïza) a 28°C i una agitació a 80 rpm. Totes les fermentacions es van realitzar per triplicat. Un cop acabada la FA, els vins es van estabilitzar durant 7 dies a 4°C. Passada l'estabilització, el vi resultant es va centrifugar a 10.000 rpm durant 15 minuts. El vi centrifugat es va filtrar amb membranes de 0,22 µm (Merck) mitjançant una bomba de buit. L'esquema general de les diferents condicions es troba a l'Annex 1 – Figura A1.

3.4.2. Fermetació Malolàctica amb i sense lies de llevat

Per realitzar la FML es van reunir els triplicats de cada condició (pH 3 i 4 i M i MF) per obtenir 4 vins. A aquestes 4 condicions se'ls van afegir 2 condicions més, la de presència o absència de lies a una concentració d'1 g/L; es mostra l'esquema del pla experimental a la Figura 3.4.2.1. Les FML es van realitzar amb tubs de 50 mL a 20°C en condicions estàtiques.

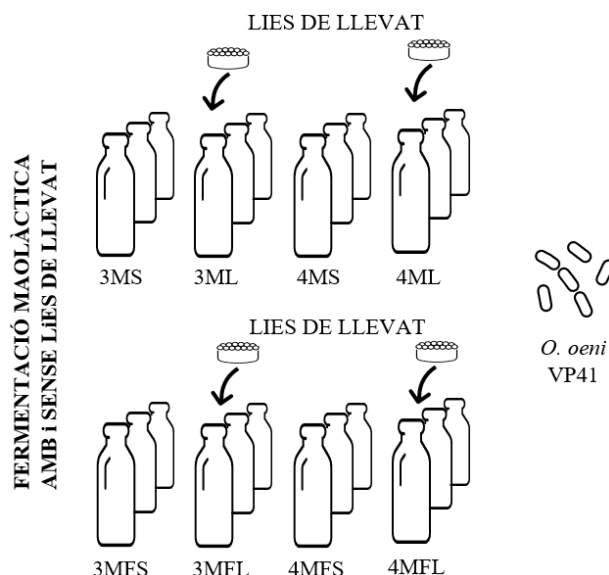


Figura 3.4.2.1 - Esquema de les diferents condicions de fermentacions malolàctiques amb i sense lies de llevat. 3MS, pH 3 vi control sense lies; 3ML, pH 3 vi control amb lies; 4MS, pH 4 vi control sense lies; 4ML, pH 4 vi control amb lies; 3MFS, pH 3 vi amb àcid fumàric sense lies; 3MFL, pH 3 vi amb àcid fumàric i lies; 4MFS, pH 4 vi amb àcid fumàric sense lies ; 4MFL, pH 4 vi amb àcid fumàric i lies. Font: pròpia

3.4.3. Fermentació Malolàctica amb xocs d'àcid fumàric

Per a realitzar aquesta FML el vi restant a pH 4 de la fermentació alcohòlica es va corregir. En el cas del vi amb àcid màlic, es va afegir 0,2 g/L d'àcid màlic i en el cas del most amb àcid fumàric a pH es va corregir amb 0,2 g/L d'àcid màlic. Posteriorment els dos vins van ser corregits fins a pH 4 amb KOH a 5M. Les condicions de les FML dels xocs van ser: pH 4 i most màlic, amb control, xoc A i xoc B, i pH 4 i most

màlic i fumàric, amb control, xoc A i xoc B. Es pot observar l'esquema a la Figura 3.4.3.1 següent. Les FML es van realitzar en tubs de 50 mL, a 20°C en estàtica.

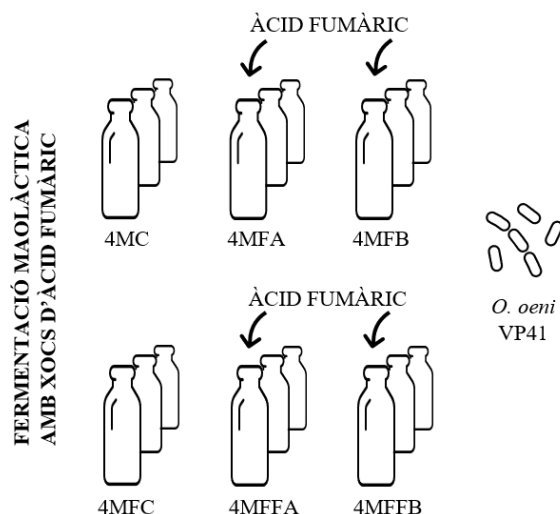


Figura 3.4.3.1 - Esquema de les diferents condicions de fermentacions malolàctiques amb xocs d'acid fumàric. Font: pròpia

3.5. DETERMINACIONS DE LES POBLACIONS EN LLEVATS I BACTERIS LÀCTICS

3.5.1. Població dels llevats

Es va realitzar el recompte de les cèl·lules viables dels llevats en medi sòlid Yeast extract Peptone Dextrose Agar (YPDA), les quals contienien 10 g/L d'extracte de llevat (Panreac), 20 g/L de peptona (Panreac), 20 g/L de glucosa (Panreac) i 20 g/L d'agar (Panreac). A partir de dilucions seriades es va sembrar el YPDA en superfície i les plaques s'incubaven durant 48 h a 27°C.

3.5.2. Població de bacteris làctics

El recompte de bacteris làctics es va realitzar en plaques MRS solidificat amb 20 g/L d'agar (Panreac) a un pH de 5. Les plaques un cop sembrades s'incubaven durant 8 dies a 27°C en una incubadora de CO₂ (10%).

3.6. SEGUIMENT DE LES FERMENTACIONS ALCOHÒLICA I MALOLÀCTICA

3.6.1. Fermentació Alcohòlica

Durant el procés, es van prendre mostres diàries i es va determinar la cinètica de fermentació mitjançant la mesura de la densitat de mostres centrifugades amb un densímetre electrònic (Densito 30PX Portable Density Mettler-Toledo, Espanya). El final de la fermentació alcohòlica es va considerar quan la concentració de sucres era inferior a 2 g/L, determinada de manera enzimàtica mitjançant el multianalitzador Y15 (Biosystems S.A., Barcelona, Espanya).

3.6.2. Fermentacions Malolàctiques amb o sense lies de llevat i amb xocs d'àcid fumàric

El consum d'àcid L-màlic es va controlar de manera enzimàtica a diari mitjançant l'analitzador Y15 (Biosystems S.A.). Les FML es van considerar completades quan la concentració d'àcid L-màlic $< 0,1$ g/L o quan la concentració d'àcid L-màlic era constant durant 1 setmana.

3.6.3. Càlcul de les àrees de sota la corba (AUC)

La mesura de l'àrea sota la corba (AUC) tant per la baixada de les densitats de la FA o el consum de L-màlic durant la FML, es va utilitzar com a indicador del rendiment de fermentació, el qual, ens va permetre donar-nos una indicació sobre els consums de sucres per part dels llevats i d'àcid L-màlic per part dels bacteris làctics independentment dels temps totals de cada procés. Les AUCs es van calcular integrant la disminució de la densitat durant la FA o la reducció del consum d'àcid L-màlic durant la FML entre dues vegades consecutives. La fórmula del càlcul és la suma de les AUCs consecutives = $\Sigma [((d_2+d_1)/2) * (t_2-t_1) + \dots + ((d_n+d_{n-1})/2) * (t_n-t_{n-1})]$ on $d_1, d_2, \dots, d_n, d_{n-1}$ són les densitats del most de raïm/vi en els temps 1, 2, n i n-1, respectivament.

3.7. ANÀLISI DELS PRINCIPALS PARÀMETRES ENOLÒGICS

3.7.1. Mesura del pH

Es va mesurar el pH dels mostos, dels vins abans i després de la FA i dels vins abans i després de la FML. La mesura es va fer mitjançant un pH-metre, que per tal de garantir la precisió de les mesures es va calibrar amb solucions de pHs coneguts (4 i 7).

3.7.2. Anàlisis enzimàtics i colorimètrics

Es van analitzar els mostos abans de la FA i els vins després de la FA, abans de les FML i un cop acabades. Per tal de determinar la concentració dels àcids orgànics (tartàric, acètic, D-làctic, L-làctic, cítric i L-màlic) i altres metabòlits (glucosa-fructosa, nitrogen amino primari (PAN) i amoni). Els diferents metabòlits es van quantificar de manera enzimàtica mitjançant el multianalitzador Y15 (Biosystems S.A.). El pre-tractament de la mostra consistia en centrifugar les mostres a 7.800 rpm durant 5 minuts per tal d'evitar partícules en suspensió.

La determinació de la concentració de l'àcid fumàric abans de la FA i dels vins després de la FA, abans de les FMLs i un cop acabades, es va realitzar utilitzant el mètode Fernández-Vázquez et al., 2021.

3.7.3. Anàlisi per HPLC

Després de la FA es van analitzar el glicerol, l'etanol i l'àcid succínic del vi per cromatografia líquida d'alt rendiment (HPLC) mitjançant un Agilent 1100 (Tecnologies Agilent, Waldbronn, Alemanya) segons el mètode de Zhu et al., 2020. El procediment de preparació de la mostra implicava filtrar les mostres amb filtres de porus de $0,22 \mu\text{m}$ (Tecnologies Agilent) abans de la injecció. Les condicions cromatogràfiques eren: columna HI-PLAX H (300 mm x 7,7 mm) dintre un forn a 60°C , una fase mòbil constituïda per 5 mM H_2SO_4 i un cabal de 0,6 mL/min. Els diferents metabòlits van ser detectats a 210 nm mitjançant un

detector MWC (detector de longitud de diverses ones G1365B) i per refracció amb un detector RID (detector d'índex de refracció de 1260 Infinity II, tecnologies Agilent). Les concentracions de glicerol, d'etanol i d'àcid succínic es van calcular a partir de les rectes de calibració externes dels estàndards coneguts.

3.8. ANÀLISI ESTADÍSTIC

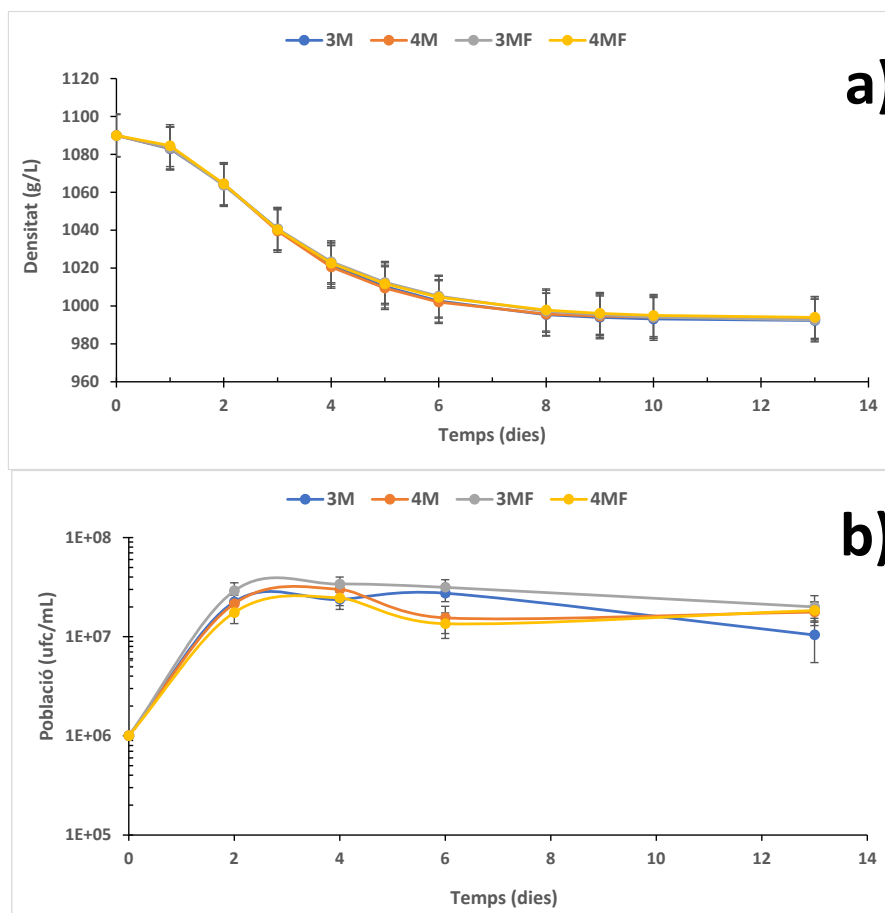
Tant la FA com les dues FMLs es van realitzar amb totes les condicions per triplicat. Es va utilitzar la versió 2021.5.1 del programari XLSTAT (Addinsoft, París, França) per a realitzar els anàlisis estadístics. Les dades es van analitzar mitjançant un ANOVA bidireccional i amb proves Tukey HSD (diferència significativa de l'honestedat) amb un interval de confiança del 95% i el nivell significatiu amb un valor $p < 0,05$.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. FERMENTACIÓ ALCOHÒLICA

A continuació s'analitzen els resultats de les fermentacions alcoholiques que es van realitzar a pH 3 i 4, tant en presència només d'àcid L-màlic en el most com en presència simultània d'àcid L-màlic i àcid fumàric per a cada condició de pH.

