

Universitat de València
Departament de Microbiologia i Ecologia



**Estudi de diferents tècniques per
desenvolupar la fermentació malolàctica
amb *Oenococcus oeni***

Sergi Maicas i Prieto
Juny 1998

UMI Number: U607699

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607699

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registre 12050

DATA 22-6-98

SIGNATURA T.D. 522

Nº LIBRE 120920866

Biologicas

Universitat de València
Facultat de Ciències Biològiques
Departament de Microbiologia i Ecologia

**ESTUDI DE DIFERENTS TÈCNiques PER DESENVOLUPAR
LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA AMB *Oenococcus oeni***

Memòria presentada per Sergi Maicas i Prieto
per optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques
per la Universitat de València.


Dirigida per Isabel Pardo Cubillos i Sergi Ferrer i Soler,
Professors Titulars de la Universitat de València

Burjassot, juny de 1998

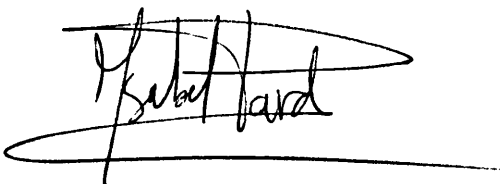
ISABEL PARDO CUBILLOS i SERGI FERRER I SOLER, Doctors en Ciències Biològiques i Professors Titulars del Departament de Microbiologia i Ecologia de la Universitat de València,

CERTIFIQUEN: que la memòria titulada: "Estudi de diferents tècniques per desenvolupar la fermentació malolàctica amb *Oenococcus oeni*", ha estat realitzada sota la seva direcció al Departament de Microbiologia i Ecologia de la Universitat de València per Sergi Maicas i Prieto, llicenciat en Ciències Biològiques.

Perquè així conste, en compliment de la legislació vigent, signem aquest certificat a Burjassot, 11 de maig de 1998.



Signat: Dr. Sergi Ferrer i Soler



Signat: Dra. Isabel Pardo Cubillos

ABREVIATURES MÉS UTILITZADES

ADH	Alcohol deshidrogenasa
AK	Acetat quinasa
ALDH	Aldehid deshidrogenasa
ATP	Adenosin trifosfat
DE	Dietil
DEAE	Dietilaminoetil
EDH	Eritritol-4-P-deshidrogenasa
EN	Enolasa
EP	Eritritol fosfatasa
FAD	Flavin adenin dinucleòtid
FML	Fermentació malolàctica
GC(GLC)	Cromatografia de gasos
GDH	Glicerol-3-P-deshidrogenasa
GP	Glicerol fosfatasa
GPDH	Glucosa-6-P-deshidrogenasa
GPDH'	Gluconat-6-P-deshidrogenasa
HK	Hexosa quinasa
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
LDH	Lactat deshidrogenasa
MDH	Mannitol deshidrogenasa
MLO	Medi per <i>Leuconostoc oenos</i>
NAD(P) ⁺	Nicotin adenin dinucleòtid (fosfat)
NAD(P)H	Nicotin adenin dinucleòtid (fosfat) reduït
PAT	Fosfat acetil transferasa
PC	Fosfocetolasa
PGDH	Gliceraldehid-3-P-deshidrogenasa
PGK	1,3-difosfoglicerat deshidrogenasa
PK	Piruvat quinasa
RPE	Ribulosa-5-P-isomerasa
SO ₂	Anhidrid sulfurós
TF	Tampó tartrat fosfat
VFE	Via de formació de l'etanol

ÍNDIX

Índex de figures	I
------------------------	---

Índex de taules	II
-----------------------	----

Capítol 1. Introducció

1 Els bacteris làctics del vi	2
1.1 Situació taxonòmica	2
1.2 Ecologia dels bacteris làctics del vi	5
1.3 Aspectes metabòlics dels bacteris làctics del vi (amb especial incidència en <i>O. oeni</i>)	6
1.3.1 Metabolisme de carbohidrats	6
1.3.2 Metabolisme de polialcohols	11
1.3.3 Metabolisme de components nitrogenats (aminoàcids): formació d'amines biogèniques	11
1.3.4 Metabolisme d'àcids orgànics	12
2 La fermentació malolàctica	15
2.1 Beneficis de l'FML pels bacteris làctics	16
2.2 Beneficis i perjudicis de l'FML per la producció de vi	17
2.3 Paràmetres que afecten la supervivència dels bacteris làctics (especialment <i>O. oeni</i>) i el desenvolupament de l'FML	19
2.3.1 pH	19
2.3.2 Etanol	20
2.3.3 Concentració d'inòcul bacterià	21
2.3.4 Concentració de nutrients (fonts de carboni i nitrogen)	21
2.3.5 Temperatura	22
2.3.6 Anhidrid sulfurós	22
2.3.7 Composició de l'atmosfera de cultiu	23
2.3.8 Bacteriòfags	23
2.4 Inducció o control de la fermentació malolàctica	24
2.4.1 Selecció de les condicions òptimes per potenciar la microbiota malolàctica autòctona	25
2.4.2 Inoculació de vins amb soques provinents de vins fent l'FML	26
2.4.3 Inoculació amb cultius purs de soques comercials o seleccionades	26
2.4.4 Tecnologies alternatives per realitzar la fermentació malolàctica	27
2.5 Producció i conservació de cultius d' <i>Oenococcus oeni</i> per induir la fermentació malolàctica en vi	29
3 Objectius	33

Capítol 2. Aïllament, selecció, producció i conservació de noves soques

1 Materials i mètodes	35
1.1 Aïllament i identificació de noves soques	35
1.2 Adaptació de soques d' <i>Oenococcus oeni</i> al creixement en vi	40
1.3 Conservació de soques d' <i>O. oeni</i> i manteniment de l'activitat malolàctica	41

2 Resultats i discussió	42
2.1 Aïllament i identificació de noves soques d' <i>O. oeni</i>	42
2.1.1 Proves realitzades per adscriure les soques a gèneres	42
2.1.2 Proves realitzades per adscriure les soques a espècies	44
2.1.3 Soques adscrites a l'espècie <i>Oenococcus oeni</i>	52
2.2 Anàlisi de la producció de compostos volàtils	53
2.3 Adaptació de soques d' <i>Oenococcus oeni</i> al creixement en vi	60
2.3 Conservació de soques d' <i>O. oeni</i> i manteniment de l'activitat malolàctica	64
2.5 Recapitulació	67

Capítol 3. Metabolisme de carbohidrats

1 Materials i mètodes	70
1.1 Assaigs en tampó	70
1.2 Assaigs en medi de cultiu	70
1.2.1 Obtenció dels extrems	70
1.2.2 Determinació de proteïnes	71
1.2.3 Determinació d'activitats enzimàtiques a la via de formació de l'etanol	71
1.2.4 Determinació de les activitats NADH i NADPH oxidasa	74
1.2.5 Quantificació de cofactors	74
1.3 Anàlisi química i estequiomètrica	78
2 Resultats i discussió	79
2.1 Efecte del creixement anaerobi sobre el metabolisme de la glucosa	80
2.2 Efecte del creixement aerobi sobre el metabolisme de la glucosa	81
2.3 Efecte del creixement aerobi i anaerobi sobre el metabolisme de la fructosa	86
2.4 Efecte de l'addició de substrats reductors sobre el metabolisme aerobi de la glucosa	87
2.5 Recapitulació	92

Capítol 4. Aplicació d'altres tecnologies per a la realització de l'FML

1 Materials i mètodes	95
1.1 FML amb cèl·lules lliures no proliferants d' <i>O. oeni</i>	95
1.1.1 Inoculació i seguiment de l'FML	95
1.1.2 Selecció de paràmetres experimentals	95
1.2 FML amb cèl·lules d' <i>O. oeni</i> en creixement continu	96
1.2.1 Inoculació i seguiment de l'FML	96
1.2.2 Biorreactors: instrumentació i operació	97
1.3 FML amb cèl·lules d' <i>O. oeni</i> immobilitzades	97
1.3.1 Materials utilitzats	97
1.3.2 Procediment d'immobilització: assaigs en flascons Erlen-Meyer	97
1.3.3 Procediment d'immobilització: assaigs en columna	98
1.3.4 FML amb cèl·lules d' <i>O. oeni</i> immobilitzades: assaigs en flascó	99
1.3.5 FML amb cèl·lules d' <i>O. oeni</i> immobilitzades: assaigs en columna	99
1.3.6 Determinació de la degradació d'àcid màlic i/o aparició d'àcid làctic	99
2 Resultats i discussió	100
2.1 FML amb cèl·lules lliures no proliferants d' <i>O. oeni</i>	100
2.1.1 pH 3.1 i 7.0 g L ⁻¹ d'àcid màlic inicials	100

2.1.2 pH 3.1 i 3.5 g L ⁻¹ d'àcid màlic inicials.....	101
2.1.3 pH 3.5 i 7.0 g L ⁻¹ d'àcid màlic inicials.....	107
2.1.4 pH 3.5 i 3.5 g L ⁻¹ d'àcid màlic inicials.....	107
2.1.5 Evolució d'altres metabòlits durant la fermentació.....	108
2.1.6 Anàlisi global de l'apartat.....	109
2.2 FML amb cèl·lules d' <i>O. oeni</i> en creixement continu	110
2.3 FML amb cèl·lules d' <i>O. oeni</i> immobilitzades.....	113
2.3.1 Taxes d'immobilització i nivells d'adsorció: influència de diferents aspectes.....	113
2.3.2 Fermentacions en flascó.....	120
2.3.3 Fermentacions en columna.....	122
2.3.4 Anàlisi global de l'apartat.....	123
2.4 Recapitulació.....	124
<u>Conclusions</u>	127
<u>Bibliografia</u>	130
<u>Annexos</u>	141

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1.1.	Ruta heterolàctica de fermentació d'hexoses	8
Figura 1.2.	Metabolisme de pentoses i pentitols.....	9
Figura 1.3.	Ruta de metabolització del glicerol.....	11
Figura 1.4.	Rutes de metabolització d'àcid L-màlic.....	14
Figura 1.5.	Esquema de la fermentació malolàctica.....	17
Figura 2.1.	Concentració d'alcohols superiors al vi	56
Figura 2.1.	Concentració d'alcohols superiors al vi	56
Figura 2.1.	Concentració d'alcohols superiors al vi	56
Figura 2.2.	Creixement d' <i>O. oeni</i> en medis de pre-cultiu	61
Figura 2.3.	Creixement d' <i>O. oeni</i> en vi	63
Figura 3.1.	Creixement d' <i>O. oeni</i> sota diferents condicions d'airejat	80
Figura 3.2.	Degradació de fructosa en tampó TF.....	87
Figura 3.3.	Creixement d' <i>O. oeni</i> en MBC amb glucosa.....	90
Figura 4.1.	FML amb cèl·lules no proliferants d' <i>O. oeni</i> : paràmetres	96
Figura 4.2.	Immobilització cel·lular en columna: esquema del sistema	98
Figura 4.3.	FML amb cèl·lules no proliferants d' <i>O. oeni</i> : resultats	103
Figura 4.4.	Creixement i degradació d'àcid màlic per <i>O. oeni</i>	104-106
Figura 4.5.	Fermentació malolàctica en continu per <i>O. oeni</i>	110
Figura 4.6.	Percentatge de degradació d'àcid màlic durant l'operació dels biorreactors en mode continu amb soques d' <i>O. oeni</i>	111
Figura 4.7.	Taxes finals d'immobilització de cèl·lules d' <i>O. oeni</i> M42, a partir de tampó TF a diferent pH.....	113
Figura 4.8.	Taxes d'adsorció d' <i>O. oeni</i> , en suspensions a diferents pH, a esponges de cel·lulosa amb i sense càrrega.....	115
Figura 4.9.	Influència del medi de suspensió sobre la taxa d'immobilització	116
Figura 4.10.	Taxes d'adsorció d' <i>O. oeni</i> , en suspensions a diferents pH, a esponges de cel·lulosa-DE. Experiments en columna	118
Figura 4.11.	Efecte del flux de treball sobre la desimmobilització d' <i>O. oeni</i> adsorbit a esponges de cel·lulosa-DE	119
Figura 4.12.	FML amb <i>O. oeni</i> immobilitzat en esponges cel·lulosa. Exp. 1	120
Figura 4.13.	FML amb <i>O. oeni</i> immobilitzat en esponges cel·lulosa. Exp. 2	121
Figura 4.14.	FML amb cèl·lules immobilitzades: Experiments en columna.....	123

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1.1. Classificació dels bacteris làctics presents al vi.....	2
Taula 2.1. Creixement a diferents temperatures	44
Taula 2.2. Creixements a diferents valors de pH.....	45
Taula 2.3. Creixement en presència d'etanol al 10 %.....	46
Taula 2.4. Degradació d'àcids orgànics.....	48
Taula 2.5. Fermentació de carbohidrats	50
Taula 2.6. Concentracions relatives de components volàtils.....	54
Taula 2.7. Concentracions absolutes de components volàtils	55
Taula 2.8. Paràmetres relatius a la fermentació malolàctica en vi.....	60
Taula 2.8. Creixement d' <i>O. oeni</i> en diferents medis de pre-cultiu	62
Taula 2.10. Supervivència d' <i>O. oeni</i> després de la seva conservació	66
Taula 2.11. FML en vi per <i>O. oeni</i> després de la seva conservació	66
Taula 3.1. Quantificació de substrats i productes. Creixement d' <i>O. oeni</i> amb glucosa o fructosa sota diferents condicions d'airejat.....	82
Taula 3.2. Activitat específica d'NAD(P)H-oxidases amb i sense FAD	83
Taula 3.3. Activitat específica dels enzims de la via de formació de l'etanol.....	84
Taula 3.4. Concentració del cofactors i ratio NAD(P) ⁺ /NAD(P)H	85
Taula 3.5. Quantificació de substrats i productes. Creixement d' <i>O. oeni</i> en MBC-glucosa amb diferents substrats reductors.....	89
Taula 3.6. Quantificació de substrats i productes. Creixement d' <i>O. oeni</i> en MBC-glucosa amb diferents quantitats de cisteïna.....	91
Taula 4.1. Percentatge de degradació de l'àcid màlic sota diferents condicions inicials de pH, nivell d'inòcul i concentració de màlic	102
Taula 4.2. Percentatge de cèl·lules d' <i>O. oeni</i> immobilitzades a partir de suspensions cel·lulars amb diferent nivell inicial de biomassa	117
Taula 4.3. Condicions òptimes per a la immobilització d' <i>O. oeni</i> M42.....	117
Taula 4.4. FML amb <i>O. oeni</i> per diferents tècniques experimentals	125

CAPÍTOL 1
INTRODUCCIÓ

1 ELS BACTERIS LÀCTICS DEL VI

La importància dels bacteris làctics en enologia resideix tant en la seva capacitat d'afectar la qualitat final del vi així com en les implicacions econòmiques que de la seva actuació es deriven (Wibowo *et al.*, 1985). Pasteur (1873) considerava que la presència de bacteris làctics en vi disminuïa la seva qualitat i causava per això perjudicis econòmics. Müller-Thurgau fou el primer investigador en adonar-se de que el seu creixement al vi possibilitava la reducció de l'acidesa i amb això es beneficiava la seva qualitat sensorial (Wibowo, 1985; Davis *et al.*, 1988).

1.1 SITUACIÓ TAXONÒMICA

Els bacteris làctics són un grup de microorganismes força heterogenis des d'un punt de vista morfològic i fisiològic. Les seves característiques generals principals són el ser heteròtrofs, quimio-organòtrofs, Gram +, immòbils, no esporulats i anaerobis, anaerobis facultatius o microaeròfils. No posseeixen catalasa, nitrit reductasa ni citocrom oxidasa. A més, produeixen quantitats abundants d'àcid làctic per fermentació de substàncies hidrocarbonades (Holt *et al.*, 1994). Els cinc gèneres de bacteris làctics presents al vi, acceptats actualment són els recollits a la taula 1.1 (Roissart i Luquet, 1994; Dicks, 1995; Dicks *et al.*, 1995; Schleiffer i Ludwig, 1996; Stiles i Holzapfel, 1997).

Gènere	Metabolisme de carbohidrats	Morfologia	Agrupació cel·lular
<i>Lactobacillus</i>	Homo/heterolàctic	Bacil·lar	Aparellats o cadenes
<i>Pediococcus</i>	Homolàctic	Coccoïdal	Tètrades
<i>Leuconostoc</i>	Heterolàctic	Coccoïdal	Aïllats o cadenes
<i>Oenococcus</i>	Heterolàctic	Coccoïdal	Aïllats o cadenes
<i>Weissella</i>	Heterolàctic	Bacil·lar/coccoïdal	Aparellats o cadenes

Taula 1.1. Classificació dels bacteris làctics presents al vi.