4.1.1. Cinètica, població i evolució de l'àcid fumàric durant la fermentació alcoholica



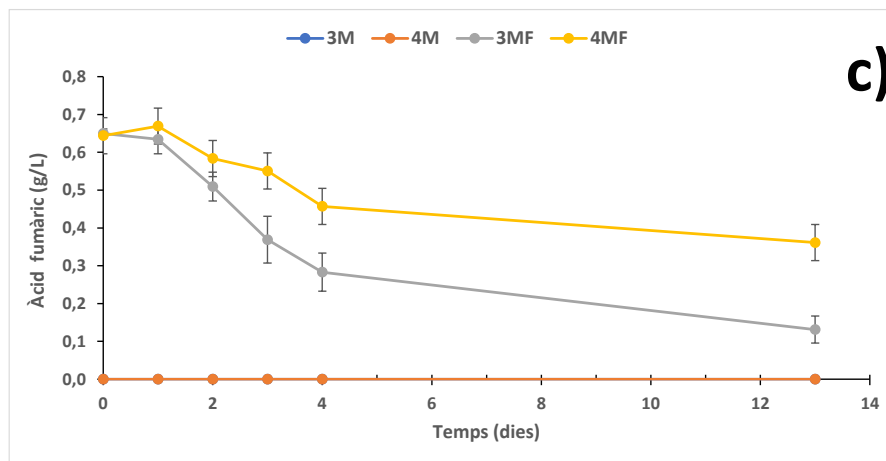


Figura 4.1.1.1 a) Evolució de la cinètica de la fermentació alcohòlica dels mostos sintètics 3M – most de pH 3 amb àcid màlic, 4M – most de pH 4 amb àcid màlic, 3MF – most de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric i 4MF – most de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric amb *S. cerevisiae* representada mitjançant la densitat (g/L) al llarg del temps (dies). b) - Seguiment de la població de llevats cultivables (ufc/mL) durant la fermentació alcohòlica dels mostos sintètics 3M, 4M , 3MF i 4MF. c) – Evolució de la concentració d'àcid fumàric (g/L) durant la fermentació alcohòlica dels mostos sintètics 3M , 4M, 3MF i 4MF al llarg del temps (dies). Font: pròpia

A la Figura 4.1.1.1 a) de l'evolució de la cinètica de la fermentació es pot observar que tot i no haver canvis significatius rellevants al llarg del procés i que les fermentacions es van completar totes al dia 13, a meitat de la fermentació el consum de sucres dels medis 3MF i 4MF és menor respecte les condicions que no tenen àcid fumàric (3M i 4M). Aquest fet també es veu reflectit en la Taula A4 de l'Annex 1 en els valors de la concentració de sucres residuals. Tan mateix, a la Figura A2 de l'Annex 1 – Representació de les AUCs, s'observa un increment de les AUCs dels mostos 3MF i 4MF, 11258,2 i 11260,6 en comparació amb les AUCs dels mostos 3M i 4M, 11245,1 i 11244,6. Tenint en compte també les lletres dels grups segons l'ANOVA, es pot veure que el pH no influeix de forma significativa en la cinètica de la fermentació alcohòlica en aquest cas però sí que ho fa la presència d'àcid fumàric en el medi, tot el contrari dels resultats de l'article de Jamalzadeh et al., 2012.

A la Figura 4.1.1.1 b) s'observa que la població de *S. cerevisiae* a l'inici de les FAs en les quatre condicions és de $10^6 \pm 0$ ufc/mL. Les poblacions augmenten de forma exponencial fins al dia 3, on arriben al màxim de població, amb valors de fins a 3×10^7 ufc/mL. Es pot veure que durant tota la FA es manté la població entre les condicions, no obstant, en la condició 3M la població final és de forma no significativa inferior a les demés, amb un valor d' 1×10^7 ufc/mL.

A la figura 4.1.1.1 c) s'observa que no hi ha quantificació d'àcid fumàric en els mostos 3M i 4M al llarg de la fermentació alcohòlica. El fet de que la concentració d'àcid fumàric sigui 0 g/L en tota la fermentació pot ser degut a que el llindar de detecció del kit enzimàtic sigui superior a les concentracions d'àcid fumàric dels vins 3M i 4M. El límit de quantificació i el límit de determinació del mètode enzimàtic per a la quantificació d'àcid fumàric en most sintètic amb àcid màlic és de 0,016 g/L i 0,055 g/L respectivament (Fernández-Vázquez et al., 2021).

En el cas dels motos 3MF i 4MF, es pot observar que la concentració inicial d'àcid fumàric és de 0,65 g/L. A la Figura 4.1.1.1 c) es mostra que durant la fermentació la concentració d'àcid fumàric extracel·lular disminueix de forma gradual amb el temps. S'observa que hi ha una diferència significativa en les concentracions finals d'àcid fumàric en els vins 3MF i 4MF, on les concentracions a l'últim dia de fermentació són 0,13 i 0,36 g/L respectivament. Segons Shah et al., 2016, i tal com s'observa al gràfic, disminueix la concentració d'àcid fumàric degut a que les cèl·lules de llevat capturen l'àcid fumàric a l'interior de la cèl·lula mitjançant el mètode d'importació de la difusió passiva, quan l'àcid es troba de forma no-dissociada al medi. Tant mateix, la concentració més baixa de fumàric a final de fermentació és en la condició 3MF. El pK_a1 de l'àcid fumàric (3,03) és molt proper al pH del vi (pH =3), d'aquesta forma hi ha un 50% d'àcid fumàric no dissociat en equilibri amb l'altre 50% de la forma monodissociada, així doncs, tal com diu Gancel et al., 2022 i Jamalzadeh et al., 2012, l'àcid no dissociat és la principal espècie que absorbeixen les cèl·lules de llevat per difusió passiva, ja que la força motriu en aquestes condicions és de l'exterior cel·lular a l'interior. Per tant, les condicions del vi a pH 3 faciliten la captació de l'àcid fumàric.

4.1.2. Paràmetres químics dels vins

La composició metabòlica dels vins un cop finalitzada la fermentació alcohòlica va canviar entre les diferents condicions. Es pot consultar a Annex 1 - Taules A3 i A4 les dades dels diversos paràmetres tant a l'inici com al final de la FA: pH, en g/L: densitat, glucosa-fructosa, àcid tartàric, àcid acètic, àcid D-làctic, àcid L-làctic, àcid cítric, àcid succínic i àcid L-màlic, en v/v% l'etanol i finalment, en mg N/L: nitrogen-PAN, nitrogen-AMONI i YAN final.

Pel que fa al pH dels vins, es pot observar una disminució de l'acidesa en els quatre vins un cop acabada la fermentació alcohòlica. Es pot observar a la Taula A4 que entre els vins de les condicions 3M i 3MF hi ha diferència significativa en el valor del pH.

Les dades dels sucres residuals (glucosa-fructosa) dels vins sintètics que s'aprecien a la Taula A4 mostren que en tots els casos la concentració és inferior a 2 g/L, per tant hi ha hagut un elevat consum per part del llevat en totes les condicions; no obstant, les concentracions de glucosa-fructosa a pH 4 (4M i 4MF) són significativament inferiors a la concentració de la condició 3MF.

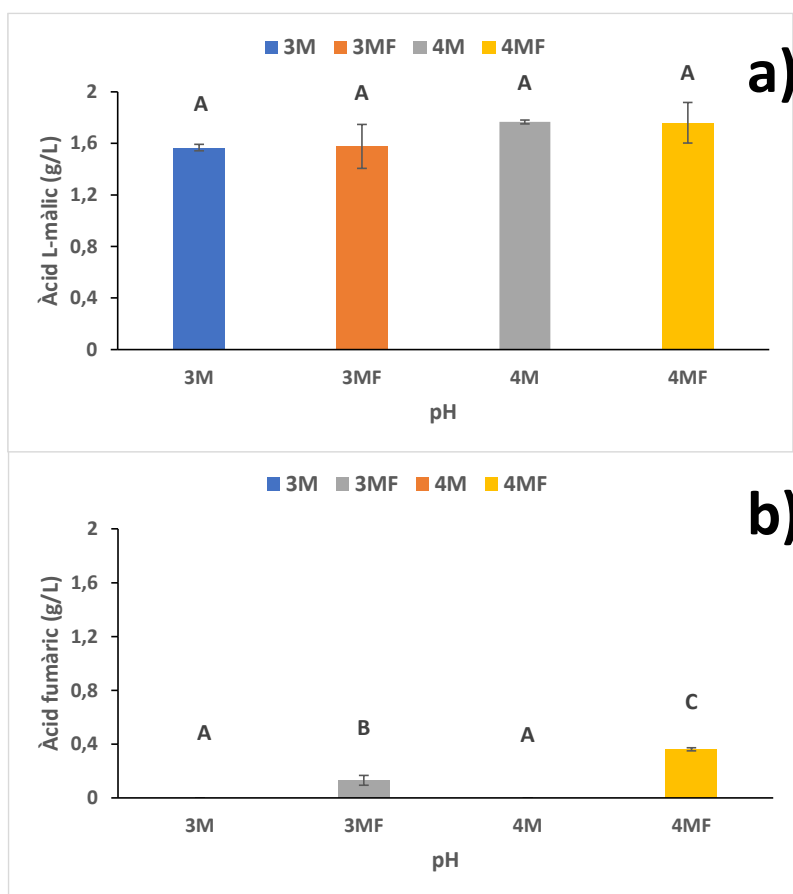
Tal com es veu a la Taula A4, hi ha hagut una baixa producció d'etanol en les quatre condicions. Tant mateix, en les condicions on hi havia presència d'àcid fumàric en el most (3MF i 4MF) s'observa que la tendència és d'una disminució del grau alcohòlic del vi.

En el cas del glicerol, nitrogen-AMONI, àcid acètic, àcid L-làctic, àcid cítric i àcid L-màlic, no s'observa cap diferència significativa entre les diferents condicions.

Les dades del nitrogen-PAN dels vins mostren que en totes les condicions hi ha hagut un elevat consum per part del llevat, ja que les concentracions inicials de PAN eren de $131,33 \pm 5,26$ mg N/L. El consum del nitrogen-PAN durant la fermentació és per part de la soca EC1118 de *S. cerevisiae*, ja que utilitzen aquest aport de nitrogen per dur a terme les funcions metabòliques, per al seu creixement i per a la síntesi d'aminoàcids (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

Quan s'analitzen els valors de les diferents condicions d'àcid tartàric es pot observar que del valor inicial, 5 g/L, hi ha hagut una disminució de 0,5 g/L, la qual s'associa principalment a la precipitació de l'àc. tartàric degut a l'estabilització dels mostos abans de començar la fermentació.

Tenint en compte els valors de la Taula A4 de l'àcid D-làctic es detecta que hi ha una escassa formació d'aquest metabòlit, els valors del qual són lògics en el procés de la fermentació alcohòlica (Ribéreau-Gayon et al., 2006a) . S'observa que la condició 3MF té una diferencia significativa amb la resta de condicions (3M, 4M i 4MF). Aquesta petita formació d'àc. D-làctic deriva del metabolisme dels llevats EC1118, els quals a partir del sucre donen lloc a l'àc. D-làctic.



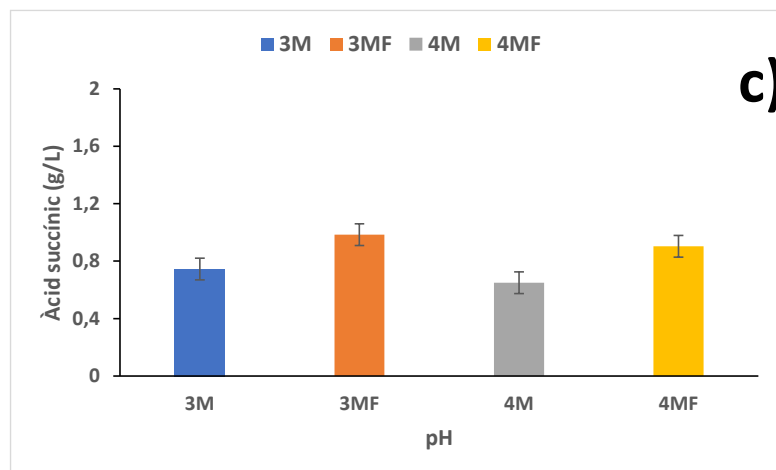


Figura 4.1.2.1 - Concentracions en àcid L-màlic a), àcid fumàric b) i àcid succínic c) al final de la fermentació alcohòlica dels mostos sintètics a pH 3 i 4, en presència de 0,6 g/L d'àcid fumàric (F) o en la seva absència. Les lletres indiquen diferències significatives entre condicions. Font: pròpia.

Les concentracions d'àcid L-màlic en els vins al final de la FA no son significativament diferents (Figura 4.1.2.1 a). No obstant, s'observa una major desaparició d'àcid L-màlic a pH 3 de forma independent a l'addició o no d'àcid fumàric ($-22,4 \pm 0,08 \%$), mentre que a pH 4 la disminució de la concentració és de $12,3 \pm 0,2\%$.

A la figura 4.1.2.1 b) s'observa que no hi ha quantificació d'àcid fumàric en els mostos 3M i 4M al llarg de la fermentació alcohòlica. El fet de que la concentració d'àcid fumàric sigui 0 g/L en tota la fermentació pot ser degut a que el llindar de detecció del kit enzimàtic sigui superior a les concentracions d'àcid fumàric dels vins 3M i 4M. El límit de quantificació i el límit de determinació del mètode enzimàtic en most sintètic amb àcid màlic és de 0,016 g/L i 0,055 g/L respectivament (Fernández-Vázquez et al., 2021). En el cas dels motos 3MF i 4MF, es pot observar que durant la fermentació la concentració d'àcid fumàric extracel·lular disminueix de forma gradual amb el temps. S'observa que hi ha una diferència significativa en les concentracions finals d'àcid fumàric per a 3MF i 4MF, ja que l'últim dia de fermentació son 0,13 i 0,36 g/L respectivament. El metabolisme de l'àcid fumàric en aquestes condicions, ja sigui per conversió en altres metabòlits i/o l'adhesió de l'àcid a les parets cel·lulars, és més gran a pH 3 (0,52 g/L) que a pH 4 (0,28 g/L).

Per altra banda a la Figura 4.1.2.1 c) s'observa que les concentracions d'àcid succínic dels vins són més elevades en presència d'àcid fumàric independentment del pH. Si es calculen les diferències entre les condicions amb presència i absència d'àcid fumàric al medi per als dos pHs estudiats amb les mitjanes, podem observar que aquesta diferència és pràcticament igual en els dos casos: a pH 3, tenim $0,99 - 0,75 = 0,24$ g/L d'àcid fumàric i a pH 4, tenim $0,91 - 0,65 = 0,26$ g/L. Segons aquests resultats semblaria que la formació d'àcid succínic depèn més de la presència d'àcid fumàric en el medi que del pH.

Tenint en compte les variacions dels els àcids durant el procés fermentatiu i les tres figures 4.1.2.1 a, b i c) anteriors, es pot explicar la formació d'àcid succínic durant la FA tenint en compte que s'ha descrit en la literatura que la *fumarat reductasa* pot convertir l'àcid fumàric en àcid succínic en condicions enològiques, de fermentació i d'hipòxia (Camarasa et al., 2003; Hauber & Singer, 1967; Rossi, 1964; Wales & Lloyd2, 1979). És difícil de formular una hipòtesis sobre la disminució de l'àcid fumàric, destacant la de pH 3. Una part del fumàric podria anar a la formació d'àcid succínic com s'ha explicat abans, però els 0,28 g/L restants tenen un destí hipotètic. No obstant sabem que a pH 3, l'àcid fumàric entra fàcilment en la cèl·lula perquè té un pK_{a1} de 3,03 i per tant entrarà a priori més que a pH 4. Part d'aquest fumàric del qual no es coneix el destí podria anar a la formació d'àcid L-màlic mitjançant l'acció de la *fumarasa* que té normalment una afinitat més gran per l'àcid fumàric que la *fumarat reductasa* (Pines et al., 1996), tot i que els llevats en condicions enològiques contenen més *malat deshidrogenases* i *fumarat reductases* que *fumarases* (Hauber & Singer, 1967; Rossi, 1964; Wales & Lloyd2, 1979). Tenint en compte els valors de les Taules A3 i A4 de l'Annex 1, en els que es mostra que la concentració d'àcid L-màlic disminueix durant la FA, no s'exclou pensar que una part de l'àcid fumàric podria passar a àcid oxalacètic via la *fumarasa* i la *malat deshidrogenasa*, el destí d'aquest àcid es desconeix.

4.2. FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA AMB I SENSE LIES DE LLEVAT

A continuació es descriuen vuit fermentacions amb dues condicions de pH diferents (3 i 4), dos tipus de vi diferents (amb àcid L-màlic i amb àcid L-màlic i àcid fumàric) i una variació addicional: la presència o absència de lies de llevat.

4.2.1. Cinètica de la fermentació malolàctica i àrea sota la corba (AUC)

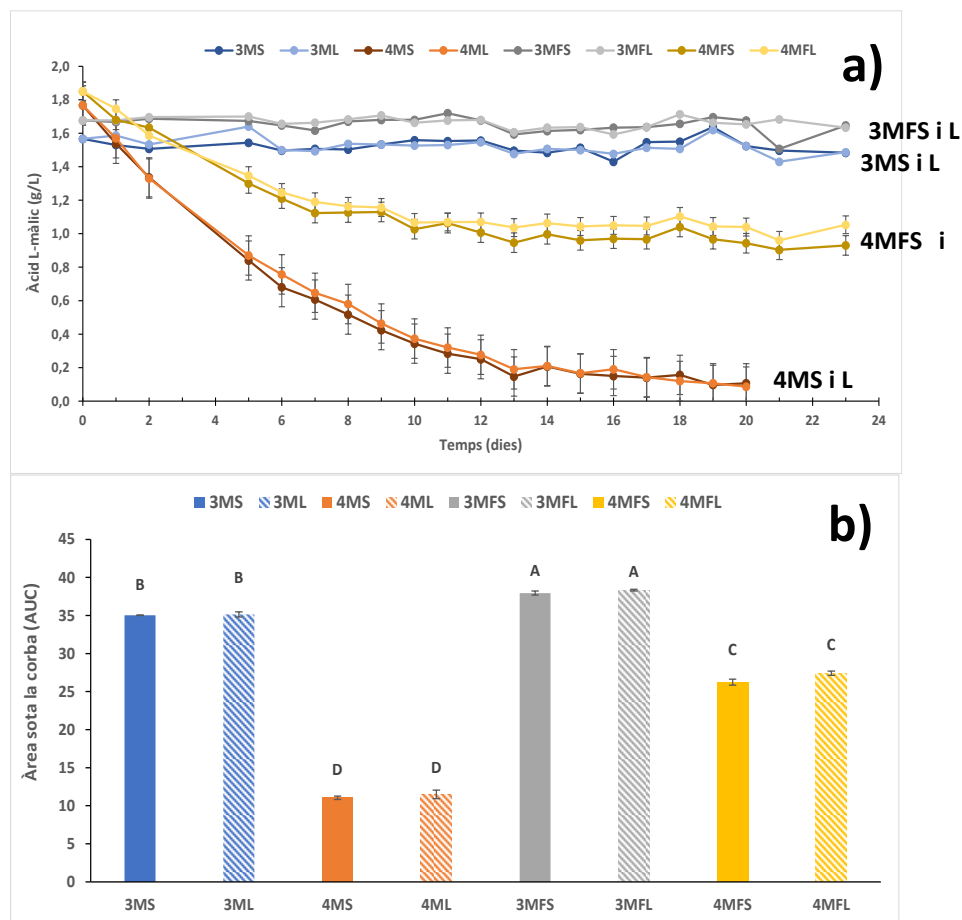


Figura 4.2.1.1 a) Evolució de la cinètica de la fermentació malolàctica amb i sense lles de llevat dels vins 3MS – vi de pH 3 amb àcid màlic sense lles de llevat, 3ML – vi de pH 3 amb àcid màlic amb lles de llevat, 4MS – vi de pH 4 amb àcid màlic sense lles de llevat, 4ML – vi de pH 4 amb àcid màlic amb lles de llevat, 3MFS – vi de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric sense lles de llevat, 3MFL – vi de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric amb lles de llevat, 4MFS – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric sense lles de llevat i 4MFL – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric amb lles de llevat amb *O. Oeni* VP41 representada mitjançant la concentració d'àcid L-màlic (g/L) al llarg del temps (dies). b) Representació de les àrees sota la corba (AUCs) durant la cinètica de la fermentació malolàctica amb i sense lles de llevat dels vins 3MS – vi de pH 3 amb àcid màlic sense lles de llevat, 3ML – vi de pH 3 amb àcid màlic amb lles de llevat, 4MS – vi de pH 4 amb àcid màlic sense lles de llevat, 4ML – vi de pH 4 amb àcid màlic amb lles de llevat, 3MFS – vi de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric sense lles de llevat, 3MFL – vi de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric amb lles de llevat, 4MFS – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric sense lles de llevat i 4MFL – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric amb lles de llevat. Les lletres de sobre les barres indiquen la diferència significativa entre les condicions utilitzant la prova de Tukey (HSD) a $p < 0,05$. Font: pròpia

Quan s'observen les gràfiques de la cinètica de l'àcid L-màlic i de les AUCs de les quatre condicions a pH 3 es pot observar que tant les dues condicions sense àcid fumàric (3MS, 3ML) com les dues condicions amb fumàric (3MFS, 3MFL) la FML no s'ha dut a terme; els valors de l'AUC son en les 4 condicions molt elevats, i en el gràfic de la cinètica es pot observar també que els valors tant inicials com finals de les 4 condicions son valors molt propers. Per tant, es confirma el negatiu efecte de pHs inferiors a 3,5 en la taxa de degradació de l'àcid L-màlic (Gockowiak & Henschke, 2003). Amb aquestes observacions es pot deduir que no s'ha dut a terme el procés, que el pH hi té un gran efecte però que si en la condició s'hi troba la presència d'àcid fumàric la diferència és encara més significativa. Aquest fet es pot veure d'una forma molt clara també amb la comparació de les 4 condicions en el gràfic de les AUCs, ja que les àrees són més altes en les condicions amb presència de fumàric que en les dues condicions sense fumàric.

En el cas de les condicions a pH 4, tant les dues condicions sense àcid fumàric (4MS, 4ML) com les dues condicions amb fumàric (4MFS, 4MFL) es pot evidenciar que l'AUC en totes les condicions és més petita que en les condicions a pH 3 comentades anteriorment, per tant s'ha realitzat el procés de la FML o s'ha iniciat. En el cas de les condicions sense presència d'àcid fumàric (4MS, 4ML), en el gràfic de la cinètica de l'àcid L-màlic es pot observar que la fermentació va finalitzar el dia 20 amb una concentració aprox. de $0,10 \pm 0,05$ g/L d'àcid L-màlic i que les AUCs son força baixes en comparació amb la resta de condicions; tant mateix, en el cas de les condicions amb àcid fumàric (4MFS, 4MFL) s'aprecia que la concentració de l'àcid L-màlic va disminuir fins el dia 13 amb una concentració aprox. de $0,99 \pm 0,06$ g/L d'àcid L-màlic la qual es va mantenir de forma constant fins l'últim dia de fermentació. Aquestes dades equivalen a una parada de la fermentació degut a l'efecte inhibidor estable en el temps de l'àcid fumàric Morata et al., 2020.

En el cas de les AUCs de les condicions 4MFS i 4MFL, s'observa que son més baixes en comparació amb les mateixes condicions a pH 3, el que significa que hi ha hagut un mínim consum de l'àcid L-màlic. Amb aquestes observacions es pot deduir que ha començat la FML en totes les condicions i que el pH no hi té cap efecte, en canvi, en les dues condicions amb presència d'àcid fumàric la fermentació ha tingut una parada a meitat del temps, per tant, l'àcid fumàric a pH 4 demostra tenir un efecte inhibidor força significatiu.

Tenint en compte un factor complementari, que és el fet d'addicionar o no addicionar lies, es pot observar que no té cap efecte significatiu en cap de les vuit condicions. Segons Balmaseda et al., 2021, l'addició de lies de llevats durant la FML, que proporciona manoproteïnes als bacteris làctics, no suposa un comportament fermentatiu més eficient.