Leuconostoc, *Oenococcus* i *Pediococcus* són cocs, petites esferes de 0.5-1.0 µm de diàmetre amb un morfotip colonial generalment llis si bé existeix certa heterogeneïtat al

respecte (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983; Fleet *et al.*, 1984; Davis *et al.*, 1988). Mentre *Leuconostoc* i *Oenococcus* es caracteritzen per la formació de cadenes, amb més o menys individus, els *Pediococcus* es disposen en tètades formades com a conseqüència de la seva divisió en dos plànols perpendiculars (Holt *et al.*, 1994). *Lactobacillus* presenta en canvi una morfologia bacil·lar amb una llargària de 1.0-5.0 µm i un diàmetre de 0.5-1.0 µm trobant-se generalment aparellats o en cadenes més o menys llargues. Vàries espècies abans incloses dins el gènere *Lactobacillus* així com *Leuconostoc paramesenteroides* formen ara el gènere comú *Weissella* on coexisteixen soques de morfologia dispar (Collins *et al.*, 1993; Dicks, 1995).

D'entre tots els bacteris làctics presents al vi, el gènere més important pel desenvolupament de la fermentació malolàctica (FML) és *Oenococcus oeni* (abans *Leuconostoc oenos*) i per això aquesta tesi es centra en el seu estudi. Les primeres referències bibliogràfiques relacionades amb aquest microorganisme corresponen a Garvie (1960) i Fornachon (1964) qui van realitzar estudis sobre la seva identificació i caracterització. Garvie (1967a) va descriure la nova espècie *L. oenos* en base a la seva incapacitat per produir dextrà a partir de la sacarosa així com per la capacitat de créixer a pH baixos que altres espècies del seu hàbitat natural, el vi, no podien suportar. *L. oenos* (actualment *O. oeni*) fou definit com a un bacteri làctic caracteritzat per formar majoritàriament l'isòmer D(-) de l'àcid làctic a partir de la glucosa i també per la incapacitat de produir amoníac a partir de l'arginina (Garvie, 1975; 1976; 1984). Aquesta última afirmació és últimament posada en dubte per alguns autors que detecten l'activitat arginina desaminasa a moltes de les soques assajades (Liu *et al.*, 1994; 1995).

Des d'aleshores, s'han realitzat nombrosos estudis taxonòmics centrats en aquest microorganisme utilitzant diferents tècniques i assaigs metabòlics, moltes vegades posades a punt per un grup d'investigació i escassament utilitzat per altres. Així, Garvie (1967b) va descriure la necessitat d'afegir vitamines i aminoàcids al medi de cultiu de *Leuconostoc* per obtenir creixements acceptables. Especialment important era la necessitat d'afegir suc de tomàquet en la composició d'aquests medis (Garvie, 1984). Amachi *et al.* (1969; 1971; 1975) explicarien aquesta necessitat en base a la presència al tomàquet de l'àcid 4'-O-(β-D-glucopiranosil)-D-(R)-pantotènic. Els efectes beneficiosos d'aquest derivat de l'àcid pantotènic han estat posteriorment demostrats en altres bacteris làctics (Babu *et al.*, 1992). Tanmateix, la capacitat d'assimilació d'aquest component no deixa de ser avui en dia un més dels trets que defineixen *O. oeni*. Garvie

(1967b), Tracey i Britz (1989) i Fourcassie *et al.* (1992) descriuen la utilització de proves d'assimilació d'aminoàcids essencials com a una ferramenta d'interès en la identificació de noves soques d'*O. oeni*.

Els patrons electroforètics de diferents enzims també han estat utilitzats en la taxonomia d'*O. oeni* (van Vuuren i Dicks, 1993). La lactat deshidrogenasa (LDH) s'utilitzà per diferenciar *O. oeni* dels *Leuconostoc* i dels *Lactobacillus* (Garvie, 1980; Dicks i van Vuuren, 1990). Així mateix, Hontebeyrie i Gasser (1974) i Garvie (1984) van demostrar la utilitat de mètodes immunològics per separar diferents espècies en funció de les seves deshidrogenases (lactat deshidrogenasa i glucosa-6-fosfat deshidrogenasa). Tracey i Britz (1989) van efectuar estudis taxonòmics basant-se en perfils d'àcids grassos mentre Garvie (1984) i Boizet *et al.* (1992) van descriure el tipatge per bacteriòfags com a eina per identificar soques d'*O. oeni*. Els estudis realitzats es fonamentaven en la anàlisi de les característiques morfològiques dels bacteriòfags així com en el fraccionament del seu genoma amb diferents enzims de restricció. La realització de patrons de proteïnes cel·lulars solubles totals efectuats per Dicks *et al.* (1990) i Dicks (1995) també permetien realitzar agrupaments de soques i diferenciar *O. oeni* d'altres bacteris làctics.

Durant els últims anys, l'aparició de noves ferramentes de biologia molecular ha permès la realització d'adscripció de les soques a gènere i espècie d'una manera més ràpida i acurada. L'anàlisi de les seqüències d'ARN 16S (Wallbanks *et al.*, 1990; Martínez-Murcia i Collins, 1990; Collins *et al.*, 1991; Lejeune i Lonvaud-Funel, 1997), 23S (Martínez-Murcia *et al.*, 1993), RFLP de gens ribosomals o restriccions d'ADN total (Viti *et al.*, 1996) i hibridacions ADN-ADN (Hontebeyrie i Gasser, 1974) efectuades els últims anys revela l'existència de d'importants diferències entre *L. oenos* i la resta de bacteris làctics. A aquestes diferències cal afegir les tradicionalment utilitzades per caracteritzar *O. oeni*, com poden ser el creixement en presència d'etanol, en medis àcids i amb unes determinades temperatures (Dicks *et al.*, 1995). Alguns autors creuen per això que cal reclassificar l'espècie i anomenar-la *Oenococcus oeni* (Dicks *et al.*, 1995; Schleiffer i Ludwig, 1996; Lejeune i Lonvaud-Funel, 1997; Zavaleta *et al.*, 1997). Aquesta nova terminologia s'ha adoptat en l'escriptura d'aquesta tesi malgrat que en nombroses referències internes i externes s'utilitza el nom tradicional d'*L. oenos*.

La identificació de nous individus de l'espècie *O. oeni* realitzada en aquesta tesi, s'ha efectuat mitjançant les proves clàssiques enunciades al *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Aquest manual clàssic descriu als individus de l'espècie *Oenococcus oeni*,

abans *Leuconostoc oenos*, com aquelles cèl·lules esfèriques o quasi-esfèriques que es troben en parelles o cadenes i d'una dimensió de 0.5-0.7 µm x 0.7-1.2 µm (Holt *et al.*, 1994). De caràcter Gram +, immòbils i no formadores de espores. Són anaerobis facultatius, quimiorganòtrofs, amb un requeriment obligat pels carbohidrats fermentables. El seu creixement és força lent i produeix colònies de morfologia petita fins i tot en medis de nutrició complexos. Aquestes característiques es detallen a l'apartat de materials i mètodes del capítol 2 que tracta de l'aïllament i identificació de noves soques d'*O. oeni*.

1. 2 ECOLOGIA DELS BACTERIS LÀCTICS DEL VI

Els bacteris làctics es troben al raïm i passen al most durant les primeres etapes de la vinificació. Habitualment, el primer procés que té lloc al most és la fermentació alcohòlica desenvolupada pels llevats. El creixement dels llevats inhibeix el desenvolupament dels bacteris làctics, bé siga per l'alliberament al medi d'algunes substàncies tòxiques produïdes, com pot ser l'etanol, o bé pel consum de nutrients (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1978). Setmanes després de l'inici de la fermentació alcohòlica, aquests nutrients i els productes derivats de la seva metabolització són excretats al vi o bé s'incorporen a ell per l'autòlisi dels llevats. Així, els llevats, principalment *Saccharomyces cerevisiae*, excreten una tercera part del nitrogen que absorbeixen durant el seu creixement en forma d'aminoàcids, pèptids, purines, pirimidines, nucleòsids, nucleòtids oligo i polinucleòtids i complexos polisacàrids rics en proteïnes que poden aprofitar els bacteris per desenvolupar-se (Beelman *et al.*, 1987).

Degut a aquestes influències i també a altres, com pot ser la presència d'SO₂, la temperatura o el pH, el número de bacteris làctics durant el procés de vinificació no és constant, com tampoc no ho són les espècies predominants. Els bacteris làctics presents al raïm de forma majoritària són *Lactobacillus hilgardii* i *Lb. casei*. Al principi de la fermentació alcohòlica són les espècies *Pediococcus damnosus*, *Lb. plantarum* i *Lb. casei* juntament amb *O. oeni* (abans *Leuconostoc oenos*) i *L. mesenteroides* les predominants, arribant a concentracions màximes de 10⁴ ufc mL⁻¹ (van Vuuren i Dicks, 1993). Durant el desenvolupament de la fermentació alcohòlica el número de bacteris làctics totals decreix i tan sols es detecten algunes unitats de *Lb. plantarum* i *O. oeni*. D'aquests, només sol resistir a la majoria dels casos el segon, que és així l'encarregat de dur endavant el procés de l'FML en arribar a concentracions cel·lulars de 10⁷ ufc mL⁻¹. Aquesta evolució típica en vins de pH al voltant de 3.5 no coincideix exactament amb

altres que presenten un pH superior, on poden desenvolupar-se altres bacteris làctics amb conseqüències diverses. A la majoria de vins europeus, el creixement de *Pediococcus* o *Lactobacillus* en vi sol anar associada amb la producció de compostos indesitjables. Tanmateix, existeixen notables excepcions tant a Europa, *Lb. plantarum* a Còrdova (Calero, 1993) o *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* o *Lb. fermentum* a Galícia (Agrelo, 1987; Sieiro *et al.*, 1990; Calo *et al.*, 1991) com a Austràlia, *Lb. hilgardii* o *Ped. cerevisiae* (Davis *et al.*, 1985b) on aquests microorganismes són els responsables de la realització de l'FML de manera satisfactòria. Això implica doncs, la necessitat de realitzar estudis particulars per a cada àrea geogràfica i el tenir molta precaució en extrapolar resultats d'un lloc a un altre.

1.3 ASPECTES METABÒLICS DELS BACTERIS LÀCTICS DEL VI (AMB ESPECIAL INCIDÈNCIA EN *O. oeni*)

1.3.1 Metabolisme de carbohidrats

Els bacteris làctics no disposen del cicle dels àcids tricarboxílics ni dels sistemes de citocroms, per la qual cosa no poden obtenir energia mitjançant una fosforilació oxidativa. Així doncs, l'obtenció d'energia s'ha de realitzar *via* una fosforilació a nivell de substrat durant la fermentació dels carbohidrats (Cogan i Jordan, 1994). Pel que respecta a les hexoses, aquesta metabolització es pot realitzar per dues vies metabòliques alternatives que es diferencien per la forma en què es trenquen les seves estructures carbonades. Tanmateix, ambdues comparteixen el fet de que només són atacades les hexoses-fosfat amb gluco-configuració (Kandler, 1983).

La presència de la via homolàctica de degradació de les hexoses (Embden-Meyerhoff-Parnas) al gènere *Pediococcus* i a alguns *Lactobacillus* els permet disposar d'un metabolisme homofermentatiu caracteritzat per la formació majoritària d'àcid làctic (90-95%). Aquests microorganismes es caracteritzen per la possessió de l'enzim fructosa-difosfat-aldolasa que permet l'obtenció de dues molècules d'àcid làctic i la generació de dues d'ATP a partir d'una de glucosa.

Els altres bacteris làctics que es poden trobar al vi, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* i altres espècies de *Lactobacillus* degraden les hexoses mitjançant la ruta heterolàctica elucidada per DeMoss *et al.* (1951) i Gonsalus *et al.* (1952) anomenada de les pentoses-fosfat, que es caracteritza perquè a més de làctic, rendeix àcid acètic, etanol i CO₂ en diferents proporcions. Aquesta ruta es diferencia de l'homolàctica per

l'absència de l'aldolasa i per la presència de dues deshidrogenases i una fosfocetolasa. A les reaccions inicials de la via heterolàctica (figura 1.1), la glucosa es transforma en gluconat-6-fosfat consumint una molècula d'ATP i reduint un equivalent d' NAD(P)^+ . Aquest gluconat-6-fosfat es descarboxila aleshores a ribulosa-5-fosfat, consumint un altre NAD(P)^+ i alliberant una molècula de CO_2 . La xilulosa-5-fosfat resultant s'escindeix i en resulten dues molècules: el gliceraldehid-3-fosfat, que es metabolitza per la branca glicolítica de la ruta heterolàctica fins a lactat, i una molècula de dos carbonis, l'acetil-fosfat, que es destina a la producció d'àcid acètic o etanol. Les proporcions relatives en què s'obtenen aquests productes depèn de les necessitats de poder reductor que tinga el bacteri. Si n'hi ha un dèficit de cofactors oxidats, l'acetil-fosfat es metabolitza per la via de l'etanol, que permet la reoxidació de dues molècules de cofactor NAD(P)H . Si existeix un acceptor d'electrons al medi, l'acetil-P es pot destinar a la producció d'àcid acètic, amb el guany d'un ATP extra (Lucey i Condon, 1986; Condon, 1987; García *et al.*, 1992b).

Quan l'hexosa fermentable no és la glucosa sinó la fructosa, els bacteris heterolàctics poden reduir-la a mannitol per un sistema enzimàtic col·lateral a la ruta de les pentoses-fosfat, la mannitol deshidrogenasa. D'aquesta manera, les molècules d' NAD(P)H generades a les etapes inicials del metabolisme de les hexoses es poden reoxidar. Així, amb la presència de fructosa al medi, les dependències externes pel què fa a la necessitat d'equilibrar constantment el balanç redox disminueixen, i el creixement bacterià es veu afavorit. La influència que podia tenir el cometabolisme de diferents fonts de carboni sobre el creixement d'*O. oeni* en medis sintètics ha estat anteriorment estudiada (Tracey i van Rooyen, 1988; Krieger *et al.*, 1992).

Salou *et al.* (1994) van determinar l'efecte beneficiós d'aquesta metabolització de manera conjunta explicant-la en base a una menor dependència de NAD^+ i a una major capacitat de producció d'ATP via l'acetat quinasa. La presència de rutes paral·leles (via del glicerol i via de l'eritritol) amb el mateix objectiu final, la reoxidació de NADP(H) , s'ha descrit anteriorment per a la glucosa (Veiga-da-Cunha *et al.*, 1992). Tanmateix, les condicions sota les quals funcionen aquestes vies, i la importància quantitativa del seu funcionament, són aspectes que encara es troben en fase d'estudi (Veiga-da-Cunha *et al.*, 1993).

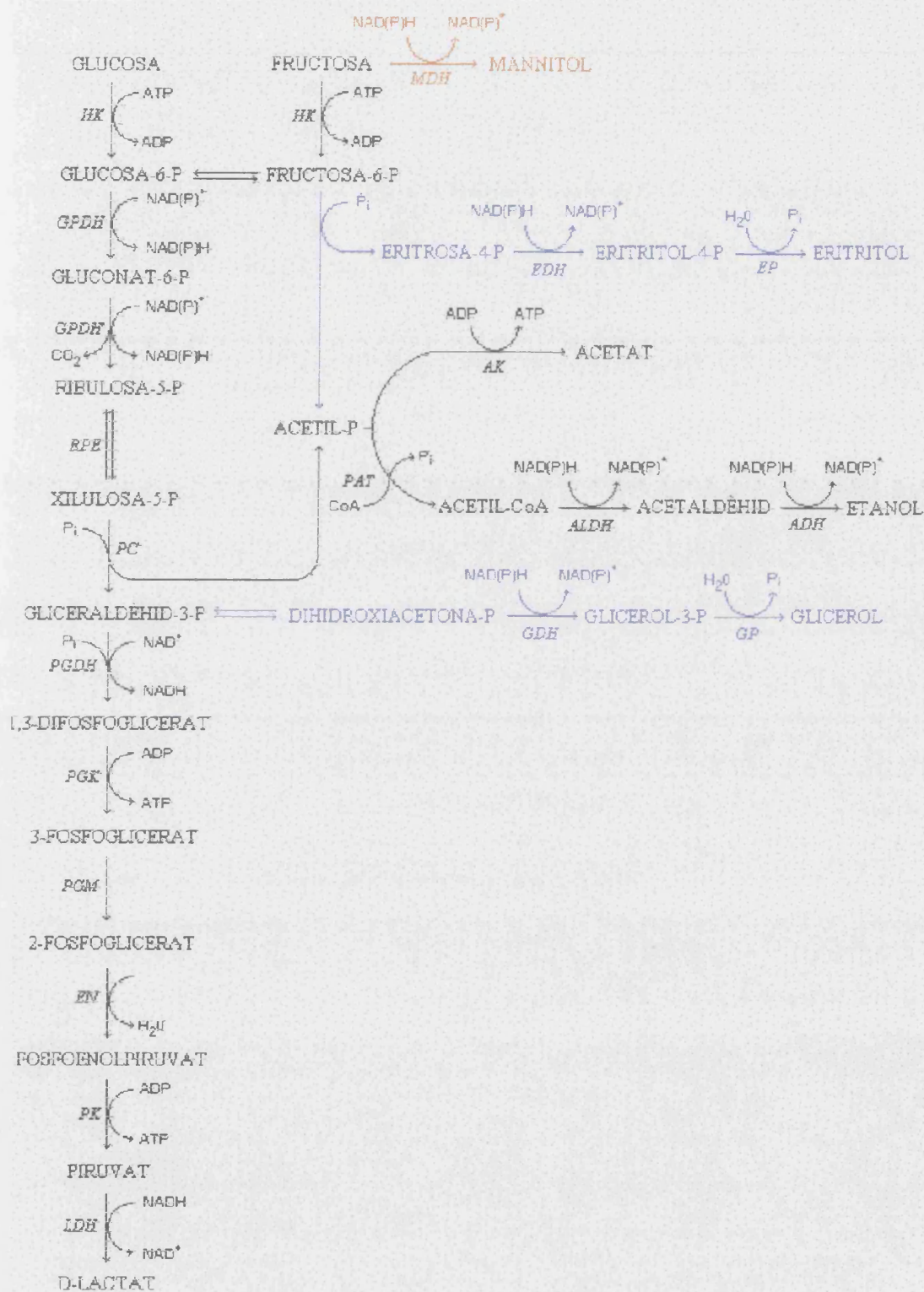


Figura 1.1. Negre, ruta heterolàctica de fermentació d'hexoses en bacteris làctics (*Oenococcus oeni*); roig, via de producció del mannitol; blau, vies de producció del glicerol i del eritritol (Veiga de Cunha *et al.*, 1992). Veure abreviatures.

Els bacteris heterofermentatius (com *O. oeni*) també poden utilitzar les pentoses presents al vi (fonamentalment arabinosa i ribosa) degradant-les per la via de les pentoses-fosfat. Així, qualsevol pentosa que es pugui convertir en xilulosa-5-P, s'incorpora en aquest punt a la via i continua la seva metabolització rendint els productes típics d'aquesta ruta. Per fer-ho, algunes s'han d'isomeritzar, epimeritzar i després fosforilar (figura 1.2). Òbviament, la fermentació d'aquestes pentoses no necessita d'una descarboxilació prèvia i, el que és més important, no li cal consumir dues molècules de NAD(P)^+ per fer-ho. Això permet que tot l'acetil-P es pugui destinar a la producció d'àcid acètic generant una molècula d'ATP (Lonvaud-Funel, 1991).

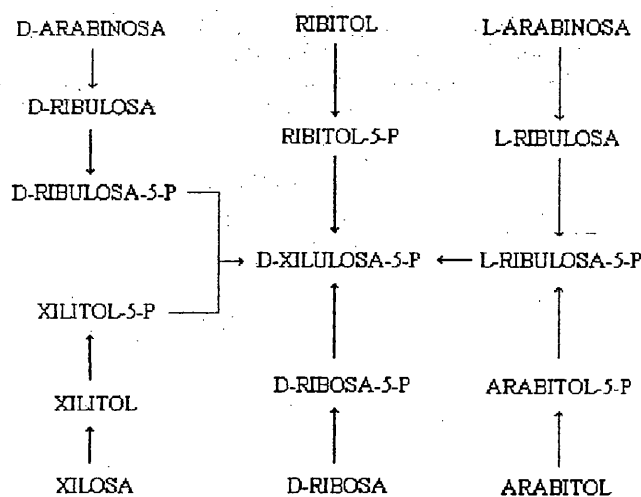


Figura 1.2. Esquema del metabolisme general de pentoses i pentitols als bacteris làctics. Cogan i Jordan (1994) amb modificacions.

La conseqüència és que la metabolització de les pentoses permet un rendiment energètic més alt que l'obtingut a partir de les hexoses.

Alguns *Lactobacillus*, entre ells *Lb. plantarum* o *Lb. casei*, disposen d'una tercera possibilitat de metabolització dels carbohidrats, l'heterofermentació facultativa (Roissart i Luquet, 1994). Aquests bacteris fermenten les hexoses a la via d'Embden-Meyerhoff-Parnas, on produeixen lactat sota condicions normals (acompanyat de xicotetes proporcions d'acetat, etanol i formiat en presència de quantitats limitants de glucosa). Les pentoses les metabolitzen a lactat i acetat amb una fosfoctolasa induïble per la seva presència.

En presència d'oxigen, els bacteris làctics que disposen d'un sistema actiu d'oxidases poden oxidar l' NADH (o NADPH) i mantenir l'equilibri redox a l'interior cel·lular.

D'aquesta manera tot l'acetil-P produït a la via de degradació d'hexoses es pot destinar a la producció d'energia *via* l'acetat quinasa i les cèl·lules obtenen un gran avantatge fisiològic que les permet créixer amb comoditat. Aquestes respostes dels bacteris làctics a l'oxigen foren analitzades per Condon (1987) qui va descriure tres sistemes enzimàtics capaços d'oxidar l'NADH present a les cèl·lules. Els dos primers són flavoproteïnes que catalitzen la reducció de l'O₂ a H₂O₂ i de l'O₂ a H₂O respectivament. L'NADH:H₂O₂ oxidasa és un enzim citoplàsmic prou inestable detectat a molts bacteris làctics (Anders *et al.*, 1970). L'NADH:H₂O oxidasa també es troba situada al citosol i està prou estesa entre els bacteris làctics, havent-se purificat en alguns d'ells, com en *Lactobacillus plantarum* i en *Leuconostoc mesenteroides* (Lucey i Condon, 1986; Condon, 1987). El tercer sistema, una NADH oxidasa depenent d'hematina és un sistema associat a la fracció membranosa descrit per *Streptococcus faecalis* i només detectat en unes poques soques de bacteris làctics (Condon, 1987).

Però el sistema de les NADH oxidases no és present o no és funcional a totes les soques de bacteris làctics conegudes. Lucey i Condon (1986) van descriure l'absència d'activitat NAD(P)H oxidasa en la soca *L. mesenteroides* ATCC 12291 que li impedia la formació d'àcid acètic (i consegüentment d'ATP) degut a que l'acetil-P havia de destinar-se a la regeneració d'NAD(P)H mitjançant la via de l'etanol. Això impedia a aquesta un millor creixement en presència d'oxigen. La necessitat de posseir un sistema NAD(P)H oxidasa com a requisit previ per poder produir ATP en condicions aeròbies va ser confirmat anys després amb la utilització de diferents soques d'aquesta mateixa espècie i d'altres pertanyents al gènere *Leuconostoc* (Nuraida *et al.*, 1992) així com a altres bacteris làctics (Warriner i Morris, 1995). Recentment, Sakamoto i Komagata (1996) han estudiat la distribució de l'NADH:H₂O₂ oxidasa en diferents gèneres de bacteris làctics (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* i *Enterococcus*). Els seus resultats avalen la hipòtesi general d'un millor creixement dels cultius en presència d'oxigen, sempre i quan presenten tant un sistema NADH oxidasa actiu com un altre de peroxidases que elimine l'H₂O₂ produït.

La metabolització dels carbohidrats presents al most o al vi pot lloc a una elevada producció d'àcid làctic (picadura làctica), amb conseqüències negatives pel vi (García *et al.*, 1992b). Un altra possible conseqüència negativa de l'excés de carbohidrats al vi és la producció de mannitol a partir de fructosa produïda pels bacteris heterofermentatius anomenada fermentació mannítica (Suárez i Íñigo, 1990). Aquests bacteris (entre ells *O.*

oeni) tenen l'enzim manitol deshidrogenasa què, transformant la fructosa a manitol, permet la regeneració dels cofactors reduïts a la via heterolàctica (Chalfan *et al.*, 1975). Així mateix, l'activitat de diferents espècies de *Leuconostoc* sobre els carbohidrats del vi pot donar lloc a la formació de pel·lícules de carbohidrats, com és el dextrà, a partir de sacarosa. Aquesta producció de dextrà, o greix del vi, proporciona al vi una aparença viscosa indesitjable. Així mateix, la metabolització de les pentoses pot donar lloc a la producció d'acètic, que si superen uns nivells moderats condueixen a l'avinagrament del vi.

1.3.2 Metabolisme de polialcohols

Als bacteris làctics presents al vi també s'han descrit rutes de metabolització dels polialcohols (fonamentalment glicerol). L'interès d'aquesta metabolització es centra per una banda en la producció d'acroleïna, mitjançant dues deshidratacions consecutives i per un altra, en la de pirúvic mitjançant la incorporació de la dihidroxiacetona-P al flux glicolític (figura 1.3) (Radler, 1975; Lafon-Lafourcade, 1983; García *et al.*, 1992b).

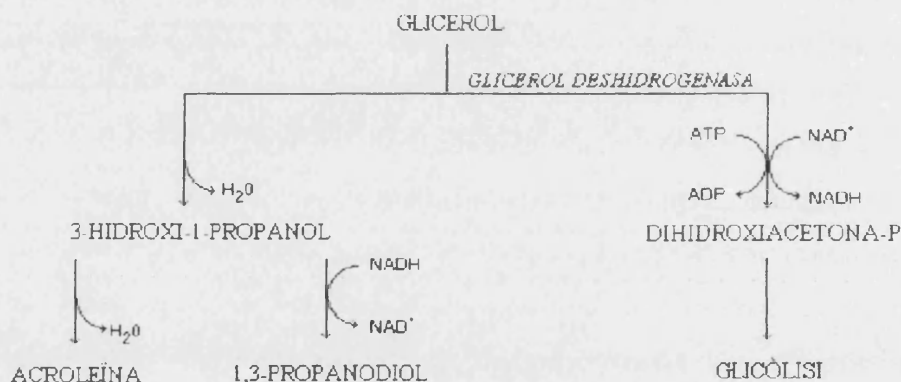


Figura 1.3. Esquema de la ruta de metabolització del glicerol als bacteris làctics. A partir de García *et al.* (1992b) amb modificacions.

L'acroleïna produïda a la ruta de l'aldehid-hidroxipropiònic (Amerine i Kunkee, 1968; Lafon-Lafourcade, 1983) pot aleshores reaccionar amb els polifenols presents al vi i produir un compost de sabor amarg amb evidents repercussions negatives (García *et al.*, 1992b).

1.3.3 Metabolisme de components nitrogenats (aminoàcids): formació d'amines biogèniques

El contingut en components nitrogenats es veu significativament alterat durant l'FMI pels bacteris làctics al vi (van Vuuren i Dieks, 1993). La descarboxilació d'alguns aminoàcids presents al vi, com són la histidina i la tirosina, pot donar lloc a la producció

d'amines biogèniques, respectivament histamina i tiramina (Vidal-Carou *et al.*, 1990a). La perillositat d'aquestes amines es deu a la seva toxicitat quan es presenten en elevades quantitats al vi (Vidal-Carou *et al.*, 1990b). La formació d'amines biogèniques ha estat descrita per a soques de *Pediococcus* spp. generalment, encara que també es troben referències d'*O. oeni* (Lonvaud-Funel i Joyeux, 1994) i *Lactobacillus hilgardii* (Farias *et al.*, 1993). La producció d'aquests composts sol estar associada a vins amb pH alt i concentracions d'SO₂ baixes (Vidal-Carou *et al.*, 1990b; García *et al.*, 1992b).

1.3.4 Metabolisme d'àcids orgànics

Si bé l'FML, aspecte central del nostre estudi, *in sensu stricto* és la bioconversió de l'àcid màlic en àcid làctic, la metabolització paral·lela d'altres àcids orgànics presents al vi no ha d'oblidar-se. Els àcids orgànics que *O. oeni* (i altres microorganismes) poden trobar al vi, o bé són els propis del vi o bé són un producte més del metabolisme de la microbiota allí existent. Els bacteris làctics, entre ells *O. oeni*, poden sintetitzar aquests àcids com a subproductes de les rutes degradatives de carbohidrats. Aquesta presència d'àcids orgànics i l'escassetat d'altres substrats fermentables com poden ser el carbohidrats, pot permetre en ocasions als bacteris (*O. oeni*) la seva degradació per obtenir l'energia i el poder reductor necessaris que suporten el seu desenvolupament i indirectament l'FML. Al vi, els àcids orgànics predominants són el màlic i el tartàric (Radler i Bröhl, 1984; van Vuuren i Dicks, 1993). L'estudi de l'àcid màlic resulta interessant per la seva degradació a làctic (FML), mentre que el del tartàric es centra en les conseqüències negatives de la seva degradació (volta tartàrica). Així mateix, al vi són presents en menors quantitats l'àcid fumàric i l'àcid cítric (Radler i Bröhl, 1984; van Vuuren i Dicks, 1993). L'àcid fumàric només es assimilat per alguns bacteris làctics (Cofran i Meyer, 1970; van Vuuren i Dicks, 1993). La metabolització de l'àcid cítric si que resulta interessant per la formació de compostos aromàtics a la seva ruta de degradació (Radler i Bröhl, 1984; Davis *et al.*, 1985b). A banda d'aquests àcids, al vi es poden trobar quantitats molt inferiors d'altres àcids, com l'oxalacètic o succínic que generalment no afecten de manera notable la seva estabilitat fisico-química (Lonvaud-Funel, 1991).

Àcid cítric

L'àcid cítric es troba present al vi en quantitats al voltant de 0.5 g L⁻¹ (Wibowo *et al.*, 1985; van Vuuren i Dicks, 1993). Alguns bacteris làctics, entre ells *O. oeni*, poden degradar l'àcid cítric per la ruta de la citrat liasa encara que no sempre poden viure

exclusivament amb ell com a única font d'energia (Cogan, 1987; Hugenholtz, 1993). Tanmateix, vàries observacions en la literatura asseguren que l'addició de citrat als medis sintètics basats en carbohidrats estimula el creixement dels bacteris làctics (Cogan, 1987).

Al cas d'*O. oeni*, l'explicació a aquest efecte positiu pot estar basada en les constants necessitats de regeneració dels cofactors reduïts durant la transformació de la glucosa-6-P en gluconat-6-P i d'aquest en xilulosa-5-P. *O. oeni* pot convertir el citrat en piruvat i per reducció a lactat. En aquesta última transformació s'oxida una molècula d'NADH que contribueix a equilibrar el potencial redox cel·lular. Però aquesta no és l'única contribució possible de l'àcid cítric al metabolisme cel·lular. Existeixen altres vies del seu catabolisme, amb implicacions organolèptiques, que possibiliten la producció d'acetoïna, 2,3-butanodiol i diacetil (Shimazu *et al.*, 1985; Revel *et al.*, 1989). Sota condicions favorables, amb una multiplicació bacteriana intensa, *O. oeni* dedica el piruvat provinent de la degradació de l'àcid cítric a la producció de lípids mentre l'acetil-P es dedica a la producció d'àcid acètic i d'ATP. Amb un desenvolupament bacterià més lent, el piruvat es dirigeix cap la via de producció d'acetoïna, diacetil i 2,3-butanodiol (components aromàtics). Això explica com, en vins on el desenvolupament bacterià i l'FML són lents, s'aprecien més intensament modificacions organolèptiques degudes a la generació de substàncies acetoíniques (Shimazu *et al.*, 1985; Lonvaud-Funel, 1991; Hugenholtz, 1993). La proporció en que aquests components són produïts depèn tant la soca de bacteri làctic utilitzada com del pH del vi (Zeeman *et al.*, 1982; García *et al.*, 1992b). En quantitats limitades, la degradació de l'àcid cítric resulta recomanable (Buckenhüskes, 1993). Tanmateix, una excessiva producció d'aquests compostos, aporta al vi un indesitjable aroma i fa que siga rebutjat pels consumidors (Davis *et al.*, 1986b). A més, es poden produir importants quantitats d'àcid acètic per activitat de la citrat-liasa, o bé a partir del piruvat (*via* acetil-CoA) amb el consegüent avinagrament del vi (Lafon-Lafourcade, 1983).

Àcid tartàric

L'àcid tartàric present al vi només és degradat per alguns bacteris làctics en vins a pH superior a 3.5 (van Vuuren i Dicks, 1993). La descomposició de l'àcid tartàric pels bacteris làctics (anomenada volta) té conseqüències negatives per al vi degut a l'excessiva producció d'àcid acètic i acetoïna (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983). D'una banda li dona un sabor avinagrat al vi, si els nivells d'àcid acètic sobrepassen els perceptibles pel gust, i d'un altra li confereix un aroma a *sauerkraut* no desitjable.

Normalment aquest problema no sol associar-se a l'FML efectuada amb soques seleccionades d'*O. oeni* perquè la no degradació de l'àcid tartàric sol ser un dels criteris enològics que han de satisfer els bacteris destinats al seu ús com a cultius iniciadors (Buckenhüskes, 1993). La capacitat per degradar l'àcid tartàric, deguda a l'enzim que el transforma en oxalacetat (Fornachon, 1964), només s'ha descrit per algunes soques de *Lb. plantarum* i *Lb. brevis* (Dicks i van Vuuren, 1990).

Àcid màlic

Els bacteris làctics presents al vi poden transformar l'àcid màlic en àcid làctic i CO_2 . Aquest procés, anomenat fermentació malolàctica, confereix al vi diferents propietats característiques que seran esmenades al llarg d'aquesta introducció (apartat 1.2.2). La metabolització d'aquest àcid, en presència de carbohidrats, pot incrementar la taxa de creixement dels bacteris làctics (*O. oeni*) (Pilone i Kunkee, 1972; 1976).