4.2.2. Velocitat de consum d'àcid L-màlic

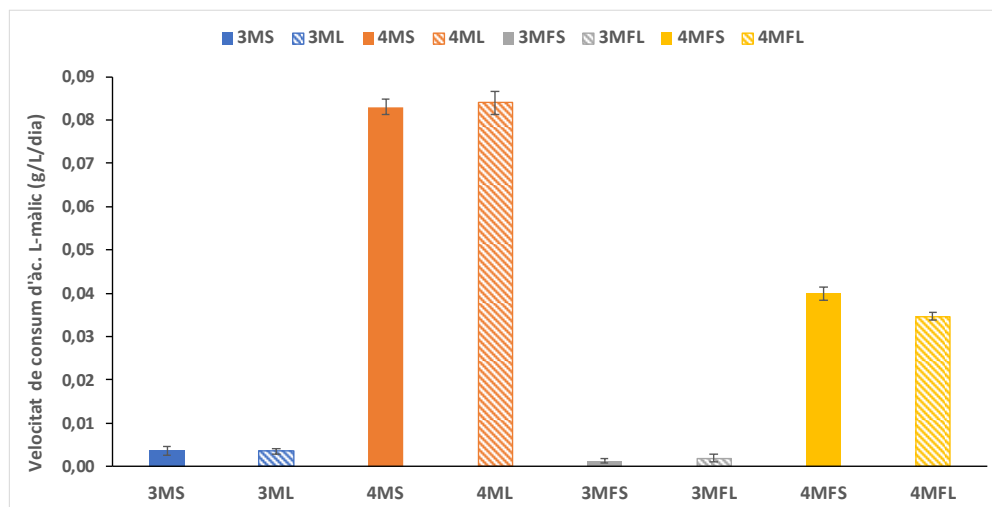


Figura 4.2.2.1- Representació de la velocitat de consum d'àcid L-màlic al llarg de la fermentació malolàctica amb i sense lles de llevat per part dels bacteris làctics per a les condicions 3MS – vi de pH 3 amb àcid màlic sense lles, 3ML – vi de pH 3 amb àcid màlic amb lles, 4MS – vi de pH 4 amb àcid màlic sense lles, 4ML – vi de pH 4 amb àcid màlic amb lles, 3MFS – vi de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric sense lles, 3MFL – vi de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric amb lles, 4MFS – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric sense lles i 4MFL – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric amb lles. Font: pròpia.

En aquest gràfic es pot observar de forma directa les condicions que han experimentat activitat fermentativa. S'observa clarament que les condicions 4MS i 4ML són les úniques que han consumit l'àcid L-màlic amb més velocitat, 0,084 g/L/dia, i que han completat la FML. Les condicions 4MFS i 4MFL, amb presència de fumàric, van experimentar una velocitat de consum menor la primera meitat de la fermentació, ja que a la segona meitat la fermentació malolàctica es va aturar per l'efecte del fumàric. Les quatre condicions a pH 3 (3MS, 3ML, 3MFS i 3MFL) mostren que no s'han consumit gairebé àcid L-màlic durant els 23 dies degut a l'efecte del pH a la soca VP41.

4.2.3. Població viable de bacteris làctics

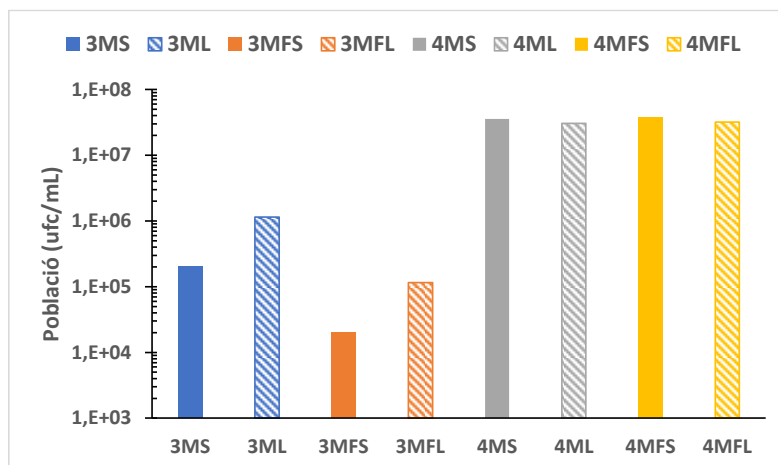


Figura 4.2.3.1- Representació de la població de bacteris làctics cultivables (ufc/mL) el dia 0 de fermentació malolàctica amb i sense lies de llevat dels vins 3MS – vi de pH 3 amb àcid màlic sense lies, 3ML – vi de pH 3 amb àcid màlic amb lies, 4MS – vi de pH 4 amb àcid màlic sense lies, 4ML – vi de pH 4 amb àcid màlic amb lies, 3MFS – vi de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric sense lies, 3MFL – vi de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric amb lies, 4MFS – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric sense lies i 4MFL – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric amb lies. Font: pròpia.

En la representació de la població inicial, la qual es va obtenir de plaques MRS sembrades 30 min després d'inocular les fermentacions, es pot observar una notable diferència entre la població de bacteris làctics de les condicions a pH 3 i a pH 4. La població inicial a pH 3 és d'aprox. $3,7 \times 10^5$ ufc/mL, cal destacar que disminueix considerablement en presència d'àcid fumàric i que la presència de lies potencia el creixement dels bacteris làctics. La població inicial a pH 4 és d'aprox. $3,4 \times 10^7$ ufc/mL, en la qual no s'observen diferències significatives entre les quatre condicions.

Comparat d'una forma ampla totes les condicions s'observa un significatiu efecte del pH, ja que les poblacions a pH 3 són més baixes que en el cas de les de pH 4. També s'observa l'elevat efecte inhibitori de l'àcid fumàric amb les bacteries làctiques, ja que al cap de 5 dies de fermentació les poblacions a pH 3 (3MFS i 3MFL) i a pH 4 (4MFS i 4MFL) són de 0 ± 0 i 2×10^4 ufc/mL respectivament.

Les condicions a pH 3 sense addició d'àcid fumàric (3MS i 3ML) i amb presència d'àcid fumàric (3MFS i 3MFL) tenen un comportament força igual, ja que la població disminueix des del principi de la fermentació. Aquest fet es pot associar al significatiu efecte del pH, ja que els bacteris làctics a pHs baixos, vora 2,8-3, es veuen generalment afectats en la viabilitat bacteriana i en l'activitat fermentativa, (Knoll et al., 2011).

En el cas de les condicions a pH 4 sense addició d'àcid fumàric (4MS i 4ML) s'observa que el pH té un efecte favorable i que facilita el procés de la FML, ja que a partir de pHs vora 3,5 el seu desenvolupament, la viabilitat i l'activitat fermentativa es veu influenciats favorablement, (Ribéreau-Gayon et al., 2006). En canvi, en les condicions amb presència d'àcid fumàric (4MFS i 4MFL) la població disminueix progressivament fins no detectar cèl·lules cultivables en el medi, ja que l'àcid fumàric és capaç d'inhibir la

població de bacteris làctics quan aquesta es troba en valors força elevats (Morata et al., 2020). Per tant s'evidencia la persistència de l'efecte inhibidor de l'àcid fumàric, el qual supera l'efecte favorable del pH.

En les vuit condicions i després de pocs dies de l'inici de la fermentació s'observa que tant la presència com l'absència de lies durant la FML no té cap efecte significatiu ni demostra una pèrdua de la viabilitat de la població, tal com diu Balmaseda et al., 2021.

4.2.4. Paràmetres químics del vi

La composició metabòlica dels vins un cop finalitzada la fermentació malolàctica amb lies de llevat va canviar entre les diferents condicions. Es pot consultar a l'Annex 1- Taula A5 les dades dels diversos paràmetres: pH, en g/L: àcid acètic, àcid D-làctic, àcid L-làctic, àcid cítric, àcid fumàric i àcid L-màlic.

Pel que fa als canvis en el pH dels vins 4MS, 4ML, 4MFS i 4MFL, s'observa una disminució de l'acidesa força significativa respecte la resta de condicions. Les dues condicions en les que el pH ha augmentat de forma considerable són en les que s'ha dut a terme de forma completa o parcial la fermentació malolàctica, per tant, aquest fet s'associa principalment a la descarboxilació de l'àcid L-màlic a àcid L-làctic per part d'*O. oeni* VP41.

En les dades de l'àcid L-màlic s'observa en les condicions 3MS i 3ML una petita disminució de la concentració; en les condicions 3MFS i 3MFL un petit augment de la concentració, el qual podria estar relacionat amb la disminució de l'àcid fumàric; en les condicions 4MS i 4ML s'observa gairebé la total degradació de l'àcid L-màlic i en les condicions 4MFS i 4MFL es pot veure que ha disminuït la concentració de l'àc. L-màlic a gairebé la meitat de la concentració inicial, així doncs, les dades de les concentracions de L-màlic de 4MS i 4ML són diferents significativament de les concentracions de L-màlic de 4MFS i 4MFL. En les condicions que s'ha metabolitzat la majoria de l'àc. L-màlic s'associa al fet que s'ha completat la fermentació malolàctica, en els casos que el consum de L-màlic és parcial es deu a la parada de la fermentació per l'efecte de l'àcid fumàric. Per últim, la resta de condicions en les que la diferència de la concentració és mínima es degut a que la fermentació de l'àcid L-màlic no s'ha dut a terme.

Tenint en compte els fets de les condicions anteriors, per a la composició de l'àcid L-làctic s'observa una diferència significativa entre les condicions a pH 3 i les condicions a pH 4. A la Taula A5 es pot veure que en les condicions on hi ha hagut un consum d'àcid L-màlic la concentració d'àcid L-làctic ha augmentat. En concret, en el cas de les condicions on s'ha completat la FML (4MS i 4ML) la metabolització de l'àcid L-làctic és major que en els casos on la FML s'ha parat (4MFS i 4MFL). En canvi, en les condicions on la fermentació malolàctica no s'ha dut a terme, la concentració d'àcid L-làctic és exactament la mateixa que la dels vins de l'inici de FML.

En les vuit condicions de la Taula A5 s'observa que un cop acabada la fermentació malolàctica augmenta de forma considerable la concentració d'àcid acètic, aquest fet presenta diferències significatives entre les condicions a pH 3 respecte les de pH 4. L'augment de la concentració d'acètic es deu a la producció d'aquest àcid per part d'*O. oeni* VP41 mitjançant el metabolisme dels sucres, ja que són bacteris heterolàctics, els quals poden metabolitzar els sucres residuals del medi per formar àcid acètic (Ribéreau-

Gayon et al., 2006b). El fet de que l'augment en la concentració sigui inferior en les condicions a pH 3 es deu a la baixa/nul·la activitat dels bacteris làctics durant la FML.

En les diferents condicions de la Taula A5 es pot apreciar que les concentracions d'àcid D-làctic presenten diferències significatives entre els dos valors de pH. En el cas de les condicions a pH 3 s'observa que no hi ha hagut augment de la concentració de D-làctic, en canvi, en les quatre condicions a pH 4 s'observa un modest augment d'aprox. 33 ± 10 mg/L de la concentració. Aquest augment es deu al metabolisme dels sucres residuals per part dels bacteris làctics, el que també es coneix com a picat làctic.

En les vuit condicions per a l'àcid cítric es pot comprovar a la Taula A5 que no existeixen diferències significatives entre els diferents valors de concentració.

Entre les condicions amb presència i absència d'àcid fumàric a pH 3 i 4 s'hi observa una evident diferència significativa. En les condicions 3MFS i 3MFL la desaparició d'àcid fumàric és del 23% i en les condicions 4MFS i 4MFL el percentatge de desaparició és del 33%. Aquests dades recolzen la hipòtesi de que en les condicions 4MFS i 4MFL, les quals tenen un pH $4,12 \pm 0,01$ i sent el pK_{a2} de l'àcid fumàric 4,44, valors força propers, el percentatge de desaparició sigui superior degut a que la meitat de l'àcid fumàric extracel·lular es troba en forma no dissociada, fet que facilita l'entrada de l'àcid a l'interior de la cèl·lula. Cal afegir que a pH 4 els bacteris làctics es troben en un entorn força favorable per al seu metabolisme tot i haver presència d'àcid fumàric. En canvi, les condicions 3MFS i 3MFL, tot i tenir valors de pH de $3,3 \pm 0,06$ i sent el pK_{a1} de l'àcid fumàric 3,03, el percentatge de desaparició és menor perquè la població de la soca VP41 no es troba en un entorn propici per al seu creixement, el que provoca una reducció de l'activitat metabòlica i així una menor desaparició de l'àcid fumàric.

4.3. FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA AMB XOCS D'ÀCID FUMÀRIC

4.3.1. Xoc d'àcid fumàric amb vi en absència d'àcid fumàric

A continuació es comenten tres fermentacions, les quals es duen a terme a pH 4: una es manté com a condició control sense àcid fumàric, mentre que en les altres dues s'afegiran xocs d'àcid fumàric (0,6g/L) en dies diferents.