Els sistemes enzimàtics implicats en la desacidificació són diversos, coneixent-se fins ara tres rutes alternatives (figura 1.4). La primera és la ruta de la malat deshidrogenasa, només present en algunes soques de bacteris làctics capacitades per a la síntesi *de novo* d'aminoàcids, amb nul interès enològic per no desenvolupar-se als bacteris làctics presents al vi (Lautensach i Subden, 1987; García *et al.*, 1992b).

La segona de les rutes, descoberta per Korkes i Ochoa (1948) en *Lb. plantarum* presenta un enzim NAD^+ dependent amb l'àcid pirúvic com a únic intermediari. Schültz i Radler van purificar un tercer enzim en *Lb. plantarum* dependent d' NAD^+ i Mn^{2+} anomenat enzim malolàctic (EML) E.C. 1.1.1.38 capaç de descarboxilar directament l'àcid L-màlic a L-làctic i CO_2 (Battermann i Radler, 1991; García *et al.*, 1992b). Més informació relativa a la degradació de l'àcid màlic present al vi (FML) es troba a l'apartat 2 d'aquest capítol.

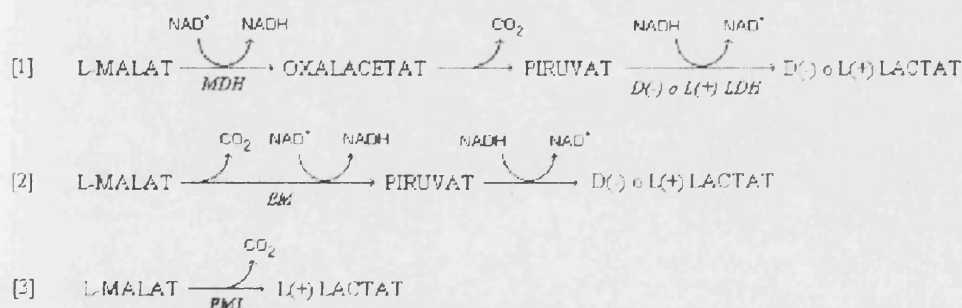


Figura 1.4. Esquema de les diferents rutes de metabolització de l'àcid L-màlic presents als bacteris làctics.

2 LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA

La fermentació malolàctica (FML) és el procés bacterià mitjançant el qual els bacteris làctics transformen l'àcid L-màlic present al vi en àcid L-làctic i CO₂ (Pilone i Kunkee, 1970; Liu i Gallander, 1983; Davis *et al.*, 1985b; Wibowo *et al.*, 1985; Lonvaud-Funel, 1994; Henick-Kling, 1995). Aquest procés es desenvolupa, de forma natural al vi, generalment després de la fermentació alcohòlica. A banda de la descarboxilació de l'àcid màlic, l'FML duu aparellada la transformació d'uns altres metabòlits presents al vi que possibiliten l'aparició de nous aromes (Davis *et al.*, 1985b; Henick-Kling, 1995; Sauvageot i Vivier, 1997) i aporta al vi una elevada, que no total, estabilització microbiana (Costello *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1985b; García i Pardo, 1988).

La fermentació és duta a terme pels bacteris làctics del vi, pertanyents als gèneres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* o *Weissella* (Davis *et al.*, 1985b; Dicks, 1995). L'espècie *O. oeni* (abans *L. oenos*) és la més freqüentment associada a l'FML desenvolupada en vins europeus (Lafon-Lafourcade, 1983; van Vuuren i Dicks, 1993) degut a la seva capacitat per créixer amb el baix pH que aquests presenten (Henick-Kling, 1986a; van Vuuren i Dicks, 1993).

Pasteur (1873) va estudiar la participació dels bacteris làctics en l'elaboració de vi. Anys més tard, Koch (1898) els va aïllar i va introduir el concepte d'FML (Kunkee, 1967). Möslinger (1901) va presentar una equació global on descrivia l'FML com la conversió de l'àcid màlic en àcid làctic + CO₂ i intentava esbrinar la relació estequiomètrica d'aquest procés. Anys més tard, Müller-Thurgau i Osterwallder (1913) publicaren una descripció dels bacteris làctics que podien efectuar l'FML juntament amb una clau taxonòmica per a la seva classificació. Crues (1943) va realitzar una revisió dels microorganismes implicats en l'elaboració del vi on va mencionar l'existència d'alguns bacteris que podien utilitzar l'àcid màlic. En aquests anys, Korke i Ochoa (1948) començaren la investigació de la bioquímica de l'FML.

Però va ser a la segona meitat del segle XX quan els estudis per afavorir i controlar l'FML van adquirir més importància. A banda de ser un mètode natural per reduir l'excessiva acidesa d'alguns vins, l'FML podia efectuar un procés final de modulació de característiques organolèptiques al vi que resultaven beneficioses (Henick-Kling, 1995). A més, el procés malolàctic reduïa en molt el perill de tenir enterboliment bacterià després de l'embotellament del vi (Iñigo *et al.*, 1969). L'interés investigador sobre múltiples aspectes de l'FML en vi continua, avui en dia, sent molt gran i així ho

confirma l'elevat i constant nombre d'articles científics publicats, alguns dels quals es citen al llarg d'aquesta tesi.

2.1 BENEFICIS DE L'FML PELS BACTERIS LÀCTICS

Malgrat que no és una veritable fermentació en la qual s'obtinga directament energia i poder reductor, la descarboxilació de l'àcid màlic a àcid làctic és beneficiosa pel creixement bacterià (Pilone i Kunkee, 1970). El primer benefici pels bacteris làctics (*O. oeni*) associat a l'FML és l'augment de pH que es provoca al vi quan un dels grups carboxílics de l'àcid màlic es transforma en CO₂ (Cox i Henick-Kling, 1990; Henick-Kling *et al.*, 1992). Una gran part del metabolisme bacterià en vi es centra en el manteniment del pH intern cel·lular. L'existència d'un ambient menys acídic al vi, permet els bacteris disposar del nutrients per créixer, que en cas contrari són destinats a aquest manteniment (Henick-Kling *et al.*, 1992).

Però més interessant resultaria la possibilitat de producció d'energia (ATP) durant la realització de l'FML. Aquesta hipòtesi fou suggerida per Cox i Henick-Kling (1989) qui proposaven una via quimiosmòtica de producció d'energia. Així, l'entrada del malat a la cèl·lula es produiria per transport actiu (uniport de malat) (Salema *et al.*, 1994). Llavors, el malat seria descarboxilat a lactat per l'enzim malolàctic. El lactat resultant seria cotransportat a l'exterior cel·lular junt a varis protons, la qual cosa permetria la generació d'un gradient de protons (Kunkee, 1991). Aquest gradient electroquímic de protons, produït pel simport estequiomètric de molècules de lactat i protons, pot ser utilitzat per una ATPasa per a la síntesi d'ATP (Loubiere *et al.*, 1992). Aquesta capacitat de generació d'ATP acoblada a l'FML es presenta a diferents soques de bacteris làctics, entre les que es troben algunes de *Lb. plantarum* (Olsen *et al.*, 1991; García *et al.*, 1992a) i d'*O. oeni* (Cox i Henick-Kling, 1990; Poolman *et al.*, 1991), i s'associa directament a la presència d'un sistema enzimàtic actiu capaç de descarboxilar l'àcid màlic. Aquesta activitat mesurada *in vivo* és altament dependent del pH. Tanmateix, l'efecte quantitatiu d'aquesta mínima generació d'energia sobre el desenvolupament d'*O. oeni* no és massa apreciable, especialment quant a banda d'àcid màlic no existeix un altra font d'energia (carbohidrats) present al medi (Cox i Henick-Kling, 1995).

2.2 BENEFICIS I PERJUDICIS DE L'FML PER LA PRODUCCIÓ DE VI

La fermentació malolàctica és un procés bacterià que es desenvolupa als vins de manera natural, generalment una vegada ha conclòs la fermentació alcohòlica. Alguns productors de vi deixen fer a la natura i el desenvolupament de l'FML es converteix en un fenomen deixat a l'atzar. Altres tracten d'induir-la perquè es desitja la seva contribució positiva, i fins i tot en ocasions es tracta d'inhibir perquè no es manifesten alguns aspectes negatius associats amb la seva realització. Entre els aspectes positius associats a l'FML, Kunkee (1974) i García i Pardo (1988) en van ressaltar tres.

El primer d'ells és la desacidificació biològica que sofreixen els vins quan l'àcid màlic és transformat en àcid làctic, rebaixant així la seva acidesa, i fent-los més agradables al paladar. Si observem la figura 1.5 veurem com la descarboxilació de l'àcid màlic, amb dos grups carboxils dona lloc a l'àcid làctic que només en presenta un (Peynaud, 1968).

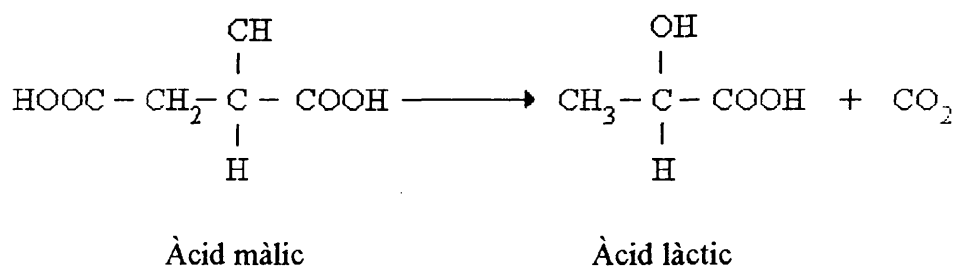


Figura 1.5. Esquema de la fermentació malolàctica.

Com a conseqüència de l'FML, el pH del vi pot augmentar 0.1-0.3 unitats (Bousbouras i Kunkee, 1971; Costello *et al.*, 1985). Aquest increment de pH es considera positiu sempre que el valor final no siga massa elevat. Un pH superior a 3.5 pot afavorir el creixement de bacteris no desitjables que donen lloc a un vi de baixa qualitat (Davis *et al.*, 1985b). Aquesta desacidificació també es pot desenvolupar amb l'afegiment de productes químics però això, ni estabilitza microbiològicament el vi ni òbviament permet la producció de components volàtils.

El segon aspecte beneficiós de l'FML el constitueix el creixement dels bacteris en si. Aquest desenvolupament es realitza a partir del consum dels nutrients residuals presents

al vi després de la fermentació alcohòlica. L'esgotament dels nutrients impedeix que siguin utilitzats per altres bacteris perjudicials que podrien créixer amb posterioritat i enterbolir el vi embotellat. Es pot dir que un vi que ha sofert l'FML és més estable que un altre on no s'ha desenvolupat, degut al consum dels nutrients presents al vi per part dels bacteris. Kunkee (1967) assegurava que després de la reducció dels nivells d'àcid màlic efectuada pels bacteris malolàctics, cap altre bacteri podia créixer al vi, arribant aquest a una estabilitat microbiana definitiva. Aquesta afirmació, en un principi acceptada per la comunitat científica, va ser posada en dubte anys més tard. El vi, una vegada realitzada l'FML, encara té prou nutrients per suportar el creixement bacterià de *Lactobacillus* spp. i *Pediococcus* spp. (Costello *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1985b). El creixement d'aquests bacteris perjudicials és en certa mesura d'esperar, si tenim en compte que l'augment del pH, una de les primeres conseqüències de l'FML, els afavoreix. És per això que els enòlegs recomanen realitzar processos d'ajustament de pH i SO₂ després de l'FML per finalitzar el procés de vinificació i impedir el creixement de cap altre bacteri. Amb tot, la realització de l'FML és un procés generalment considerat com a positiu per l'estabilització microbiològica que confereix al vi.

L'últim aspecte positiu que generalment es considera associat a l'FML és la producció de components volàtils que augmenten la càrrega organolèptica del vi. Els canvis sensorials al vi són molt subtils i és per això que molts dels experts només poden detectar-los quan són produïts en altes concentracions (Kunkee, 1974). Una anàlisi més exhaustiva d'aquests components volàtils requereix la utilització de tècniques cromatogràfiques més resolutives (GC) per determinar i quantificar els compostos. Valade i Laurent (1992) van comprovar com *O. oeni* a més de produir àcid làctic a partir dels sucres residuals, també podia sintetitzar acetaldehid, àcid acètic, etanol, diacetil, acetoïna i 2,3-butanodiol com a components aromàtics més característics. La producció d'aquests compostos pot beneficiar la càrrega organolèptica del vi sempre que els seus valors es troben dins d'uns marges acceptables (Amerine *et al.*, 1982; Davis *et al.*, 1985b). La producció d'aquests i uns altres components depèn en molt de la soca bacteriana utilitzada, perquè no totes les soques els produeixen, ni ho fan en la mateixa quantitat (Davis *et al.*, 1985b). Tot això ens ha de fer entendre l'FML com un procés bacterià complex al que, si bé és fonamental la descarboxilació del màlic, no cal menysprear les variacions quantitatives d'altres metabòlits.

En una revisió efectuada per Buckenhüskes (1993) s'afegeixen a aquests aspectes positius dos més, com són la disminució dels compostos nitrogenats així com la dels aldehids i cetones presents al vi. El consum del nitrogen afavoreix l'estabilitat del vi durant l'emmagatzemament, impedit el creixement d'altres microorganismes. D'altra banda, amb la disminució del contingut d'aldehids i cetones es possibilita una aplicació limitada de l'SO₂. Si al vi existeixen aldehids i cetones, reaccionen amb l'SO₂ i anul·len el seu efecte bactericida, requerint-se aleshores es seu l'afegiment en quantitats superiors.

A banda d'aquests processos, generalment considerats com a positius, al vi també es produeixen d'altres canvis gens beneficiosos, promoguts per la desacidificació que implica l'FML. Aquests canvis són perjudicials bé per donar lloc a un vi insípid o bé per permetre que es modifiquen de manera negativa els equilibris fisico-químics que allí existeixen. Entre els més freqüents podem citar la pèrdua de color que es produeix quan, com a conseqüència de l'augment de pH, l'SO₂ s'uneix als polifenols. Aquesta pujada de pH pot també afavorir el creixement d'espècies microbianes perjudicials (que normalment es desenvolupen a pH superior a 3.5) i si l'augment de pH és encara superior, i s'arriba a valors al voltant de 3.6, afavoreix la precipitació del bitartrat potàssic, es perd acidesa i es produeixen desequilibris fisico-químics que perjudiquen la qualitat final del vi (Davis *et al.*, 1985b).

2.3 PARÀMETRES QUE AFECTEN LA SUPERVIVÈNCIA DELS BACTERIS LÀCTICS (ESPECIALMENT *O. oeni*) I EL DESENVOLUPAMENT DE LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA AL VI

El desenvolupament de l'FML depèn tant del creixement dels bacteris làctics com de la seva activitat enzimàtica de descarboxilació. Els efectes fisico-químics i microbiològics sobre el procés són doncs múltiples, incidint cadascun d'ells a un nivell diferent.

2.3.1 pH

El creixement dels bacteris làctics al vi es troba fortament condicionat pel pH, sent això un factor crític i moltes vegades decisiu per permetre o no la realització de l'FML (Bousbouras i Kunkee, 1971; Beelman *et al.*, 1977; Britz i Tracey, 1990). Com era d'esperar, la influència del pH del vi sobre el desenvolupament de l'FML és múltiple. En

una primera instància, el pH influeix sobre la taxa de creixement dels bacteris presents al vi. Així, els experiments efectuats per diferents autors coincideixen en l'obtenció d'uns millors resultats de creixement d'*O. oeni* quan més alt és el pH inicial (Bousbouras i Kunkee, 1971; Liu i Gallander, 1983; Pimentel *et al.*, 1994). Cal però tenir en compte, que el pH no és un paràmetre físico-químic aïllat que es pugui modificar sense afectar altres factors també directament relacionats amb el desenvolupament de l'FML (Liu i Gallander, 1983). Els efectes inhibidors tant de la temperatura com de l'SO₂ o de l'etanol es veuen directament lligats als valors de pH al vi (Britz i Tracey, 1990), i a l'efecte produït per la combinació de tots aquests factors no són igualment sensibles totes les soques de bacteris làctics (Davis *et al.*, 1985b). Aquestes interaccions entre el pH i altres aspectes físico-químics també s'han estudiat en medis sintètics, on el creixement del bacteri no es veia condicionat per paràmetres incontrolats, confirmant-se els resultats prèviament obtinguts en vi (Salou *et al.*, 1991; Pimentel *et al.*, 1994). Un altra derivació de l'efecte del pH sobre el creixement dels bacteris làctics al vi es centra en la capacitat de generació d'ATP acoblada a la realització de l'FML (Cox i Henick-Kling, 1989). Així la força protomotriu generada quan el pH oscil·la entre 3.5 i 4.5 és màxima mentre que el sistema de generació d'energia es troba inhibit fora d'aquest rang (Cox i Henick-Kling, 1995). Aquest aspecte es tracta més extensament en l'apartat 1.2.3 dedicat a la generació d'energia associada a l'FML.

2.3.2 Etanol

L'etanol inhibeix el creixement dels bacteris làctics presents al vi (Britz i Tracey, 1990) interferint en els processos d'unió dels lípids que conformen la membrana (Capucho i San Romao, 1994). La capacitat que tinga una soca bacteriana per sobreviure a altes concentracions alcohòliques determinarà la seva capacitat d'èxit i marcarà el seu possible predomini sobre la resta de soques làctiques presents al vi. Així quan la quantitat d'alcohol al vi produïda per *Saccharomyces cerevisiae* supera els 10° alcohòlics diverses espècies de bacteris làctics poden sobreviure. Amb 12°, les soques d'*O. oeni* resistents solen ser les encarregades de la realització de l'FML. Si els nivells d'alcohol arriben als 14° només comptades soques dels gèneres *Oenococcus*, *Lactobacillus* i *Pediococcus* poden resistir i la fermentació es torna un procés difícil i quasi sempre es desenvolupa de manera parcial (Beelman *et al.*, 1977). Tal i com era d'esperar la tolerància a l'etanol no és un fet aïllat, sinó que es troba modulada pels valors de pH i temperatura al vi. Així, amb una T baixa (15 °C), l'addició d'etanol té resultats

dramàtics mentre que a 25 °C presenta un efecte estimulador (Britz i Tracey, 1990). Tanmateix, els resultats obtinguts per Lafon-Lafourcade (1983) i Pardo (1987) mostren el contrari. Així mateix, la supervivència dels cultius amb un pH baix i una elevada concentració d'etanol, decreix notablement (Lafon-Lafourcade, 1983; Wibowo *et al.*, 1985).

2.3.3 Concentració d'inòcul bacterià

El desenvolupament satisfactori de la fermentació malolàctica en vi també depèn de la quantitat inicial de bacteris làctics presents (Davis *et al.*, 1985b). Així, una població que inicialment es troba al vi en densitats cel·lulars baixes, en un període més o menys llarg, que sol durar setmanes o mesos, pot desenvolupar-se, arribar a nivells superiors (al voltant de 10^6 – 10^7 ufc mL⁻¹) i realitzar l'FML de manera satisfactòria. Un procediment alternatiu, la inoculació de elevades concentracions de cultius iniciadors al vi, permet abreujar aquests temps de fermentació (veure l'apartat 1.2.6.5). Aplicant aquesta tecnologia es possibilita la realització de l'FML en aquells vins que, per les seves condicions físico-químiques adverses no suportarien el creixement previ dels bacteris necessari per aconseguir els nivells poblacionals mínims exigits per realitzar l'FML de manera satisfactòria (Lafon-Lafourcade, 1970).

2.3.4 Concentració de nutrients (fonts de carboni i nitrogen)

El desenvolupament dels bacteris làctics al vi (*O. oeni*) depèn inicialment de la presència d'una font de carboni a partir de la qual puguen obtenir energia i poder reductor. Generalment aquesta font de carboni és un sucre o un àcid orgànic. Les quantitats en què es troben aquests nutrients al vi presenta una importància cabdal, perquè si són absents impediran el desenvolupament dels microorganismes mentre que si són abundants poden donar lloc a un creixement incontrolat i a la producció de diferents substàncies en concentracions indesitjables (Wibowo *et al.*, 1985; Tracey i van Rooyen, 1988; Salou *et al.*, 1994). Així, excessos en les quantitats inicials de carbohidrats poden afavorir la picadura làctica o la formació de mannitol. També és possible que els pèptids i proteïnes existents al vi puguen ser consumits pels bacteris làctics, però no hem trobat referències de que aquests produeixin peptidases o proteases extracel·lulars necessàries perquè això es done (Wibowo *et al.*, 1985).

2.3.5 Temperatura

Com era d'esperar, la temperatura és un altre dels factors físico-químics que influeixen notablement sobre el creixement dels bacteris làctics que efectuen l'FML al vi. Kunkee (1967) va establir unes condicions pel creixement òptim al vi dels cultius de *Leuconostoc* spp que oscil·laven entre 20°C i 25°C. Un augment en la temperatura de creixement fins als 32°C es traduïa en un creixement inicial dels cultius més ràpid durant el primer dia, però que després s'aturava. Beelman *et al.* (1977) trobaren una temperatura de creixement òptima al voltant dels 22°C. Britz i Tracey (1990) també assajaren l'efecte de la temperatura sobre el creixement de diferents soques d'*O. oeni* determinant què si bé totes les soques en estudi creixien a 15°C i a 25°C, els resultats eren força més positius a 25°C. Aquests resultats obtinguts en cultius creixent en vi foren confirmats després en experiments realitzats en medis sintètics, on els 25°C foren més efectius que temperatures més baixes (18°C) o més altes (32°C) (Pimentel *et al.*, 1994). Així, els valors òptims es situen al voltant dels 22–25 °C, tenint sempre en compte que els valors dependran molt de la soca malolàctica utilitzada en la vinificació.

2.3.6 Anhídrid sulfurós

Els llevats i els bacteris làctics són sensibles a la presència d'SO₂ al vi (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1978; Wibowo *et al.*, 1985). Aquesta sensibilitat s'ha aprofitat tradicionalment en enologia per controlar l'activitat dels microorganismes no desitjables, afegint-lo en quantitats adequades per restringir o inhibir el seu desenvolupament (Davis *et al.*, 1985b). Aquest SO₂ o bé es queda lliure o bé s'associa a alguns components del vi, fonamentalment als compostos carbonílics com l'acetaldehid, dificultant el creixement dels microorganismes. Quan l'SO₂ s'afegeix en una concentració total de 100-150 mg L⁻¹, combinat entre 20-100 mg L⁻¹ o lliure al voltant d'1-10 mg L⁻¹, s'impedeix el creixement (Beelman *et al.*, 1977; Wibowo *et al.*, 1985). Aquests valors fluctuen força en funció del valor del pH i del tipus de vi. Així, a pH baix, l'SO₂ es troba lliure al medi i la seva activitat antimicrobiana és més alta (Britz i Tracey, 1990). Tant és així que una lleugera disminució del pH, en només una o dues dècimes, es tradueix en un augment espectacular de la letalitat causada per l'SO₂ (Liu i Gallander, 1983; Wibowo *et al.*, 1985). Els efectes combinats de l'SO₂ i el pH, la temperatura o la concentració d'etanol sobre *O. oeni* al vi també han estat estudiats per Britz i Tracey (1990), qui van establir nivells d'inhibició superiors quan el pH o la temperatura eren baixos o bé els nivells d'alcohol augmentaven. Així, les quantitats

d'SO₂ necessàries per inhibir selectivament el desenvolupament dels bacteris làctics (*O. oeni*) al vi, s'han d'establir tenint en compte els valors d'aquests paràmetres fisico-químics. D'una manera similar, la preparació d'un cultiu iniciador de bacteris làctics per induir l'FML, hauria de preveure la seva capacitat per resistir la presència d'SO₂ al vi i desenvolupar mètodes que minimitzaren el seu efecte negatiu.

2.3.7 Composició de l'atmosfera de cultiu

La producció de vi sol desenvolupar-se en ambients generalment anaerobis. La generació de CO₂ durant la fermentació alcohòlica contribueix notablement a que així siga. Tanmateix, *O. oeni*, principal bacteri làctic responsable de l'FML, no és un bacteri estrictament anaerobi i pot desenvolupar-se al vi encara que l'oxigen es trobe present. Fins i tot, alguns investigadors diuen que la presència de xicotetes quantitats d'oxigen dissolt al medi de cultiu poden afavorir el seu creixement (Milisavljenic, 1964). Però, si la concentració d'oxigen al vi augmenta, es pot inhibir el creixement d'*O. oeni* i pel contrari afavorir la presència d'altres bacteris de metabolisme aeròbic també presents al vi com són els acètics (Drysdale i Fleet, 1988).

2.3.8 Bacteriòfags

La presència de bacteriòfags pot disminuir molt la qualitat d'un vi si es desenvolupa un atac víric sobre els bacteris làctics responsables de l'FML (generalment *O. oeni*) (Sozzi *et al.*, 1982; Diviès i Cavin, 1985). Encara que els problemes associats a la presència de bacteriòfags atacants de bacteris làctics als vins no tenen conseqüències negatives tant espectaculars com els observats a la indústria làctia (Huggins, 1984) si que són els responsables d'aturades o enlentiments en l'FML (Henick-Kling *et al.*, 1986). Així mateix, la presència de bacteriòfags en la producció de cultius iniciadors d'*O. oeni* per a promoure l'FML pot malmetre el procés (Arendt *et al.*, 1991). Les conseqüències negatives de la presència de bacteriòfags en enologia han estat comprovades anteriorment a Suïssa (Sozzi *et al.*, 1982; Sozzi i Mignot, 1988) i a Austràlia (Davis *et al.*, 1985a; Henick-Kling *et al.*, 1986). L'efecte dels bacteriòfags sobre la fermentació és molt variable i depèn de la proporció bacteriòfags/bacteris, de tal manera que si aquesta relació és superior a 1 al final de la fermentació alcohòlica, sol produir-se una inhibició total de l'FML des dels primers moments del seu desenvolupament. Si la proporció és favorable als bacteris làctics, l'FML hauria de desenvolupar-se de forma retardada, perquè els bacteriòfags anirien progressivament

infectant aquelles cèl·lules que foren sensibles. Tanmateix, les dades experimentals obtingudes al nostre laboratori mostren com les taxes d'infecció vírica no suporten el fet d'una explosió vírica típica als bacteris d'ambients làctics. Més bé al contrari, el nombre de bacteriòfags lliures detectats al vi disminueix dràsticament (en un ordre de magnitud) en cada nova infecció. Aquest fet és explicable per l'estrés que causa l'ambient fisicoquímic del vi sobre els bacteriòfags. D'aquesta manera s'han observat elevades taxes de letalitat vírica a pH inferiors a 3.6, que dificulten en molt la infecció dels bacteris làctics (Esparcia, comunicació personal). Amb tot, en presència de bacteriòfags, l'FML es desenvoluparà únicament per aquelles cèl·lules insensibles als bacteriòfags, fent més lent el ja de per si costós procés. Per fer-ho necessitaran abans arribar a nivells poblacionals mínims i això requerirà un temps excessiu.

El control i la prevenció de la presència fàgica als vins hauria de ser un fet habitual en enologia, ja que si bé és cert que la presència de bacteriòfags d'*O. oeni* en vi en fase lítica és relativament escassa, la presència d'aquests en forma de profag (fase lisogènica) es molt freqüent al genoma bacterià (Cavin *et al.*, 1991). Al voltant del 60% de les soques estudiades per Arendt *et al.* (1991) contenen bacteriòfags integrats al seu genoma. Per controlar i evitar les contaminacions per bacteriòfags, resulta aconsellable la rotació de cultius per evitar la transmissió vírica així com la inoculació de soques bacterianes prèviament assajades al laboratori i seleccionades per ser insensibles a l'atac (Sozzi *et al.*, 1982). Encara així, periòdicament caldria realitzar preparacions al microscopi electrònic de mostres dels vins i comprovar la presència de bacteriòfags quan els desenvolupaments de les fermentacions són massa lents (Sozzi *et al.*, 1982).

2.4 INDUCCIÓ O CONTROL DE LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA

Els beneficis o perjudicis associats al desenvolupament de l'FML han estat revisats profusament durant l'última dècada (Davis *et al.*, 1985b; Wibowo *et al.*, 1985; García *et al.*, 1992b). Si en una cosa coincideixen tots els autors, és en la necessitat de controlar el procés, bé siga promovent-lo, bé siga inhibint-lo. Quan el desenvolupament de l'FML es preveu que vaja associat amb el creixement de microorganismes indesitjables, o no siga interessant l'eliminació de l'acidesa del vi, els esforços es centren en la inhibició del procés. Això es pot aconseguir bé restringint el creixement dels microorganismes allí presents, bé eliminant-los esterilitzant el vi (Davis *et al.*, 1985b). Amb aquest propòsit

s'han intentat molts tractaments amb diferents graus d'efectivitat i utilització. Uns estan basats en tractaments físics com són la realització de la clarificació tan aviat com siga possible, l'emmagatzemament a baixes temperatures (per sota els 18°C), el manteniment del vi produït en dipòsits asèptics o l'esterilització (filtració esterilitzant o pasteurització) (Davis *et al.*, 1985b). Altres estan basats en l'afegiment de productes químics per esterilitzar el vi o almenys dificultar el creixement microbià: àcid sòrbic, heptil esters, *p*-hidroxi-benzoat (Davis *et al.*, 1985b), àcid fumàric (Kunkee, 1974) o àcid decanoic (Edwards i Beelman, 1987). Entre tots cal destacar, pel seu alt grau d'utilització, l'addició d'anhidrid sulfurós en quantitats per damunt de 30 mg L⁻¹ (Kunkee, 1974), 50 mg L⁻¹ (Davis *et al.*, 1985b) o fins i tot 100-200 mg L⁻¹ (Kunkee, 1967).

Però generalment, resulta interessant promoure l'FML al vi i obtenir els avantatges que això ofereix. Les pràctiques enològiques aconsellades a la literatura per promoure la realització de l'FML es centren en la promoció del creixement de la microbiota autòctona i en la inoculació de soques seleccionades. Així mateix, resulta interessant la realització de l'FML utilitzant tecnologies alternatives a la tradicional, que eviten la necessitat de créixer els bacteris *in situ* abans de cada fermentació. En aquesta introducció farem un repàs d'aquestes tècniques centrant-nos en aquelles que més ens interessin i sobre les quals hem desenvolupat diferents experiments exposats al llarg d'aquesta tesi. Moltes d'aquestes tecnologies no són en absolut excloents sinó més bé complementàries, pel què cal pensar en una conjunció de totes elles per obtenir uns resultats finals satisfactoris.

2.4.1 Selecció de les condicions òptimes per potenciar la microbiota malolàctica autòctona

Una de les formes de potenciar l'FML és controlar les condicions fisico-químiques dels bacteris làctic responsables del seu desenvolupament. Si els microorganismes troben al vi un microhàbitat adequat a les seves necessitats bàsiques què no impedeix el seu creixement, aquest es produirà i de manera paral·lela s'aconseguirà la desacidificació. Aquestes condicions òptimes per al desenvolupament de l'FML es centren en la necessitat de controlar la quantitat d'SO₂ al vi (agent antimicrobià afegit per inhibir el creixement de microorganismes indesitjables) així com en el manteniment d'un pH entre 3.2 i 3.5 i una temperatura al voltant de 22-25°C (ambdós òptims pel desenvolupament d'*O. oeni* sota condicions enològiques). D'aquesta manera, els nutrients alliberats al

medi amb l'autòlisi dels llevats són aprofitats per aquest bacteri per créixer. La presència d'elevades quantitats de CO₂ al vi, que afavoreixen la seva anaerobiosi, i el manteniment de nivells alcohòlics relativament baixos (entre 10 i 12° alcohòlics), que eviten el seu efecte inhibidor, ajudaran a la realització del procés (Davis *et al.*, 1985b; Lafon-Lafourcade, 1986; García i Pardo, 1988). Òbviament, algunes d'aquestes condicions vindran fixades pels tipus de vins utilitzats o per les característiques intrínseques de les soques bacterianes adaptades a créixer en ells i no serà possible modificar-les amb posterioritat.

2.4.2 Inoculació de vins amb soques provinents de vins fent l'FML

Si es disposa de un cultiu bacterià creixent en vi i realitzant activament l'FML, resulta factible la seva reinoculació en vi fresc on els microorganismes es reproduïxen i continuen realitzant la desacidificació. Aquesta pràctica requereix la realització d'inoculacions d'entre el 15-50 % (v/v) (Kunkee, 1967) o bé el recollir les cèl·lules del vi actiu mitjançant centrifugació o filtració per tal d'aconseguir biomasses suficients com per assegurar un procés satisfactori. La necessitat d'utilitzar grans volums de vi per realitzar les reinoculacions depèn molt del tipus de vi i soca, ja que nosaltres, a nivell de laboratori, hem aconseguit la realització de l'FML mitjançant reinoculacions periòdiques d'*O. oeni* amb transvasament d'entre 1-10% (v/v) de vi (Pardo, 1987). Aquest tipus de pràctica enològica de manteniment dels bacteris per reinoculacions periòdiques pot presentar el problema de la contaminació per bacteriòfags, evitable amb una rotació de cultius (Davis *et al.*, 1985b).