4.3.1.1 Cinètica de la fermentació malolàctica amb xocs d'àcid fumàric i població viable de bacteris làctics

Observant els gràfics A6 de l'Annex 1 a i b) es pot veure que en el cas de la condició sense àcid fumàric (4MC), es va iniciar la FML, amb una població de bacteris làctics actius. No obstant, a mesura que va anar progressant l'experiment es va produir una disminució gradual de la població d'*O. oeni* VP41 fins al punt de provocar una parada de la FML. En les condicions 4MFA i 4MFB, on es va aplicar el xoc d'àcid fumàric el dia 5 i el dia 12 respectivament, s'observa que a partir del dia del xoc la població d'*O. oeni* VP41 disminueix progressivament fins no detectar cèl·lules cultivables en el medi. Cal afegir que la cinètica de l'àcid L-màlic es deté ja que no es produeix una reducció significativa de la concentració d'àcid L-màlic. En les dues condicions quan s'aplica el xoc d'àcid fumàric es pot veure que tant l'activitat dels bacteris làctics com la disminució de la concentració d'àcid L-màlic són pràcticament nul·les (Morata et al., 2023).

En les representacions de la cinètica de l'àcid L-màlic, es pot verificar que la concentració d'àcid fumàric al final de la fermentació és més baixa que la concentració aplicada en els xocs. Aquesta disminució indica que els bacteris làctics metabolitzen l'àcid fumàric durant el procés. A més, s'observa que quan el xoc d'àcid fumàric s'aplica durant els primers dies de la fermentació, la disminució de l'àcid fumàric al llarg del procés és menor en comparació amb quan el xoc s'aplica en els últims dies de la fermentació. Aquestes observacions determinen que una vegada *O. oeni* es desenvolupa en un medi durant dies, per molt que les poblacions gradualment disminueixin i que el seu metabolisme sigui reduït per les condicions adverses, és més difícil inhibir el seu desenvolupament en aquest cas que quan els bacteris làctics porten pocs dies en el medi.

4.3.1.2 Velocitat de consum d'àcid L-màlic

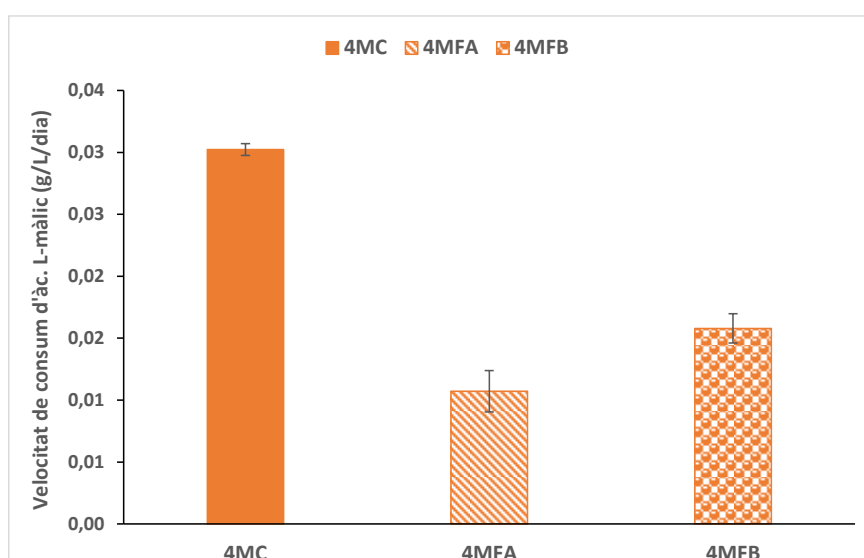


Figura 4.3.1.2.1 - Representació de la velocitat de consum d'àcid L-màlic al llarg de la fermentació malolàctica amb xocs d'àcid fumàric per part dels bacteris làctics per a les condicions dels vins 4MC – vi control de pH 4 amb àcid màlic, 4MFA – vi de pH 4 amb àcid màlic en el que s'ha aplicat un xoc d'àcid fumàric el dia 5 de FML i 4MFB – vi de pH 4 amb àcid màlic en el que s'ha aplicat un xoc d'àcid fumàric el dia 12 de FML. Font: pròpia.

En el gràfic que representa la velocitat de consum d'àcid L-màlic durant la FML, gràfic 4.3.1.2.1, es poden observar diferències significatives entre les tres condicions analitzades. En primer lloc cal destacar la condició control (4MC), en la que no hi ha presència d'àcid fumàric. La condició 4MC presenta la velocitat de consum més elevada, el que indica que es va produir un major consum d'àcid L-màlic i que el procés es va allargar durant més temps en comparació amb a resta. D'altra banda, en les condicions en què es va aplicar el xoc d'àcid fumàric, es pot observar que la velocitat de consum d'àcid L-màlic és inferior. Això implica que l'addició d'àcid fumàric ha afectat negativament la velocitat de consum d'àcid L-màlic durant la FML. Cal destacar que en la condició 4MFB, en la qual es va afegir el xoc d'àcid fumàric més tard, concretament als 12 dies, la velocitat de consum d'àcid L-màlic és més elevada en comparació amb la condició 4MFA, en la qual el xoc es va afegir només als 5 dies. Així doncs es pot concloure que l'àcid

fumàric té un efecte inhibidor sobre la velocitat de consum d'àcid L-màlic durant la FML i que aquest efecte pot variar en funció del moment en què s'aplica el xoc d'àcid fumàric.

4.3.1.3 Paràmetres químics del vi

La composició metabòlica dels vins un cop finalitzada la FML amb xocs d'àcid fumàric va canviar entre les diferents condicions. Es pot consultar a la Taula A8 i A9 de l'Annex 1 les dades dels diversos paràmetres: pH, en g/L: àcid L-màlic, àcid L-làctic, àcid D-làctic, àcid acètic i àcid cítric a l'inici i al final de la FML.

Pel que fa als canvis en el pH dels vins s'observen diferències significatives entre les tres condicions. En el cas de la condició 4MC s'observa una disminució de l'acidesa degut a la descarboxil·lació de l'àcid L-màlic a àcid L-làctic per part d'*O. oeni* VP41. En el cas de les condicions amb xocs, 4MFA i 4MFB, s'observa que augmenta l'acidesa del medi, fet que es relaciona amb els xocs d'àcid fumàric i al metabolisme dels àcid orgànics per part d'*O. oeni* (Morata et al., 2020).

En les dades de l'àcid L-màlic s'observen també diferències significatives entre les tres condicions. En el cas de 4MC s'observa una degradació de més de la meitat de l'àcid L-màlic, en canvi, en les condicions en les que s'aplica el xoc de fumàric s'observa que si el xoc s'aplica 5 dies després de començar la FML la descarboxilació de l'àcid L-màlic és menor que si el xoc s'aplica 12 dies després de l'inici de la FML.

Respecte els dades de la Taula A9, es pot veure que la composició de l'àcid L-làctic presenta diferències significatives entre les tres condicions; en el cas de 4MC s'observa una elevada formació d'àcid L-làctic, en canvi, en les condicions en les que s'aplica el xoc de fumàric s'observa que la concentració és menor. Tant mateix, en 4MFA la concentració té un menor increment que en el cas de 4MFB, això es deu a que com més aviat s'aplica el xoc de fumàric, més aviat es perjudica la població de bacteris làctics i és més fàcil dur a terme la parada de FML.

En les diferents condicions es pot apreciar que hi ha diferència significativa entre la concentració d'àcid D-làctic en la condició control i les altres dues en les que s'aplica el xoc. Aquest reduït augment de la concentració es deu al metabolisme dels sucres residuals per part de la soca VP41 (picat làctic).

Les concentracions d'àcid acètic en els vins al final de la FML són significativament diferents entre la condició control i les dues restants. Es pot observar una major formació d'acètic en la condició control, seguit de la condició 4MFB i per últim, la condició on menys va augmentar la concentració va ser 4MFA. En el cas de l'àcid cítric s'observa també que entre la condició control i les altres dues existeixen diferències significatives; en el cas de la condició control la concentració de cítric disminueix 60 mg i en el cas de les condicions del xoc disminueix 50 mg. Aquestes diferències entre les concentracions d'àcid acètic i d'àcid cítric poden ser el resultat del metabolisme de l'àcid cítric per part de la soca VP41, que allibera àcid acètic, i també per la capacitat heterofermentativa d'*O. oeni* de metabolitzar els sucres residuals en àcid acètic (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

4.3.2. Xoc d'àcid fumàric amb vi en presència d'àcid fumàric

Seguidament es comenten tres fermentacions realitzades a pH 4: una condició és el control amb presència d'àcid fumàric (0,36g/L), a les altres dos se'ls afegiran xocs d'àcid fumàric (0,6g/L) en dies diferents.

4.3.2.1 Cinètica de la fermentació malolàctica amb xocs d'àcid fumàric i població viable de bacteris làctics

Tal com es pot veure en els gràfics A7 a i b) de l'Annex 1, s'observa que la condició control (4MFC) ha sigut la que ha experimentat el consum més elevat d'àcid L-màlic, no obstant, malgrat el consum al cap de 19 dies la FML s'ha aturat a causa de la presència de 0,36 g/L d'àcid fumàric en el medi. L'àcid ha inhibit l'activitat d'*O. oeni* VP41, tal com es pot veure en el gràfic de la població, que des del dia 2 disminueix progressivament. En la condició 4MFFA on s'ha afegit el xoc d'àcid fumàric el dia 3 s'observa que el consum d'àcid L-màlic és mínim i que a partir del dia del xoc disminueix de forma pronunciada la població, ja que la concentració d'àcid fumàric es superior a la inicial. En la condició 4MFFB, s'observa un consum més elevat de L-màlic, tot i això, la població de bacteris làctics baixa dràsticament fins el dia 9 que s'aplica el xoc d'àcid fumàric, en el que la població ja és molt baixa. A partir del dia 9 s'observa que la població és nul·la. Aquests fets indiquen en els dos casos que l'augment de la concentració d'àcid fumàric ha aturat totalment la FML i ha restringit l'activitat dels bacteris làctics, fins i tot, tenint poblacions inicials elevades d'*O. oeni* (Morata et al., 2020).

En el gràfic de la cinètica de la fermentació, es pot observar que en la condició de control, el consum d'àcid fumàric és el mateix que en la condició amb el xoc A. No obstant això, en la condició amb el xoc B, el consum d'àcid fumàric és aproximadament el doble. Aquests resultats indiquen que una concentració mínima d'àcid fumàric, en aquest cas 0,36 g/L, és suficient per inhibir la FML, tot i que hi ha un mínim consum d'àcid L-màlic en les etapes inicials. No obstant, és evident que quan s'afegeix l'àcid fumàric més aviat i en una concentració més alta, la FML s'atura abans, hi ha un menor consum d'àcid L-màlic i s'inhibeix l'activitat d'*O. oeni* VP41.

4.3.2.2 Velocitat de consum d'àcid L-màlic

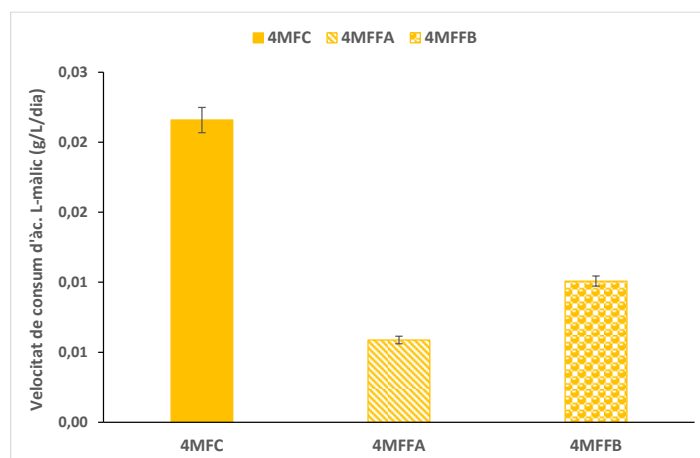


Figura 4.3.2.2.1 - Representació de la velocitat de consum d'àcid L-màlic al llarg de la fermentació malolàctica amb xocs d'àcid fumàric per part dels bacteris làctics per a les condicions dels 4MFC – vi control de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric, 4MFFA – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric en el que s'ha aplicat un xoc d'àcid fumàric el dia 5 de FML, 4MFFB – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric en el que s'ha aplicat un xoc d'àcid fumàric el dia 12 de FML. Font: pròpia.

Mitjançant l'anàlisi de la representació gràfica de la velocitat de consum de l'àcid L-màlic al llarg de la FML, gràfic 4.3.2.2.1, es poden observar diferències significatives entre les condicions estudiades. Primerament, s'observa que la condició control 4MFC, la qual conté una concentració d'àcid fumàric de 0,36 g/L, presenta la velocitat de consum d'àcid L-màlic més elevada. Això indica que en aquesta condició s'ha produït un major consum d'àcid L-màlic durant la FML i que el procés s'ha allargat més en el temps en comparació amb la resta de condicions. En canvi, en les condicions on s'ha aplicat el xoc d'àcid fumàric (4MFFA i 4MFFB) i la seva concentració ha superat el valor de 0,36 g/L inicials, s'observa una disminució de la velocitat de consum d'àcid L-màlic. Això implica que l'addició d'àcid fumàric ha tingut un efecte inhibidor sobre la velocitat de consum d'àcid L-màlic durant la FML. És destacable que en la condició 4MFFB, en la qual s'ha afegit el xoc d'àcid fumàric als 9 dies, la velocitat de consum d'àcid L-màlic és gairebé el doble de la condició 4MFFA, on el xoc s'ha afegit als 3 dies. Aquestes observacions, com bé s'ha comentat en l'apartat 4.3.1.2 anterior, mostren la influència de la concentració d'àcid fumàric i el moment de la seva addició en la velocitat de consum d'àcid L-màlic durant la FML.

4.3.2.3 Paràmetres químics del vi

La composició metabòlica dels vins un cop finalitzada la FML amb xocs d'àcid fumàric va canviar entre les diferents condicions. Es pot consultar a la Taula A8 i A10 de l'Annex 1 les dades dels diversos paràmetres: pH, en g/L: àcid L-màlic, àcid L-làctic, àcid D-làctic, àcid acètic i àcid cítric a l'inici i al final de la FML.

Pel que fa als canvis en el pH dels vins s'aprecien diferències significatives entre les tres condicions. En la condició 4MFC, es pot observar un augment del pH del vi, fet que es pot atribuir a la descarboxilació

de l'àcid L-màlic a àcid L-làctic per part de la soca *O. oeni* VP41. D'altra banda, en les condicions amb xocs d'àcid fumàric, 4MFFA i 4MFFB, es pot observar un augment de l'acidesa del medi, el qual pot estar relacionat amb el metabolisme dels àcids orgànics per part dels bacteris làctics i degut a l'adició d'àcid fumàric, un agent segur per a l'acidificació segons Morata et al., 2020.

En les dades de l'àcid L-màlic també es poden apreciar diferències significatives entre les tres condicions. En el cas de la condició 4MFC, s'observa una degradació de la meitat de l'àcid L-màlic. No obstant, en les condicions en les quals s'aplica el xoc d'àcid fumàric, s'observa que el que s'aplica als 3 dies després de l'inici de la FML la descarboxilació de l'àcid L-màlic és menor en comparació amb el que s'aplica als 9 dies després de l'inici de la FML.

Referent a les dades de la Taula A10, s'observa que hi ha diferències significatives entre les tres condicions i a més que hi ha variacions rellevants en la composició de l'àcid L-làctic; en el cas de 4MFC es pot apreciar una alta producció d'àcid L-làctic, mentre que en les condicions amb aplicació de xocs de fumàric s'observa una concentració més baixa. A més, en el cas 4MFFA, l'increment de la concentració és inferior al cas 4MFFB, això es deu al fet que l'aplicació precoç del xoc de fumàric perjudica abans la població de bacteris làctics i facilita la inhibició de la FML.

En les diferents condicions es pot veure que existeix una diferència significativa entre la condició control i les dues restants respecte la concentració d'àcid D-làctic. L'augment de 10 mg d'àcid D-làctic en les tres condicions s'atribueix al picat làctic, també conegut com el metabolisme dels sucres residuals per part d'*O. oeni*.

Les concentracions d'àcid acètic en els vins al final de FML mostren diferències significatives entre la condició de control i les altres dues condicions. Es pot observar una major concentració d'àcid acètic en les tres condicions. Pel que fa a l'àcid cítric, també s'observa que hi ha diferències significatives entre la condició de control i les altres dues condicions. En la condició de control, la concentració de cítric disminueix en 40 mg, mentre que en les condicions amb xoc, la disminució és de 30 mg. Aquestes diferències en les concentracions d'àcid acètic i àcid cítric, tal com s'ha comentat en l'apartat 2.3.1.3 anterior, poden ser degut a la capacitat heterolàctica d'VP41 per metabolitzar els sucres residuals en àcid acètic i pel resultat del metabolisme de l'àcid cítric, que produeix àcid acètic (Bauer & Dicks, 2004).

5. CONCLUSIONS

- Durant la fermentació alcohòlica s'ha pogut comprovar que el pH no influència en el desenvolupament del procés fermentatiu ni en el metabolisme dels llevats. No obstant, la presència d'àcid fumàric sí que atraça el procés de la fermentació alcohòlica.
- Respecte els paràmetres analitzats després de la fermentació alcohòlica s'observa que tant l'àcid fumàric com l'àcid L-màlic disminueixen al llarg del procés amb una destacada reducció a pH 3, en canvi, la concentració d'àcid succínic augmenta en les condicions amb presència d'àcid fumàric. El fet de que disminueixi la concentració d'àcid fumàric i d'àcid L-màlic es relacionada amb la formació d'àcid succínic i potser d'àcid oxalacètic, ja que la concentració d'àcid L-màlic disminueix durant la fermentació i per tant no es duu a terme la seva formació.

- Durant la fermentació malolàctica s'ha confirmat que l'impacte de l'àcid fumàric depèn del pH. En les condicions a pH 3, s'observa que l'àcid fumàric té un efecte inhibidor major en la velocitat de consum, en la població de bacteris làctics i en la cinètica de l'àcid L-màlic, en comparació amb les condicions a pH 4.
- En els vins de pH 4 en absència d'àcid fumàric, la fermentació malolàctica es va completar. No obstant això, en els vins amb un pH de 4 en presència d'àcid fumàric, s'observa que l'efecte d'aquest àcid és menys pronunciat que a un pH de 3, però finalment acaba inhibint la FML.
- La presència de les lies de llevat té un efecte beneficiós només en la població inicial d'*O. oeni*, ja que durant la FML i al final no es troba cap diferència significativa entre les condicions amb presència de lies de llevat i en absència d'elles.
- S'ha observat que l'àcid fumàric pot ser eficaç en vins amb altes poblacions inicials de bacteris làctics ($3,7 \times 10^7$ ufc/mL).
- L'àcid fumàric té un efecte inhibidor sobre la velocitat de consum de l'àcid L-màlic durant la fermentació malolàctica. La seva eficàcia en aturar la FML pot variar segons el moment en què s'afegeix al vi. Afegir-lo de manera precoç és més efectiu per aturar la fermentació, tot i que també es duu a terme la inhibició quan s'afegeix més tard encara que ja s'hagin consumit alguns metabòlits i la població de bacteris làctics sigui alta.

6. PERSPECTIVES

- Estudi de l'efecte de diferents dosis d'àcid fumàric en les condicions i el perfil organolèptic del vi.
- Estudi del destí de l'àcid fumàric durant el procés de la FA i la FML del vi.
- Anàlisi de l'àcid fumàric en les parets dels llevats i els bacteris làctics.
- Efecte de l'àcid fumàric en els lípids de les membranes dels llevats.

7. AGRAÏMENTS

Voldria donar les gràcies al Nicolas per confiar en mi, donar-me aquesta oportunitat i animar-me. A la Violeta per l'ajuda, la paciència, el suport i tot el que m'ha ensenyat durant aquests mesos. A la Candela pels seus consells i a la Sara pel temps compartit. Gràcies també a la resta de companys dels altres laboratoris, en especial al Jordi. I per últim, gràcies als meus pares, família i amics per creure en mi sempre.

A tots, gràcies.

8. REFERÈNCIES

- Balmaseda, A., Rozès, N., Bordons, A., & Reguant, C. (2021). Simulated lees of different yeast species modify the performance of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* in wine-like medium. *Food Microbiology*, *99*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103839>
- Bauer, R., & Dicks, L. M. T. (2004). Control of Malolactic Fermentation in Wine. A Review. *South African Journal for Enology and Viticulture* .
- Camarasa, C., Grivet, J. P., & Dequin, S. (2003). Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways of succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology*, *149*(9), 2669–2678. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26007-0>
- Fernández-Vázquez, D., Rozès, N., Canals, J. M., Bordons, A., Reguant, C., & Zamora, F. (2021). New enzymatic method for estimating fumaric acid in wines. *Oeno One*, *55*(3), 273–281. <https://doi.org/10.20870/OENO-ONE.2021.55.3.4825>
- Gancel, A. L., Payan, C., Koltunova, T., Jourdes, M., Christmann, M., & Teissedre, P. L. (2022). Solubility, acidifying power and sensory properties of fumaric acid in water, hydro-alcoholic solutions, musts and wines compared to tartaric, malic, lactic and citric acids. *Oeno One*, *56*(3), 137–154. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2022.56.3.5455>
- Gockowiak, H., & Henschke, P. A. (2003). Interaction of pH, ethanol concentration and wine matrix on induction of malolactic fermentation with commercial “direct inoculation” starter cultures. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *9*(3), 200–209. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2003.tb00271.x>
- Hauber, J., & Singer, T. P. (1967). Studies on Succinate Dehydrogenase: 14. Intracellular Distribution, Catalytic Properties and Regulation of Fumarate Reductases in Yeast. *European Journal of Biochemistry*, *3*(1), 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1967.tb19503.x>
- International Organization of Vine and Wine. (2021a). Resolutions Adopted in 2021 by the 19th General Assembly of the OIV- Paris (France). In OIV (Ed.), *Summary of Resolutions Adopted in 2021 by the 19th General Assembly of the OIV- Paris (France)*. www.oiv.int
- International Organization of Vine and Wine. (2021b). Resolutions Adopted in 2021 -OENO581A. *Resolutions Adopted in 2021 by the 19th General Assembly of the OIV- Paris (France)*.
- Jamalzadeh, E., Verheijen, P. J. T., Heijnen, J. J., & Van Gulik, W. M. (2012). pH-dependent uptake of fumaric acid in *saccharomyces cerevisiae* under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(3), 705–716. <https://doi.org/10.1128/AEM.05591-11>
- Kenneth C. Fugelsang, & Charles G. Edwards. (2007). *WINE MICROBIOLOGY* (2nd ed.). Springer.
- Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Rauhut, D., & Du Toit, M. (2011). Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *LWT*, *44*(10), 2077–2086. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.009>

- Morata, A., Adell, E., López, C., Palomero, F., Suárez, E., Pedrero, S., Bañuelos, M. A., & González, C. (2023). Use of Fumaric Acid to Inhibit Malolactic Fermentation in Bottled Rioja Wines: Effect in pH and Volatile Acidity Control. *Beverages*, 9(1), 16. <https://doi.org/10.3390/beverages9010016>
- Morata, A., Bañuelos, M. A., López, C., Song, C., Vejarano, R., Loira, I., Palomero, F., & Suarez Lepe, J. A. (2020). Use of fumaric acid to control pH and inhibit malolactic fermentation in wines. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 37(2), 228–238. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1684574>
- Pines, O., Even-Ram, S., Elnathan, N., Battat Aharonov, E. O., Gibson, D., Goldberg, I., Elnathan Battat, N. E., & Aharonov -D Gibson, O. (1996). The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of fumarase. In *Appl Microbiol Biotechnol* (Vol. 46).
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006a). Handbook of Enology - Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications. In *Handbook of Enology* (Vol. 1). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470010363.fmatter>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006b). *Handbook of Enology - Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments* (2nd ed., Vol. 2).
- 'Rossi, C. 'Hauber, J. 'Singer, T. P. (1964). Mitochondrial and Cytoplasmic Enzymes for the Reduction of Fumarate to Succinate in Yeast. *Nature* 204.
- Ruiz-de-Villa, C., Poblet, M., Cordero-Otero, R., Bordons, A., Reguant, C., & Rozès, N. (2023). Screening of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii* strains in relation to their effect on malolactic fermentation. *Food Microbiology*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104212>
- Shah, M. V., van Mastrigt, O., Heijnen, J. J., & van Gulik, W. M. (2016). Transport and metabolism of fumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae* in aerobic glucose-limited chemostat culture. *Yeast*, 33(4), 145–161. <https://doi.org/10.1002/yea.3148>
- Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Cerezo, A. B., Garcia-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2020). Chemical hazards in grapes and wine, climate change and challenges to face. *Food Chemistry*, 314. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126222>
- Wales, D. S., & Lloyd2, I. D. (1979). Effects of Glucose Repression and Anaerobiosis on the Activities and Subcellular Distribution of Tricarboxylic Acid Cycle and Associated Enzymes in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of General Microbiology*, 116(1980), 93–98.
- Zhu, X., Navarro, Y., Mas, A., Torija, M. J., & Beltran, G. (2020). A rapid method for selecting non-saccharomyces strains with a low ethanol yield. *Microorganisms*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050658>