2.4.3 Inoculació amb cultius purs de soques comercials o seleccionades

La pràctica més estesa avui en dia consisteix en la inoculació del vi amb una soca malolàctica prèviament seleccionada, assajada i amb unes propietats enològiques comprovades i constantment mantingudes. Amb això, es pot induir l'FML en vins amb unes condicions físico-químiques adverses, on la microbiota autòctona no ha pogut desenvolupar-se, o en aquells on es desitja tenir un control més acurat del procés. Amb la utilització de cultius iniciadors, *starters*, es pot aconseguir un millor control del procés en poder escollir el moment òptim de fermentació i una reducció en el temps de la realització, alhora que s'afavoreix la producció de vins amb unes característiques sensorials desitjades. La impossibilitat de trobar una soca polivalent en totes les condicions i tipus de vi requereix la selecció de diferents soques bacterianes

(fonamentalment *O. oeni*). Cada soca presenta unes característiques determinades que la fan útil en uns vins, generalment del mateix tipus que en aquell on fou aïllada. Aquest aspecte ha centrat en gran manera la nostra dedicació al llarg d'aquesta tesi (veure el capítol 2, dedicat a l'aïllament, caracterització i selecció de noves soques d'*O. oeni*).

2.4.4 Tecnologies alternatives per realitzar la fermentació malolàctica

L'FML als vins és una reacció de desenvolupament lent i imprevisible degut a les dificultats que tenen les cèl·lules per créixer i arribar a biomasses elevades. Així doncs, un dels inconvenients més importants a nivell tecnològic, per induir l'FML en vi, consisteix en la necessitat de disposar d'un elevat nombre de cèl·lules actives per realitzar la bioconversió de l'àcid L-màlic en àcid L-làctic i CO₂. Resulta doncs, altament desitjable desenvolupar tecnologies alternatives a la fermentació tradicional que disminueixen el temps necessari per a la seva realització i permeten un millor control sobre el procés. Això permet la inducció de l'FML en el moment desitjat així com l'aturament de la reacció en el moment més convenient, per deixar al vi en els nivells d'àcid L-màlic desitjats.

Una de les alternatives existents per desenvolupar l'FML d'una manera ràpida i segura consisteix en la inoculació d'elevades quantitats de cèl·lules al vi que realitzen el procés. Les possibles aproximacions experimentals es centren bé en la inoculació d'elevades biomasses cel·lulars lliures al vi o bé en la seva immobilització sobre diferents suports inerts. Les experiències efectuades per Lafon-Lafourcade (1970; 1985) amb cèl·lules lliures van demostrar com l'FML es podia realitzar al vi amb la utilització d'elevades quantitats inicials de biomassa d'*O. oeni*. Uns anys més tard, Wibowo *et al.* (1988) van obtenir una ràpida desacidificació dels vins assajats quan els inoculaven amb densitats bacterianes superiors a 10⁶ ufc mL⁻¹. D'aquesta manera, la biomassa actua com si fora una preparació enzimàtica altament concentrada i s'eviten els problemes d'haver de créixer primer els cultius en vi per a després obtenir la degradació del malat (Naouri *et al.*, 1990). Gao i Fleet (1994) van assajar la degradació d'àcid màlic per elevades concentracions d'*O. oeni* (10⁹-10¹⁰ ufc mL⁻¹) aconseguint valors de l'ordre del 95-100% en trenta minuts a partir de 3.5 g L⁻¹ inicials. Tanmateix, aquest tipus d'inoculació presenta alguns problemes associats que fan que la seva realització no siga un procés fàcil. Clementi i Vinti (1983) van determinar que el pH era un factor limitant per aconseguir resultats satisfactoris amb *O. oeni*, per la qual cosa no tots els vins són

susceptibles de ser inoculats amb la mateixa soca si es volen aconseguir resultats positius. El pH és un factor que influeix directament sobre l'enzim malolàctic condicionant la seva taxa d'activitat. A més cal afegir els problemes d'obtenció d'elevades quantitats de biomassa necessària per a inocular els vins i la vigilància exhaustiva dels pre-cultius per impedir la inoculació de microorganismes contaminants, inherents a qualsevol pràctica amb aquest microorganisme. Així mateix, cal dir que la realització de l'FML sota aquestes condicions impedeix la producció de modificacions organolèptiques al vi associades al metabolisme bacterià en fase de creixement (Edwards i Beelman, 1989; Chagnaud *et al.*, 1990).

Un altra possibilitat consisteix en la realització de l'FML amb un elevat nombre de bacteris làctics immobilitzats. L'augment de la productivitat, la reutilització de la maquinària enzimàtica i els avantatges als processos de separació han fet que aquesta possibilitat haja estat explotada anteriorment amb la utilització de diferents bacteris làctics per pre-fermentar llet (Cavin *et al.*, 1986), obtenir cultius iniciadors immobilitzats (Kearney *et al.*, 1990; Morin *et al.*, 1992) o produir àcid làctic (Richter *et al.*, 1991). La possible utilització de bacteris làctics immobilitzats per realitzar l'FML ha estat revisada per nombrosos autors (Diviès *et al.*, 1994; Champagne, 1996). Alguns assaigs efectuats a nivell de laboratori i de planta pilot amb diferents bacteris làctics han ofert resultats prometedors utilitzant diferents tècniques d'immobilització (agregació, adhesió, encapsulació o atrapament). Els millors resultats s'han aconseguit per atrapament en gels d'alginat (Spettoli *et al.*, 1984; Cuenat i Villetaz, 1984; Naouri *et al.*, 1991) o κ -carragenat (McCord i Ryu, 1985; Crapisi *et al.*, 1987a i b), productes no tòxics per a les cèl·lules i autoritzats per a la producció d'aliments. Spettoli *et al.* (1987) aconseguiren mantenir un biorreactor en operació continua fins a trenta sis dies degradant al voltant d'un 50% de l'àcid màlic present en un medi sintètic, mentre que Cuenat i Villetaz (1984) pogueren instal·lar un sistema en continu que els permetia desacidificar parcialment fins a 40 L de vi en 10 hores en columnes de 10 L. Els resultats obtinguts amb cèl·lules immobilitzades en κ -carragenat mostren comportaments similars tant en medi sintètic (McCord i Ryu, 1985) com als assaigs efectuats en vi (Crapisi *et al.*, 1987b). Experiments preliminars efectuats en gels de poliacrilamida no oferiren resultats destacats quan la degradació de l'àcid màlic fou assajada en medis sintètics (Rossi i Clementi, 1984). Com la utilització de la poliacrilamida no oferia massa avantatges respecte a les cèl·lules lliures, fou oblidada i

no hem trobat referències bibliogràfiques posteriors. Un altra possibilitat assajada fou l'adsorció de cèl·lules d'*O. oeni* a substrats naturals, com estelles de roure, amb resultats prometedors que permetien conversions de l'ordre de dues a tres vegades superiors a les obtingudes amb cèl·lules lliures (Janssen *et al.*, 1993). Totes aquestes tècniques, que impliquen l'adsorció o l'atrapament de les cèl·lules en una matriu, fan que la relació entre el volum del suport i la biomassa activa siga alt. D'altra banda, la utilització de microcàpsules limita la transferència de nutrients i metabòlits generant gradients de biomassa, a sovint amb cèl·lules mortes o inactives al centre. Aquests fets constitueixen un inconvenient per a la seva utilització en fermentacions alcohòliques.

O'Reilly i Scott (1993) van assajar un nou tipus de material, esponges de cel·lulosa, que es poden comprar en làmines de 0.8 cm de gruix (BPS Separations, Anglaterra), retallar a la mida desitjada i addicionar de grups funcionals abans d'esterilitzar que eviten aquests problemes (O'Reilly i Scott, 1995; Scott *et al.*, 1995). Els resultats obtinguts en fermentacions de sidra foren satisfactoris tant per a immobilitzar llevats com bacteris làctics però fins ara no s'han utilitzat en enologia (Scott i O'Reilly, 1996).

Altra manera d'intentar reduir el temps necessari per efectuar l'FML és la realització d'aquesta en un sistema de biorreactors funcionant en continu. Naouri *et al.* (1991) van assajar la realització de l'FML en continu amb cèl·lules immobilitzades, detectant aturades en el sistema degudes a l'esgotament de NAD^+ i Mn^{2+} (necessaris per l'activitat de l'enzim malolàctic). Problemes similars foren detectats a tots els sistemes on s'han intentat implementar continus, be siga amb enzims (Formisyn *et al.*, 1997) bé amb cèl·lules immobilitzades (veure aquest capítol). Una possibilitat alternativa consisteix en tenir els cultius de cèl·lules lliures d'*O. oeni*, en permanent creixement, dins d'un biorreactor amb un flux continu de vi d'entrada i eixida. Aquest sistema permetria una producció contínua de vi amb l'FML realitzada i evitaria els problemes associats a altres aproximacions experimentals abans esmentades.

2.5 PRODUCCIÓ I CONSERVACIÓ DE CULTIUS D'*Oenococcus oeni* PER INDUIR LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA EN VI

La inoculació directa en vi d'un cultiu d'*O. oeni* crescut en un medi sintètic generalment és seguida per un fort i ràpid decreixement de la seva població. Després d'una dràstica reducció en el nombre de cèl·lules vives, aquelles que poden sobreviure

necessiten un llarg període d'adaptació, a vegades de varies setmanes, per començar a créixer i només aleshores, quan la població es troba al voltant de 10^6 ufc mL^{-1} s'observa un desenvolupament apreciable l'FML (Beelman, 1982). Henick-Kling (1988) estima aquest temps necessari per superar els inconvenients que es troben les cèl·lules al vi en 40 o 60 dies. Així doncs, els objectius de recerca en aquests aspectes es centren en dos punts: la producció d'elevades quantitats de biomassa i en l'adaptació de les cèl·lules al vi. Aquests objectius es troben a sovint, íntimament lligats.

Pel que respecta únicament a l'obtenció de biomassa, cal anomenar la utilització de medis basats en diferents suc de fruita suplementats amb diferents peptones i extractes de llevat comercials. Champagne *et al.* (1989) assajaren la producció de biomassa amb suc de poma amb resultats esperançadors. Hayman i Monk (1982) utilitzaren suc de tomàquet amb la mateixa finalitat mentre que generalment és el suc de raïm el preferit per la seva similitud amb el vi (Henick-Kling, 1986b). Una de les maneres possibles d'optimitzar els processos de producció de cultius iniciadors consisteix en controlar el pH del medi on creixen els microorganismes. Durant el procés de fermentació, els bacteris làctics fermenten els carbohidrats i produeixen diferents àcids orgànics, principalment àcid làctic. Això fa que el pH del medi baixi i inhibeixi el creixement dels bacteris. Aquest fet ja s'ha descrit anteriorment per a cultius d'*O. oeni* (Davis *et al.*, 1986a; Champagne *et al.*, 1989). El control sobre els valors de pH de un medi de fermentació permet augmentar el rendiment de biomassa d'aquests tal i com van descriure Beal *et al.* (1989) per a *Lactococcus thermophilus* i *Lactobacillus bulgaricus*. Aquest benefici també va ser descrit al controlar el pH de creixement d'*O. oeni* en un medi basat en suc de poma amb afegiment de diferents suplementos nutricionals (Champagne *et al.*, 1989). Els estudis efectuats per Salou *et al.* (1991) confirmen de nou aquests beneficis i mostren com la realització de les fermentacions sota control de pH permet augmentar tant la taxa d'utilització dels substrats com la biomassa final resultant.

Com ja referíem abans, tant important com la producció és l'adaptació de les soques al vi. Eliminar o reduir el temps d'aquesta adaptació, durant el qual no es realitza l'FML, ha estat des de fa molts anys, l'objectiu de diferents investigadors. Malgrat això les condicions necessàries per realitzar aquesta adaptació no són les mateixes per a totes les soques que provenen de diferents vins i de diferents indrets (Wibowo *et al.*, 1985). Des de finals de la dècada dels vuitanta, apareixen a la literatura diferents punts de vista que tracten d'aconseguir per vies més o menys semblants els mateixos objectius.

El primer dels mètodes, consistent en el creixement dels bacteris en medis de pre-cultiu involucra la transferència successiva dels cultius des de medis nutricionals sintètics amb pH al voltant de 5.5 fins a vins suplementats amb most a pH entre 3.5 i 4.0. Una vegada crescuts en aquests medis són inoculats en vi amb més o menys efectivitat (Hayman i Monk, 1982; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1988; Wibowo *et al.*, 1985; Beelman, 1982; Henick-Kling, 1988). Els medis freqüentment recomanats estan basats en most diluït amb H₂O o vi al que se li afegeix extracte de llevat i Tween-80 (Henick-Kling, 1986b). El pH es sol ajustar a 4.5 (intermedi entre el pH del vi i l'idoni per al creixement en medis sintètics). La temperatura recomanada també és intermèdia, entre la pròpia de la producció del vi i l'òptima per al creixement, sent generalment aconsellats valors entre 25 i 30°C (Henick-Kling, 1986b). Un altra aproximació, emprada per Hayman i Monk (1982) consisteix en el creixement d'*O. oeni* en un medi de cultiu amb glucosa i suc de tomàquet per obtenir biomassa i després en la seva reinoculació en medis amb extracte de llevat i most amb quantitats creixents de vi (des de 0 fins a 100%). Amb aquestes experiències es va determinar que el creixement d'alguns cultius d'*O. oeni* en vi es veia estimulat quan al medi de pre-cultiu s'afegia un 40-80% de vi, demostrant així que existia un mecanisme desconegut d'adaptació al medi. Aquesta mateixa idea fou també exposada per Diviès i Cavin (1985) qui recomanaven la utilització de medis de pre-cultiu a pH 3.2 amb un 10% (v/v) d'etanol per aconseguir adaptacions al vi acceptables.

Una segon opció consisteix en l'adaptació progressiva del cultius a vins de pH cada vegada més baix que faciliten posteriorment la seva inoculació en vi (Pardo, 1987). La inoculació d'una soca en vi de pH baix produeix una elevada mortalitat inicial. Quan setmanes o mesos després, algunes cèl·lules sobreviuen i aconsegueixen desenvolupar-se, la seva reinoculació en vi fresc ofereix taxes de supervivència superiors a les de la primera resembra.

Finalment, cal citar una tercera aproximació experimental consistent en el sotmetiment de les cèl·lules a condicions d'estrés que faciliten el seu posterior desenvolupament en vi. El mecanisme d'adaptació pot basar-se en l'aconseguitment progressiu de nivells més alts de tolerància a l'etanol o al SO₂ mitjançant la síntesi de proteïnes d'estrés tèrmic (hsp) localitzades en la fracció membranosa durant el tractament d'estrés que suposa posar en contacte les cèl·lules amb el vi (Guzzo *et al.*, 1994). Aquestes proteïnes, sobreexpressades en condicions d'estrés, podrien estar involucrades en el manteniment de la integritat de la membrana, constituint aquest fet una resposta adaptativa a l'estrés (Guzzo *et al.*, 1997). El mecanisme d'adaptació i creixement sota condicions d'estrés al vi és un procés encara avui desconegut (Guzzo *et al.*, 1997; Jospin *et al.*, 1997) i variable (Salotra *et al.*, 1995; Garbay i

Lonvaud-Funel, 1996), que depèn molt de la soca utilitzada. El resultat obtingut per l'aplicació de tractaments d'estrés, per a un grup seleccionat de soques, ofereix avantatges tecnològics pel que respecta a l'adaptació dels cultius. Aquest tipus de procediment per l'adaptació de les soques d'*O. oeni* al vi ja fou descrit per Fourcassie i Maujean (1990) qui recomanaven sotmetre les cèl·lules a un xoc tèrmic previ a la seva inoculació per augmentar tant la taxa de creixement com la de degradació de l'àcid màlic present al vi. Això requereix l'obtenció de soques d'*O. oeni* que presenten aquestes proteïnes específiques que confereixen resistència als factors adversos presents al vi.

Altres investigadores observaren millores en l'adaptació dels bacteris realitzant una pre-incubació de les cèl·lules en medis tamponats (Beelman, 1982) o solucions preparades amb most (Caillet i Vayssier, 1984; Naouri *et al.*, 1989) abans de posar-les en contacte amb el vi.

A banda de la producció i adaptació de les soques, i a sovint de manera paral·lela, resulta interessant la conservació de les soques malolàctiques. Com ja hem dit abans, una manera d'induir l'FML és la inoculació directa del vi amb un cultiu creixent ja en vi (Kunkee *et al.*, 1964). Això requereix tenir sempre cultius en creixement actiu, la qual cosa suposa inconvenients tècnics i econòmics. Conservant els cultius per diferents mètodes, tradicionalment per congelació o liofilització, i inoculant-los en vi s'eviten aquests problemes (Beelman, 1982; Wibowo *et al.*, 1988). Però no totes les soques presenten el mateix comportament després d'haver-les sotmes a un procés de conservació. Mentre alguns autors refereixen resultats satisfactoris en la inoculació dels microorganismes (congelats o liofilitzats) directament al vi (Beelman, 1982; Edwards i Beelman, 1989), la majoria dels estudis apunten a la necessitat de sotmetre les cèl·lules a un procés de readaptació previ al seu contacte amb el vi (Lafon-Lafourcade, 1975; Joyeux i Lonvaud-Funel, 1985).

L'interés per mantenir la viabilitat dels bacteris làctics durant els processos de conservació no és exclusiu per als cultius d'*O. oeni*. Kearney *et al.* (1990) van descriure un augment en l'eficàcia de liofilització de *Lactobacillus plantarum* quan les cèl·lules eren prèviament immobilitzades en alginat de calci degut a l'efecte protector d'aquest durant el procés de rehidratació. Aquest efecte protector de l'alginat de calci també ha estat demostrat per a suspensions de *Lactococcus lactis* mantingudes a 4°C (Champagne *et al.*, 1994). Els estudis realitzats amb suspensions cel·lulars liofilitzades mostren la major eficàcia dels poliols (β -glicerofosfat i sobretot adonitol) front als polímers (PEG) i aminoàcids (àcid glutàmic) en la seva actuació com a crioprotectors de diferents bacteris làctics (Valdez *et al.*, 1985).

OBJECTIUS

1. Aïllar i identificar noves soques d'*Oenococcus oeni* (abans *Leuconostoc oenos*) per a la seva aplicació sobre la fermentació malolàctica en vi.
2. Realitzar una pre-caracterització enològica de les soques aïllades.
3. Dissenyar medis de pre-cultiu que faciliten l'adaptació de soques d'*O. oeni* al vi.
4. Optimitzar els processos de conservació d'*O. oeni* per assegurar la supervivència cel·lular i el manteniment de l'activitat malolàctica durant llargs períodes de temps.
5. Determinar la influència del tipus de substrat i l'atmosfera de cultiu sobre la metabolització de carbohidrats per *O. oeni*. Estudiar els possibles efectes positius de l'afegiment de diferents agents reductors als medis de cultiu.
6. Avaluar processos de fermentació malolàctica amb cèl·lules lliures d'*O. oeni* en condicions de no proliferació cel·lular. Optimitzar diferents variables físico-químiques i microbiològiques.
7. Dissenyar i avaluar sistemes de fermentació amb cèl·lules d'*O. oeni* en creixement continu.
8. Optimitzar les condicions d'immobilització d'*O. oeni* i analitzar l'aplicació del procés en la fermentació malolàctica del vi.

CAPÍTOL 2
AÏLLAMENT, IDENTIFICACIÓ, PRE-CARACTERITZACIÓ
I CONSERVACIÓ DE NOVES SOQUES D'*Oenococcus oeni*

1 MATERIALS I MÈTODES

1.1 AÏLLAMENT I IDENTIFICACIÓ DE NOVES SOQUES

El *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* descriu als bacteris del gènere *Leuconostoc*, antic gènere al que pertanyia *Oenococcus oeni*, com a cèl·lules esfèriques o quasi-esfèriques que es troben en parelles o cadenes i d'una dimensió de 0.5-0.7 x 0.7-1.2 µm (Holt *et al.*, 1994). De caràcter Gram⁺, immòbils i no formadores de espores, catalasa - i arginina desaminasa -. Són anaerobis facultatius, quimiorganòtrofs amb un requeriment obligat pels carbohidrats fermentables. El seu creixement és força lent i produeix colònies de morfologia petita fins i tot en medis de nutrició complexos. Totes aquestes característiques i altres més que n'esmenarem més endavant les comparteixen tant les soques d'altra procedència: làctica, càrnica, ... com aquella que té el seu hàbitat natural al vi, *Leuconostoc oenos*. Recentment, Dicks *et al.* (1995) van fer una proposta de reclassificació d'aquesta espècie i van suggerir el nom d'*Oenococcus oeni*. Una discussió més detallada d'aquest fet es troba a la introducció d'aquesta tesi. L'aïllament de soques d'*O. oeni* presents al vi s'ha realitzat en base als criteris fixats pel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* per *L. oenos* amb les modificacions que es descriuen al llarg d'aquest capítol (Holt *et al.*, 1994). Com a control positiu es va utilitzar a totes les proves descrites la soca d'*O. oeni* (abans *Leuconostoc oenos*) ML34 (annex 3).

Anàlisi de la morfologia microscòpica i colonial

Per tal de seleccionar únicament els bacteris, presents al vi juntament amb fongs filamentosos i llevats, l'aïllament es va realitzant partint d'1 mL de vi que es va plaquejar en MLO sòlid amb 1 g L⁻¹ de cicloheximida (annex 1), antibiòtic al qual els eucariots en són sensibles d'una manera més o menys intensa. La cicloheximida, prèviament dissolta i esterilitzada per filtració, s'afegia al medi autoclavat, i es repartia en plaques. Les plaques es van incubar 7 d a 28°C i es va procedir a una observació de les colònies crescudes amb un microscopi de contrast de fases a (40 x 10) augments. Es van seleccionar aquelles colònies que presentaven cèl·lules de morfologia coccal o cocco-bacil·lar. Aquesta variabilitat morfològica és funció tant de les característiques individuals de cada aïllat com dels medis utilitzats per créixer les soques (Garvie, 1984).

Determinació del caràcter Gram

Les soques que presentaven una morfologia concordant amb els criteris abans esmentats, foren sotmeses a una prova de determinació del caràcter Gram mitjançant tinció diferencial (Gerhardt, 1994) i es seleccionaven les que eren G +. Com a control de la determinació s'utilitzà un aïllat del bacteri G - *Escherichia coli*.

Determinació de la presència de catalasa

Igualment es comprovava l'absència de l'activitat catalasa realitzant suspensions de cadascuna de les colònies aïllades en placa sobre un portaobjectes on s'havia dipositat abans un petit volum d'H₂O₂ de 10 volums. La no formació de bombolles era atribuïda a l'absència de l'enzim catalasa (Gerhardt, 1994). Com a control positiu s'utilitzà un aïllat del bacteri *Escherichia coli*.

Determinació del caràcter homo o heterofermentatiu

La fermentació de la glucosa als bacteris làctics es pot produir per dues vies fermentatives alternatives. La primera és la via homolàctica (Embden-Meyerhoff-Parnas), present als *Pediococcus* i a alguns *Lactobacillus* i *Weissella*, mitjançant la qual tota la glucosa present al medi es finalment transformada en àcid làctic. L'altra via de degradació de glucosa és la heterolàctica (pentoses-monofostat), compartida per alguns *Lactobacillus* i *Weissella* així com per *Leuconostoc* i *Oenococcus*, en la qual a més d'àcid làctic es produeixen àcid acètic, etanol i CO₂ en quantitats variables. Els criteris de diferenciació entre aquestes dues rutes de degradació de la glucosa es fonamenten doncs en l'anàlisi dels diferents productes finals. Per tal de diferenciar els dos tipus de metabolisme de les colònies vam utilitzar el Medi 5 (Zúñiga *et al.*, 1993) (annex 1). El Medi 5 es preparà a pH 6.5 i duia incorporat un indicador de pH (verd de bromocresol) que conferia una coloració blavenca a les colònies homofermentatives per la seva quasi total conversió de l'hexosa en àcid làctic (que implica una important baixada del pH i promou el viratge de l'indicador) mentre que les heterofermentatives (*Leuconostoc*, *Oenococcus* i alguns *Lactobacillus*) apareixien amb color blanc (l'acidificació al medi no era tan intensa). La inoculació al medi de cultiu es realitzà de la següent manera: les colònies aïllades es sembraren en MLO fins obtenir un cultiu jove en fase exponencial. Aleshores, es centrifugaren a 13000 x g, es rentaren dues vegades amb solució salina estèril i es sembraren per triple estria en Medi 5. Les plaques s'incubaren a 28°C amb una atmosfera del 100% de CO₂ en gerres d'anaerobiosi i periòdicament s'observà el creixement fins obtenir colònies visibles.

Determinació de l'isòmer d'àcid làctic produït a partir de la glucosa

Una vegada aïllats els bacteris, calia estudiar la proporció d'isòmers de l'àcid làctic que produïen a partir de la glucosa. Els cocs produeixen quasi exclusivament D(-) làctic mentre que els bacils en produeixen una mescla racèmica de D(-) i L(+). Per quantificar aquests dos isòmers, les diferents soques en estudi, crescudes en MLO fins al final de la fase exponencial, es van centrifugar a 13000 x g, es van rentar dues vegades amb solució salina estèril i es van inocular en Medi BB a l'1% (annex 1). Aquest medi fou el mateix utilitzat per Pilone i Kunkee (1970) amb el canvi de l'extret de fetge per 0.5 g L⁻¹ d'L-cisteïna i la presència de 0.2 g L⁻¹ de glucosa segons va descriure Pardo (1987). Després de 14 d d'incubació a 28°C, es centrifugaren el cultius a 13000 x g i es descartà el sediment. Una part alíquota del sobrenadant s'utilitzà per quantificar l'isòmer L(+)-làctic produït amb el sistema de determinació enzimàtica Cat-39084 de Boehringer Mannheim. Un altra part fou processada per a la seva anàlisi química per HPLC (annex 2) i es quantificà l'àcid làctic total produït. La quantitat d'isòmer D(-) es calculà per diferència. Els assaigs es van realitzar a partir de cultius crescuts en presència i en absència de glucosa per corregir les interferències en la quantificació d'isòmers de l'àcid làctic degudes a la seva producció a partir d'altres substrats.

Anàlisi de la producció de manitol a partir de fructosa

Un altra característica que ens permet diferenciar els bacteris heterolàctics dels homolàctics és la capacitat que posseeixen els primers de produir manitol a partir de la fructosa (Chalfan *et al.*, 1975). Aquesta capacitat de producció es va assajar segons el mètode descrit per Pardo (1987). Les soques es van créixer en Medi PM (annex 1) a 28°C partint de cultius crescuts en MLO, centrifugats i rentats amb solució salina. Després de créixer els cultius durant 14 d, es centrifugaren a 13.000 x g, es descartà el sediment i un alíquota del sobrenadant fou processat per a la seva anàlisi química per HPLC (annex 2).

Comprovació de la desaminació de l'arginina

També es va determinar la possibilitat de producció d'amoni a partir d'arginina creixent els aïllats el Medi MRS amb i sense addició d'arginina (3 g L⁻¹) (annex 1). Els tubs es van inocular segons el procediment descrit per l'assaig de producció d'isòmers de l'àcid làctic. Després d'una incubació de 5-7 d, la presència d'amoni es va detectar per l'aparició de color taronja quan s'afegia reactiu de Nessler (Gerhardt, 1994).

Assaigs de creixement a diferents temperatures

La temperatura de creixement recomanada pel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* per realitzar la identificació d'*O. oeni* (abans *L. oenos*) és de 37°C (Holt *et al.*, 1994). Per obtenir una caracterització més extensa es van realitzar assaigs de creixement a 21°C, 25°C, 28°C i 45°C a més dels 37°C recomanats. Aquestes temperatures es van triar seguint els consells efectuats per altres autors en identificacions anteriors (Chalfan *et al.*, 1977; Pardo, 1987). Els assaigs es van realitzar en MLO (annex 1). El seguiment del creixement es va realitzar diàriament durant 7 d mitjançant turbidimetria a 600 nm.

Assaigs de creixement a diferents pH

L'adscripció de noves soques a diferents espècies, dins l'antic gènere *Leuconostoc*, requeria la realització de proves de creixement a diferents valors de pH. Nosaltres hem realitzat els assaigs a pH 3.7, 4.2, 4.8, 5.0 i 5.5 segons descriu Pardo (1987). Els cultius i el seu seguiment es van realitzar d'igual manera a la descrita a l'apartat de creixement a diferents temperatures, fixant però la temperatura a 28 °C.

Assaig de creixement en presència del 10% d'etanol

La diferenciació entre *O. oeni* (abans *L. oenos*) i altres espècies que abans compartien gènere es basa en la possibilitat de fer-ho amb la presència d'un 10 % final d'etanol absolut (Garvie, 1967; Buckenhüskes, 1993; Holt *et al.*, 1994). Els cultius es van realitzar en MLO preparat amb el 90% del volum final i autoclavat en condicions estàndard. Una vegada temperats, s'afegia etanol fins a un 10% (v/v) final i s'inoculaven. El seguiment diari es realitzava de la manera descrita a l'apartat de creixement a diferents temperatures.

Comprovació de la formació de dextrà a partir de sacarosa

Algunes espècies com ara *Leuconostoc mesenteroides*, *L. amelibiosum* o *L. carnosum* poden produir dextrà mentre que altres com *L. oenos* (abans *O. oeni*) no en són capaces. La producció de dextrà a partir de sacarosa en Medi ATB (annex 1) és una prova útil per diferenciar aquestes espècies que abans pertanyien al gènere *Leuconostoc* segons el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994). Les plaques d'ATB es van sembrar de la mateixa manera descrita per al Medi 5, amb una atmosfera anaeròbia (100% de CO₂) a 28°C. Les gerres d'anaerobiosi s'obrien periòdicament i es comprovava l'aparència viscosa de les colònies bacterianes causada per la formació de dextrà. Com a control positiu de l'assaig es va utilitzar una soca d'*L. mesenteroides* (annex 3).

Comprovació de la utilització d'àcids cítric, màlic, tartàric i fumàric

Un altra prova d'interés taxonòmic que serveix per diferenciar espècies dins del gènere *Leuconostoc* és la metabolització de l'àcid cítric (Chalfan *et al.*, 1970; Beelman *et al.*, 1977; Pardo, 1987). La capacitat de degradació es va comprovar inoculant les soques aïllades en Medi C (annex 1) suplementat amb 10 g L^{-1} d'àcid cítric. Així mateix, es va analitzar la metabolització dels àcids màlic, tartàric i fumàric amb la intenció de contribuir a la caracterització enològica de les soques aïllades. La degradació dels àcids màlic i tartàric es va assajar en Medi C amb 10 g L^{-1} d'aquests àcids, mentre que la d'àcid fumàric es va comprovar en Medi TJ amb 0.5 g L^{-1} inicials (annex 1) (Chalfan *et al.*, 1970). Els assaigs es van efectuar a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ durant quatre setmanes. Setmanalment es van determinar les quantitats residuals per HPLC (annex 2).

Anàlisi de la fermentació de carbohidrats

La fermentació de carbohidrats és una de les proves bioquímiques típicament utilitzades per identificar bacteris, entre ells els làctics (Garvie, 1967). La treballosa tasca de realització d'aquestes proves ha fet que algunes cases comercials, com ara Biomerieux oferten sistemes miniaturitzats d'assaig que faciliten la feina. Encara que aquests procediments han estat utilitzats durant les darreres dècades per identificar noves soques d'*O. oeni*, Pardo *et al.* (1988) van demostrar la ineficiència d'aquest tipus de sistemes comercials per a la identificació de cocs heterofermentatius. Per això, nosaltres vam triar el protocol utilitzat per Pardo *et al.* (1987) utilitzant Medi FC (annex 1) que ens permetia obtenir resultats més fiables. Aquest assaig es realitzà en tubs de vidre amb medi FC semisòlid i en presència d'un indicador de pH (Garvie, 1967a). Aquest protocol possibilita la incubació dels cultius durant més temps que els sistemes miniaturitzats comercials (tan sols 2-3 d) i així permet que les soques d'*O. oeni* creixen i consumeixen el carbohidrat al seu abast. Alguns investigadors han resolt parcialment aquests problemes modificant les condicions d'inoculació i cultiu del sistema API CH de Biomerieux (Jensen i Edwards, 1991).

Producció de compostos volàtils

La producció de compostos volàtils per les soques d'*O. oeni* és un criteri enològic més que cal tenir en compte al moment de seleccionar aquestes soques per a la realització de l'FML (Buckenhüskes, 1993). L'assaig de producció dels components de la fracció volàtil del vi per part d'aquestes soques es va realitzar per fermentació dels vins i posterior anàlisi per cromatografia de gasos (annex 2).

La fermentació es va realitzar en botelles Pyrex de 2 L estèrils, omplertes amb 2 L de vi prèviament esterilitzat per filtració i inoculades cadascuna d'elles amb una soca del bacteri prèviament seleccionada i provinent de vi (aproximadament 1×10^5 ufc mL⁻¹). Les fermentacions es van desenvolupar a 20°C fins que es va detectar la quasi total desaparició de l'àcid màlic inicialment present al vi. Aleshores es van congelar els vins fins l'extracció dels components volàtils (annex 2). L'evolució de l'FML es va seguir mitjançant determinació de la quantitat residual d'àcid màlic present al vi per cromatografia en paper o HPLC (annex 2). Periòdicament es van realitzar plaqueigs en MLO (annex 1) per determinar els nivells de cèl·lules d'*O. oeni* viables al vi. Com a control de tot el procés es va incubar una botella amb vi estèril.

1.2 ADAPTACIÓ DE SOQUES D'*Oenococcus oeni* AL CREIXEMENT EN VI

Les soques d'*O. oeni* es troben al vi amb circumstàncies ambientals adverses, pH baix, altes concentracions d'etanol, existència d'SO₂ i presència de carbohidrats en baixes quantitats, que dificulten un desenvolupament ràpid (Davis *et al.*, 1985b). Quan aquestes soques s'inoculen en medis de cultiu sintètics, per realitzar estudis d'identificació i altres assaigs, el creixement es veu millorat. Tanmateix, una vegada acostumades a viure en aquests medis, els intents de reinocular-les directament en vi resulten generalment infructuosos (Henick-Kling, 1988). Per fer aquestes reinoculacions cal anar acostumant les soques passant-les progressivament des de medis rics a altres més pobres i semblants al vi. L'aproximació utilitzada per nosaltres consistia en la inoculació a l'1% (v/v) de les soques crescudes en MLO, en medis de pre-cultiu: A, B, C, D, 10 o P (annex 1). Una vegada crescudes a cadascun dels medis de pre-cultiu s'inoculaven al 2% (v/v) en vi a pH 3.5 i a partir d'aquest, una vegada desenvolupades, en vi a pH 3.4 i pH 3.3. Periòdicament es realitzaven controls de viabilitat en plaques d'MLO i es determinava el grau de realització de la FML per cromatografia en paper o HPLC (annex 2).