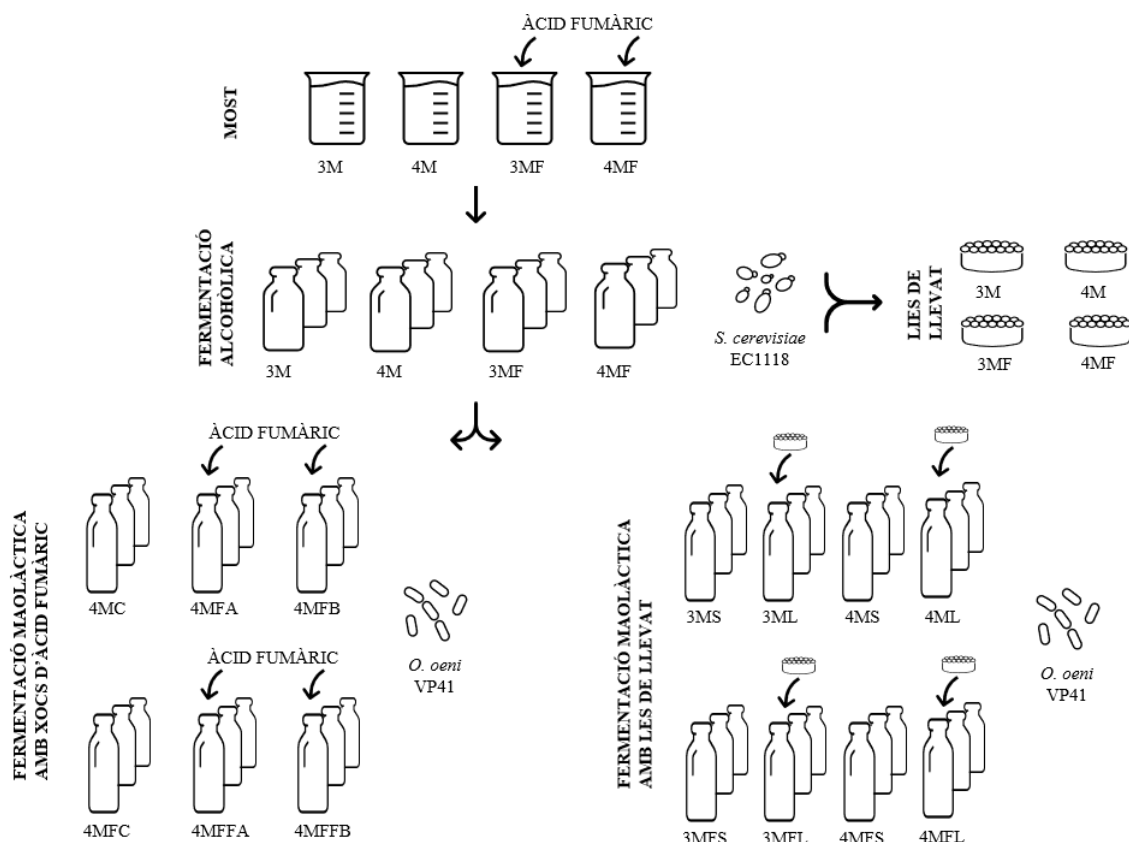
9. ANNEX 1

Figura A1 – Esquema general de l'estudi. Font: pròpia

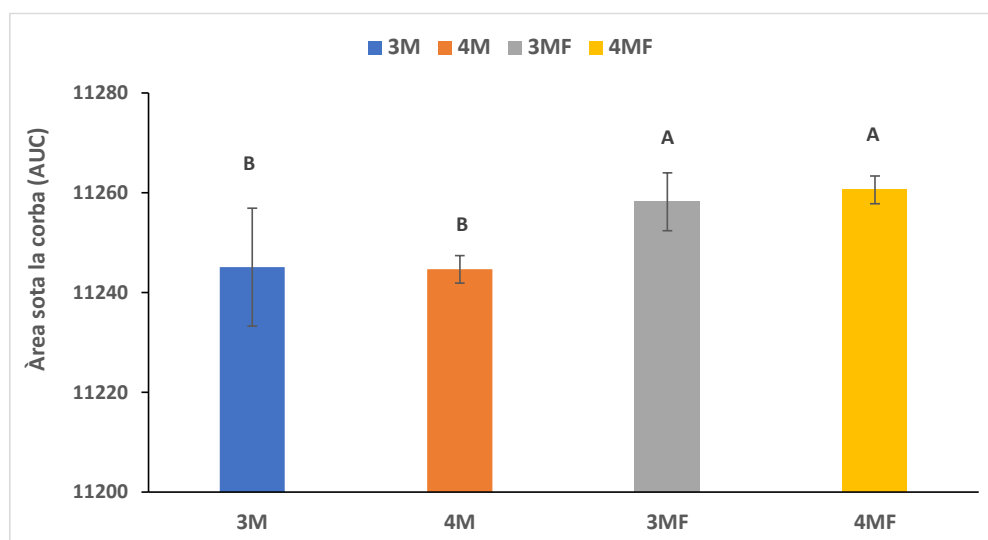


Figura A2 - Representació de les àrees sota la corba (AUCs) durant la cinètica de la fermentació alcohòlica dels mostos sintètics 3M – most de pH 3 amb àcid màlic, 4M – most de pH 4 amb àcid màlic, 3MF – most de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric i 4MF – most de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric.

Les lletres de sobre les barres indiquen la diferència significativa entre les condicions utilitzant la prova de Tukey (HSD) a $p < 0,05$. Font: pròpia

Taula A3 - Dades dels paràmetres químics dels mostos a l'inici de la FA per a les condicions 3M – most de pH 3 amb àcid màlic, 4M – most de pH 4 amb àcid màlic, 3MF – most de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric i 4MF – most de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric. Font: pròpia.

Paràmetres	pH 3		pH 4	
	3M	3MF	4M	4MF
pH	3,05 ± 0,01 ^b	2,94 ± 0,01 ^c	3,91 ± 0,01 ^a	3,93 ± 0,00 ^a
Densitat	1090,00 ± 0,00	1090,00 ± 0,00	1090,00 ± 0,00	1090,00 ± 0,00
Nitrogen-PAN	134,67 ± 0,58 ^a	130,33 ± 1,53 ^b	124,33 ± 0,58 ^c	136,00 ± 0,00 ^a
Nitrogen-AMONI	24,67 ± 1,15 ^a	26,00 ± 2,00 ^a	20,67 ± 0,58 ^a	25,00 ± 0,00 ^a
YAN final	159,33 ± 77,78	156,33 ± 73,77	145,00 ± 73,30	161,00 ± 78,49
Àcid tartàric	5,00 ± 0,00 ^a	5,00 ± 0,00 ^a	5,00 ± 0,00 ^a	5,00 ± 0,00 ^a
Àcid cítric	0,47 ± 0,00 ^a	0,45 ± 0,00 ^b	0,43 ± 0,01 ^c	0,46 ± 0,01 ^{a b}
Àcid L-màlic	2,02 ± 0,00 ^a	2,03 ± 0,00 ^a	2,01 ± 0,00 ^a	2,01 ± 0,00 ^a
Àcid fumàric	0,00 ± 0,00 ^b	0,65 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,64 ± 0,02 ^a

Taula A4 - Dades dels paràmetres químics dels vins un cop acabada la FA per a les condicions 3M – vi de pH 3 amb àcid màlic, 4M – vi de pH 4 amb àcid màlic, 3MF – vi de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric i 4MF – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric. Font: pròpia

Paràmetres	pH 3		pH 4	
	3M	3MF	4M	4MF
pH	3,30 ± 0,03 ^c	3,39 ± 0,00 ^b	4,11 ± 0,00 ^a	4,13 ± 0,01 ^a
Glucosa-fructosa	0,94 ± 0,30 ^{a b}	1,33 ± 0,51 ^a	0,41 ± 0,05 ^b	0,71 ± 0,13 ^{a b}
Etanol	12,22 ± 0,13 ^a	11,95 ± 0,49 ^a	11,46 ± 0,16 ^{a b}	10,78 ± 0,28 ^b
Glicerol	6,27 ± 0,29 ^a	6,76 ± 0,81 ^a	6,68 ± 0,27 ^a	6,21 ± 0,66 ^a
Nitrogen-PAN	9,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00
Nitrogen-AMONI	5,50 ± 0,50 ^a	7,00 ± 1,00 ^a	6,50 ± 1,50 ^a	2,50 ± 0,50 ^a
YAN final	14,50 ± 2,47	15,00 ± 0,71	17,50 ± 3,18	12,50 ± 5,30
Àcid tartàric	4,60 ± 0,07 ^{a b}	4,68 ± 0,05 ^a	4,47 ± 0,06 ^b	4,30 ± 0,05 ^c
Àcid acètic	0,48 ± 0,03 ^a	0,40 ± 0,08 ^a	0,36 ± 0,04 ^a	0,42 ± 0,06 ^a
Àcid D-Làctic	0,10 ± 0,00 ^{a b}	0,09 ± 0,00 ^b	0,10 ± 0,00 ^{a b}	0,11 ± 0,01 ^a
Àcid L-Làctic	0,03 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,02 ^a	0,02 ± 0,01 ^a
Àcid cítric	0,43 ± 0,03 ^a	0,47 ± 0,01 ^a	0,46 ± 0,01 ^a	0,47 ± 0,03 ^a
Àcid L-màlic	1,57 ± 0,03 ^a	1,58 ± 0,17 ^a	1,77 ± 0,02 ^a	1,76 ± 0,16 ^a
Àcid succínic	0,75 ± 0,11 ^{a b}	0,99 ± 0,43 ^a	0,65 ± 0,05 ^b	0,91 ± 0,05 ^a

Taula A5 - Dades dels paràmetres químics dels vins un cop acabada la FML amb lies de llevat per a les condicions 3MS – most de pH 3 amb àcid màlic sense lies, 3ML – most de pH 3 amb àcid màlic amb lies, 4MS – most de pH 4 amb àcid màlic sense lies, 4ML – most de pH 4 amb àcid màlic amb lies, 3MFS – most de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric sense lies, 3MFL – most de pH 3 amb àcid màlic i àcid fumàric amb lies, 4MFS – most de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric sense lies i 4MFL – most de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric amb lies. Font: pròpia.

Paràmetres	pH 3						pH 4			
	3MS	3ML	3MFS	3MFL	4MS	4ML	4MFS	4MFL		
pH	3,32 ± 0,03 ^c	3,36 ± 0,01 ^c	3,42 ± 0,01 ^b	3,44 ± 0,01 ^b	4,33 ± 0,01 ^a	4,33 ± 0,01 ^a	4,31 ± 0,01 ^a	4,30 ± 0,01 ^a		
Àcid L-màlic	1,48 ± 0,01 ^b	1,49 ± 0,03 ^b	1,65 ± 0,01 ^a	1,63 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,05 ^e	0,09 ± 0,06 ^e	0,99 ± 0,05 ^d	1,05 ± 0,02 ^c		
Àcid L-Làctic	0,03 ± 0,01 ^e	0,03 ± 0,01 ^e	0,03 ± 0,01 ^e	0,03 ± 0,01 ^e	1,05 ± 0,01 ^a	0,98 ± 0,02 ^b	0,74 ± 0,01 ^c	0,66 ± 0,01 ^d		
Àcid acètic	0,72 ± 0,00 ^{ab}	0,72 ± 0,01 ^{ab}	0,65 ± 0,03 ^{bc}	0,63 ± 0,01 ^c	0,75 ± 0,07 ^a	0,75 ± 0,03 ^a	0,80 ± 0,02 ^a	0,79 ± 0,02 ^a		
Àcid D-Làctic	0,10 ± 0,00 ^c	0,10 ± 0,00 ^c	0,10 ± 0,00 ^c	0,10 ± 0,01 ^c	0,13 ± 0,00 ^b	0,15 ± 0,00 ^a	0,13 ± 0,00 ^b	0,13 ± 0,00 ^b		
Àcid cítric	0,44 ± 0,00 ^a	0,44 ± 0,01 ^a	0,44 ± 0,00 ^a	0,45 ± 0,00 ^a	0,45 ± 0,02 ^a	0,43 ± 0,04 ^a	0,42 ± 0,00 ^a	0,42 ± 0,02 ^a		
Àcid fumàric	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,10 ± 0,00 ^b	0,10 ± 0,01 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,25 ± 0,04 ^a	0,24 ± 0,01 ^a		

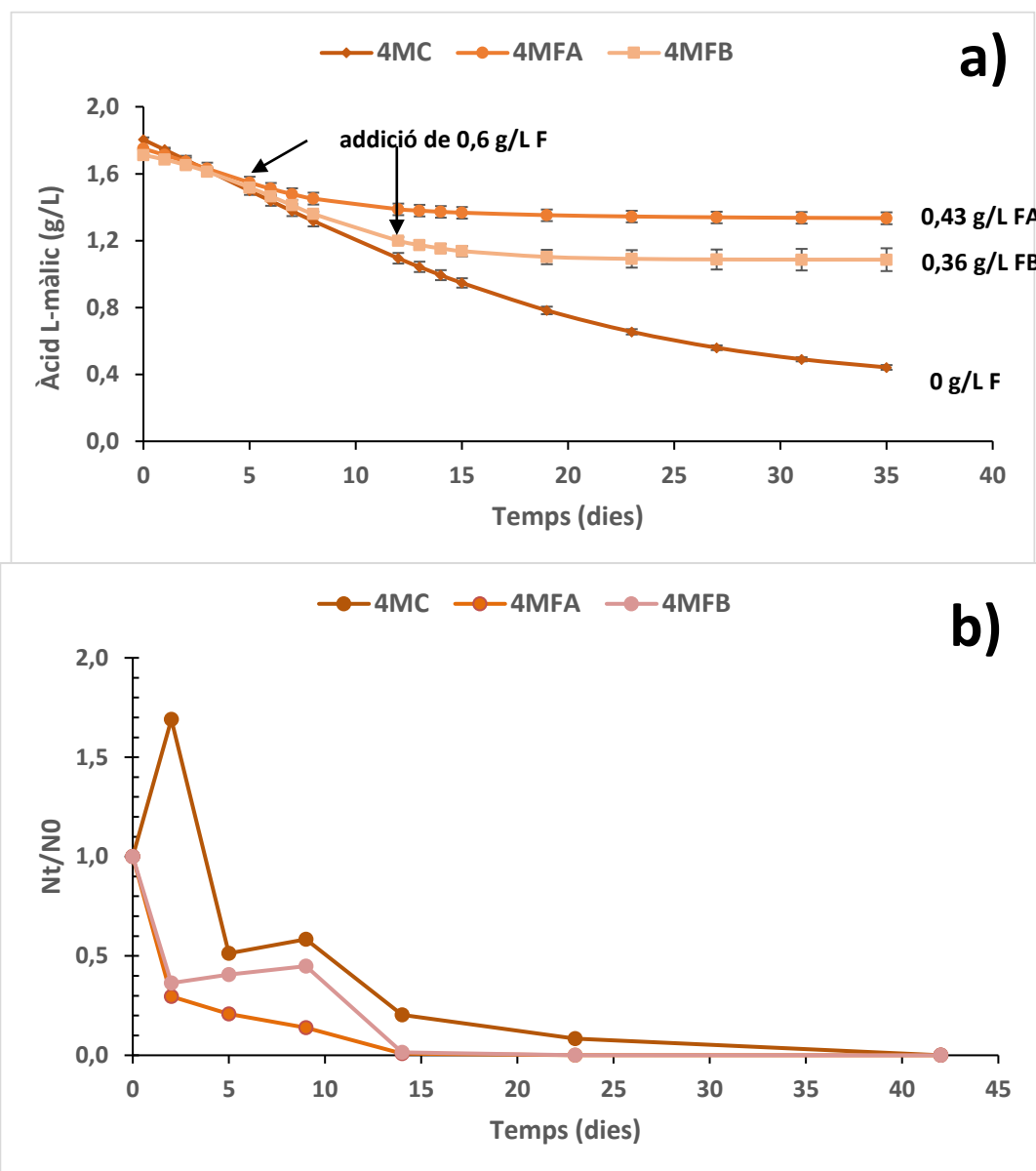


Figura A6 – a) Evolució de la cinètica de la fermentació malolàctica amb xocs d'àcid fumàric per a les condicions 4MC – vi control de pH 4 amb àcid màlic, 4MFA – vi de pH 4 amb àcid màlic en el que s'aplica un xoc d'àcid fumàric el dia 5 de FML, 4MFB – vi de pH 4 amb àcid màlic en el que s'aplica un xoc d'àcid fumàric el dia 12 de FML amb *O. Oeni* VP41 representada mitjançant la concentració d'àcid L-màlic (g/L) al llarg del temps (dies). En la informació complementària del gràfic F és àcid fumàric. b) Seguiment de la població de bacteris làctics cultivables (ufc/mL) durant la FML amb xocs d'àcid fumàric per a les condicions 4MC – vi control de pH 4 amb àcid màlic, 4MFA – vi de pH 4 amb àcid màlic en el que s'aplica un xoc d'àcid fumàric el dia 5 de FML, 4MFB – vi de pH 4 amb àcid màlic en el que s'aplica un xoc d'àcid fumàric el dia 12 de FML. Nt és la població al temps t i N0 és la població a temps 0. Font: pròpia

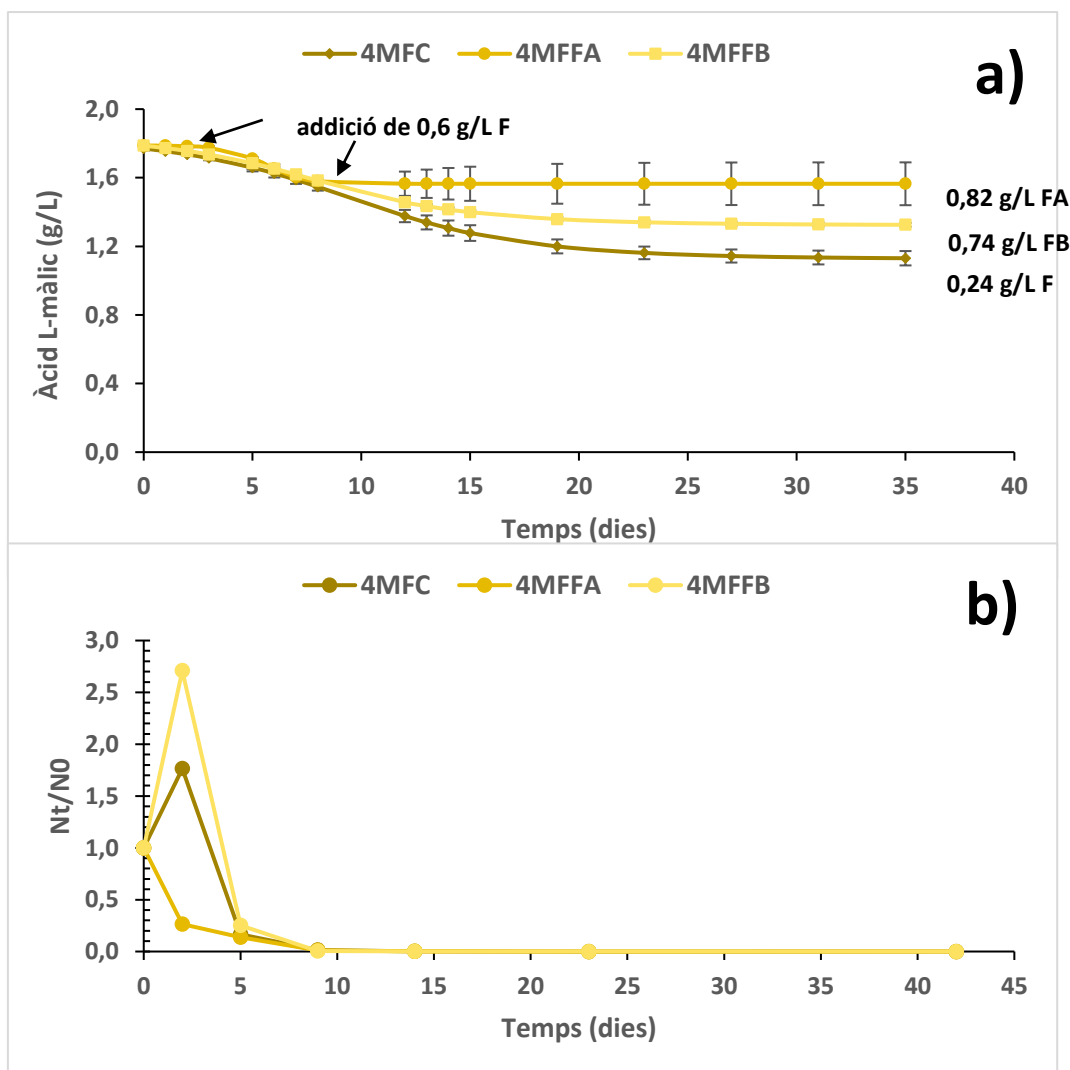


Figura A7 – a) Evolució de la cinètica de la fermentació malolàctica amb xocs d'acid fumàric per a les condicions 4MFC – vi control de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric, 4MFFA – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric en el que s'ha aplicat un xoc d'acid fumàric el dia 3 de FML, 4MFFB – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric en el que s'ha aplicat un xoc d'acid fumàric el dia 9 de FML amb *O. Oeni* VP41 representada mitjançant la concentració d'àcid L-màlic (g/L) al llarg del temps (dies). La concentració inicial d'acid fumàric en les tres condicions es de 0,36 g/L. En la informació complementària del gràfic F és àcid fumàric. b) Seguiment de la població de bacteris làctics cultivables (ufc/mL) durant la FML amb xocs d'acid fumàric per a les condicions 4MFC – vi control de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric, 4MFFA – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric en el que s'ha aplicat un xoc d'acid fumàric el dia 3 de FML, 4MFFB – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric en el que s'ha aplicat un xoc d'acid fumàric el dia 9 de FML amb *O. Oeni* VP41. Nt és la població al temps t i N0 és la població a temps 0. Font: pròpia

Taula A8 - Dades dels paràmetres químics dels vins a l'inici de la FML amb xocs d'àcid fumàric per a les condicions 4M – vi control de pH 4 amb àcid màlic i 4MF – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric. Font: pròpia.

Paràmetres	4M	4MF
pH	4,00 ± 0,01 ^a	4,07 ± 0,03 ^b
Glucosa-fructosa	0,34 ± 0,06	0,24 ± 0,11
Nitrogen-PAN	11,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00
Nitrogen-AMONI	6,67 ± 0,58	7,50 ± 0,50
YAN final	17,67 ± 3,06	18,50 ± 2,47
Àcid tartàric	4,58 ± 0,18	4,69 ± 0,06
Àcid acètic	0,66 ± 0,03	0,65 ± 0,04
Àcid D-Làctic	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Àcid L-Làctic	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,02
Àcid cítric	0,46 ± 0,01	0,49 ± 0,02
Àcid fumàric	0,00 ± 0,00 ^a	0,36 ± 0,01 ^b
Àcid L-màlic	1,72 ± 0,00	1,80 ± 0,00

Taula A9 - Dades dels paràmetres químics dels vins un cop acabada la FML amb xocs d'àcid fumàric per a les condicions 4MC – vi control de pH 4 amb àcid màlic, 4MFA – vi de pH 4 amb àcid màlic en el que s'aplica un xoc d'àcid fumàric el dia 5 de FML, 4MFB – vi de pH 4 amb àcid màlic en el que s'aplica un xoc d'àcid fumàric el dia 12 de FML. Font: pròpia.

Paràmetres	Control – 4MC	Xoc A – 4MFA	Xoc B – 4MFB
pH	4,10 ± 0,00 ^a	3,92 ± 0,01 ^c	3,96 ± 0,00 ^b
Àcid L-màlic	0,45 ± 0,02 ^c	1,27 ± 0,07 ^a	1,06 ± 0,05 ^b
Àcid L-Làctic	0,83 ± 0,01 ^a	0,33 ± 0,06 ^c	0,46 ± 0,03 ^b
Àcid D-Làctic	0,12 ± 0,00 ^a	0,11 ± 0,00 ^b	0,11 ± 0,00 ^b
Àcid acètic	0,71 ± 0,01 ^a	0,68 ± 0,01 ^b	0,70 ± 0,01 ^{ab}
Àcid cítric	0,40 ± 0,01 ^b	0,44 ± 0,00 ^a	0,44 ± 0,00 ^a

Taula A10 - Dades dels paràmetres químics dels vins un cop acabada la FML amb xocs d'acid fumàric per a les condicions 4MFC – vi control de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric, 4MFFA – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric en el que s'ha aplicat un xoc d'àcid fumàric el dia 3 de FML, 4MFFB – vi de pH 4 amb àcid màlic i àcid fumàric en el que s'ha aplicat un xoc d'àcid fumàric el dia 9 de FML. Font: pròpia.

Paràmetres	Control – 4MFC	Xoc A – 4MFFA	Xoc B – 4MFFB
pH	4,14 ± 0,01 ^a	3,97 ± 0,01 ^c	3,99 ± 0,00 ^b
Àcid L-màlic	0,89 ± 0,04 ^c	1,55 ± 0,01 ^a	1,38 ± 0,02 ^b
Àcid L-Làctic	0,64 ± 0,05 ^a	0,22 ± 0,02 ^c	0,34 ± 0,01 ^b
Àcid D-Làctic	0,11 ± 0,0 ^a	0,11 ± 0,01 ^b	0,11 ± 0,00 ^b
Àcid acètic	0,69 ± 0,01 ^a	0,68 ± 0,01 ^b	0,69 ± 0,01 ^{ab}
Àcid cítric	0,45 ± 0,00 ^b	0,46 ± 0,00 ^a	0,46 ± 0,00 ^a