1.3 CONSERVACIÓ DE SOQUES D'*O. oeni* I MANTENIMENT DE LA SEVA ACTIVITAT MALOLÀCTICA

L'adaptació de les soques d'*O. oeni* al vi és indispensable per a la seva utilització comercial, però no ho és menys, la necessitat de mantenir la seva viabilitat i activitat malolàctica al llarg del temps. El procés d'adaptació de les cèl·lules al vi és un procés llarg i costós, per la qual cosa, una vegada s'ha aconseguit, requereix un subcultiu periòdic de les cèl·lules en vi fresc per mantenir les seves propietats tecnològiques. Sorgeix doncs, la necessitat d'optimitzar processos de conservació que assegurin tant un alt grau de viabilitat com la capacitat dels cultius per desenvolupar l'FML. Per esbrinar quines eren les millors condicions de preparació de les soques, es van créixer en 10 mL d'MLO, Medi P o vi (annex 1) fins el final de la fase exponencial i es van sotmetre a liofilització o congelació.

Per a la liofilització, els cultius es van centrifugar a 18000 x g, es van rentar dues vegades amb àcid glutàmic 0.067 M i es van resuspendre en 1-2 mL d'aquest agent crioprotector. Es van realitzar parts alíquotes de 200 µL i es van repartir en 5-6 tubs de vidre. Aleshores es van sotmetre a la liofilització i es van conservar a 4°C. Es van realitzar controls de viabilitat per comprovar la supervivència de les soques durant diferents etapes, abans i després de la liofilització, determinant el nombre d'ufc mL⁻¹ mitjançant recompte en plaques d'MLO (annex 1). Per a la congelació, 1 mL del cultiu crescut es va mesclar amb 1 mL de glicerol al 40% (v/v) en un tub de plàstic de 3 mL i es va congelar a -20°C fins la seva utilització.

Amb aquestes dades es van calcular els percentatges de supervivència deguts al procés de conservació i al temps d'emmagatzemament.

Determinació del manteniment de l'activitat malolàctica en vi

Per determinar quin era el grau de manteniment de l'activitat malolàctica en vi de les soques bacterianes utilitzades, després de ser sotmeses als tractaments de conservació abans esmentats, es van diluir els cultius de manera apropiada per obtenir una densitat inicial d'aproximadament 1x10⁵ ufc mL⁻¹ en ser inoculats en tubs de rosca de 12 mL amb 10 mL de vi. Setmanalment, es va realitzar una cromatografia en paper d'àcids orgànics (annex 2) per avaluar la taxa de degradació d'àcid màlic. Com a control del procés, es va realitzar una resembra directa a partir de cèl·lules crescudes als mateixos medis de procedència: MLO, Medi P o vi sense haver-les sotmeses a conservació. L'activitat malolàctica es va mesurar en funció dels dies que tardava a realitzar-se en relació amb l'assaig control.

2 RESULTATS I DISCUSSIÓ

2.1 AÏLLAMENT I IDENTIFICACIÓ DE NOVES SOQUES D'*Oenococcus oeni*.

2.1.1 Proves realitzades per adscriure les soques a gènere

Es van seleccionar divuit colònies anomenades MA4, VV4, VV5, RM2, RM3, BM2, BM3, GE3, GE5, TV3, TV4, BE5, CS2, TE3, BO3A, BO3B, CH3 i CH4 que presentaven una morfologia microscòpica coccoïdal o cocco-bacil·lar i formaven colònies blanques, rodones i menudes a les plaques de cultiu. A les proves inicials efectuades resultaren ser Gram + i catalasa -. Foren seleccionades i sotmeses a proves d'identificació posteriors per determinar la seva possible inclusió dins l'espècie *Oenococcus oeni* (abans *Leuconostoc oenos*).

En una fase posterior es va procedir a la determinació del caràcter homo o heterofermentatiu de les hexoses. Tots els aïllats seleccionades en l'apartat anterior, excepte GE3, GE5, CH3 i CH4 donaven lloc a colònies de color blanc quan eren inoculades en Medi 5 (Zúñiga *et al.*, 1993 (annex 1) la qual cosa implicava la seva heterofermentativitat. Les quatre soques que presentaven una tonalitat blavenca en aquest medi tenien una procedència comuna: van ser aïllades en vi Gewurztraminer de dos anys de maduració (GE3 i GE5) o bé a partir de vi Chardonnay (CH3 i CH4). En base a aquestes característiques foren preliminarment adscrites al gènere *Lactobacillus*. Donat que no era objectiu d'aquesta tesi la identificació de bacteris làctics diferents a *O. oeni*, no es va aprofundir més en l'estudi d'aquestes quatre soques i només es van utilitzar com a soques de referència.

Una de les proves més característiques per diferenciar els bacteris làctics del vi consisteix en determinar la producció d'isòmers de l'àcid làctic a partir de la glucosa. Així, *Lactobacillus* pot produir D(-), L(+) o una mescla dels dos; *Pediococcus* la mescla D(-) i L(+), mentre que *Leuconostoc* (i *Oenococcus*) únicament D(-). Aquesta prova s'ha utilitzat en les identificacions de bacteris làctics efectuades per nombrosos autors (Garvie, 1967a; Pilone i Kunkee, 1972; Beelman *et al.*, 1977; Chalfan *et al.*, 1977; Pardo, 1987).

Les nostres soques presentaven diferents comportaments. Així, les quatre soques homofermentatives produïen una mescla al 50% de D(-) i L(+) làctic, mentre que les heterofermentatives produïen només D(-): ML34, RM3, MA4, CS2, TV3, VV4, VV5, TE3, BO3A i BM3, o aquest isòmer de manera majoritària: BM2, BO3B, RM2, BE5 i TV4, que produïen un 10-25% d'isòmer L(+). Amb aquests resultats, es confirma l'adscripció a l'espècie *O. oeni* d'algunes soques heterofermentatives mentre que l'adscripció de les que presentaven una lleugera producció d'àcid L(+)-làctic fou posada en dubte fins a la conclusió de la resta de proves. Peynaud ja citava la possibilitat de trobar cocs heterofermentatius (*Leuconostoc* sp.) que sintetitzaven d'un 2-5% d'àcid L(+)-làctic (Pardo, 1987). Per aquesta raó els nostres aïllats que produïen L(+)-làctic no foren directament exclosos de proves posteriors. Tanmateix, Garvie (1960) posava en dubte aquesta possibilitat per la no possessió de L(+)-lactat deshidrogenasa de *L. oenos*.

La realització de la prova de producció de mannitol a partir de fructosa va confirmar la heterofermentativitat de part de les soques, amb l'excepció de GE3, GE5, CH3 i CH4. Aquestes quatre soques, produïen en canvi, elevades quantitats d'àcid làctic, notablement superiors a les detectades amb la resta de soques en estudi. Aquest resultat confirma la homofermentativitat d'aquests quatre aïllats d'aparença cocco-bacil·lar mentre que recolza el caràcter heterofermentatiu de la resta de soques.

Finalment, es va comprovar la desaminació de l'arginina per part dels aïllats. Només les soques VV4 i VV5 ens van oferir un resultat positiu. Resulta interessant la presència d'activitat arginina desaminasa associada al seu origen comú (totes dues foren aïllades al mateix vi). Això, segons el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994), ens faria eliminar aquestes dues soques de la llista de possibles membres de l'espècie *O. oeni*. Tanmateix, Sponholtz *et al.* (1992) i Liu *et al.* (1994; 1995) van descriure la presència de soques d'*O. oeni* amb capacitat per desaminar l'arginina. Així doncs, aquestes dues soques no van ser eliminades dels posteriors assaigs, deixant la seva adscripció a gènere per al final de les proves d'identificació.

Les nostres soques presentaven diferents comportaments. Així, les quatre soques homofermentatives produïen una mescla al 50% de D(-) i L(+) làctic, mentre que les heterofermentatives produïen només D(-): ML34, RM3, MA4, CS2, TV3, VV4, VV5, TE3, BO3A i BM3, o aquest isòmer de manera majoritària: BM2, BO3B, RM2, BE5 i TV4, que produïen un 10-25% d'isòmer L(+). Amb aquests resultats, es confirma l'adscripció a l'espècie *O. oeni* d'algunes soques heterofermentatives mentre que l'adscripció de les que presentaven una lleugera producció d'àcid L(+)-làctic fou posada en dubte fins a la conclusió de la resta de proves. Peynaud ja citava la possibilitat de trobar cocs heterofermentatius (*Leuconostoc* sp.) que sintetitzaven d'un 2-5% d'àcid L(+)-làctic (Pardo, 1987). Per aquesta raó els nostres aïllats que produïen L(+)-làctic no foren directament exclosos de proves posteriors. Tanmateix, Garvie (1960) posava en dubte aquesta possibilitat per la no possessió de L(+)-lactat deshidrogenasa de *L. oenos*.

La realització de la prova de producció de mannitol a partir de fructosa va confirmar la heterofermentativitat de part de les soques, amb l'excepció de GE3, GE5, CH3 i CH4. Aquestes quatre soques, produïen en canvi, elevades quantitats d'àcid làctic, notablement superiors a les detectades amb la resta de soques en estudi. Aquest resultat confirma la homofermentativitat d'aquests quatre aïllats d'aparença cocco-bacil·lar mentre que recolza el caràcter heterofermentatiu de la resta de soques.

Finalment, es va comprovar la desaminació de l'arginina per part dels aïllats. Només les soques VV4 i VV5 ens van oferir un resultat positiu. Resulta interessant la presència d'activitat arginina desaminasa associada al seu origen comú (totes dues foren aïllades al mateix vi). Això, segons el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994), ens faria eliminar aquestes dues soques de la llista de possibles membres de l'espècie *O. oeni*. Tanmateix, Sponholtz *et al.* (1992) i Liu *et al.* (1994; 1995) van descriure la presència de soques d'*O. oeni* amb capacitat per desaminar l'arginina. Així doncs, aquestes dues soques no van ser eliminades dels posteriors assaigs, deixant la seva adscripció a gènere per al final de les proves d'identificació.

2.1.2 Proves realitzades per adscriure les soques a espècies

Els resultats obtinguts a partir de les dades de creixement a diferents temperatures, ens mostra com, a nivell global, totes les soques aïllades prefereixen temperatures de creixement mitjanes, al voltant de 28°C (taula 1.1).

El creixement a 37°C, la temperatura discriminatòria aconsellada pel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994), fou positiu per a totes les soques, no permetent això eliminar cap aïllat d'assaigs posteriors. No resulta estrany quan és el mateix manual el que només li dona un interès relatiu al moment de caracteritzar l'espècie *L. oenos* per la seva variabilitat. El creixement a temperatures altes, 45 °C, fou quasi inapreciable per a totes les soques heterolàctiques i després de set dies d'assaig només TV4 havia crescut satisfactòriament. El feble creixement detectat als tubs dels heterofermentatius cal atribuir-lo al creixement residual inicial. Al contrari, les quatre soques homolàctiques es desenvolupaven en un dia, marcant això un altra diferència entre els bacteris homo i heterolàctics. Aquests creixements d'aïllats a altes temperatures, possiblement adscrits al gènere *Lactobacillus* ja fou esmentat abans per Pardo (1987).

		Temperatura (°C)				
		21	25	28	37	45
S O C A	CS2	4	7	4	3	7*
	CH3	2	1	1	1	1
	CH4	2	1	1	1	1
	BM2	2	3	3	1	7
	BM3	7*	7	4	3	7*
	BE5	4	7	4	1	7*
	TV3	3	7	4	3	7*
	TV4	4	7	4	2	2
	TE3	4	7	4	3	7*
	BO3A	7*	3	4	2	7*
	BO3B	2	7	4	1	7*
	RM2	2	3	4	1	7*
	RM3	7*	7	4	2	7*
	GE3	2	1	1	1	1
	GE5	2	1	1	1	1
	VV4	3	7	3	2	7*
VV5	2	3	4	4	7*	
MA4	4	7	4	3	7*	
ML34	3	7	3	1	7*	
		Dies				

* Creixement residual feble.

Taula 1.1. Temps necessari per detectar creixement als cultius de soques làctiques inoculades en MLO amb diferents temperatures de creixement. pH₀=4.8.

Pel que respecta a temperatures inferiors, 21-25 °C, una anàlisi global dels resultats mostra un desenvolupament de les soques similar al detectat a 28-37°C, resultant de nou les soques homolàctiques les més ràpides en créixer (taula 1.1). Resulta curiós un desenvolupament més ràpid a 21-28 °C que a 25 °C d'alguna de les soques asajades. Tanmateix, el creixement després d'una setmana d'incubació era positiu a tots els casos. Aquest creixement de les soques homolàctiques, d'igual manera que a la resta d'assaigs fisiològics, es traduïa en una elevada quantitat de biomassa sedimentada al fons dels tubs de cultiu.

El creixement a diferents pH és un més dels assaigs efectuats per caracteritzar els diferents aïllats dels que disposàvem. La capacitat d'*O. oeni* per poder sobreviure a pH baixos és d'especial importància al moment d'inocular els bacteris al vi, que habitualment es troba entre valors de 3.0 i 3.5 (Henick-Kling, 1988). La importància d'aquesta prova es posa de manifest en el nombre d'autors que l'han realitzat als seus estudis d'aïllament de soques (Bousbouras i Kunkee, 1971; Pilone i Kunkee, 1972; Henick-Kling, 1988). Així mateix, el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* descriu l'assaig de creixement a pH 4.8 com a necessari per a l'adscripció de les soques a espècies (Holt *et al.*, 1994). Tots els aïllats seleccionats per a l'assaig presentaren un creixement positiu als cinc valors fixats, encara que la velocitat de creixement no fou uniforme ni per a totes les soques ni a tots els valors inicials de pH (taula 1.2).

		Valors inicials de pH				
		3.7	4.2	4.8	5.0	5.5
S O C A	CS2	5	5	5	5	5
	CH3	2	1	1	1	1
	CH4	3	3	2	2	2
	BM2	2	2	2	2	2
	BM3	2	1	1	1	1
	BE5	5	5	3	3	3
	TV3	5	5	3	3	3
	TV4	7	5	2	2	2
	TE3	3	3	3	3	3
	BO3A	2	2	2	2	2
	BO3B	2	2	2	2	2
	RM2	2	2	2	2	2
	RM3	3	3	3	3	3
	GE3	3	1	1	1	1
	GE5	3	1	1	1	1
	VV4	3	2	2	2	2
	VV5	3	2	2	2	2
	MA4	5	5	3	3	3
ML34	3	2	2	2	2	
		Dies				

Taula 1.2. Temps necessari per detectar creixement amb els cultius inoculades en MLO. Diferents valors inicials de pH. T de creixement=28 °C

Els aïllats que menys característiques pròpies d'*O. oeni* presentaven, p.e. fermentació homolàctica de la glucosa, foren els que més ràpidament es desenvoluparen en medi sintètic a tots els valors de pH. La soca heterolàctica BM3 també presentà un creixement ràpid que fou confirmat en repeticions posteriors de l'assaig. Malgrat això, cap de la resta de proves d'identificació la desmarcava de l'espècie *O. oeni*.

Com era d'esperar, el creixement a pH baix (3.7) fou més lent que a valors superiors per a la major part de les soques (taula 1.2). Aquest comportament també fou l'observat als creixements efectuats amb la soca de referència ML34. Tenint en compte aquests resultats vam considerar que el creixement a pH baix no era una prova discriminatòria a nivell d'espècie. Per això, la realització d'aquesta prova fou presa en consideració tan sols a nivell de caracterització dels aïllats i analitzada de manera global amb la resta d'assaigs fisiològics i bioquímics efectuats durant la identificació.

Als assaigs de creixement en medi sintètic en presència del 10% d'etanol, totes les soques analitzades van presentar un comportament positiu (taula 1.3). Les soques homofermentatives: CH3, CH4, GE3 i GE5 són les que van presentar un desenvolupament més ràpid creixent en només 2-3 d, mentre que el desenvolupament de les heterolàctiques es va mostrar més dispar. Així, algunes soques creixien de manera satisfactòria en 4-6 dies mentre altres només presentaven un lleuger creixement després de 7 dies d'assaig.

	dies
CS2	7*
CH3	2
CH4	2
BM2	7*
BM3	7*
BE5	7*
TV3	7*
TV4	4
TE3	6
BO3A	7*
BO3B	7
RM2	4
RM3	6
GE3	2
GE5	3
VV4	4
VV5	6
MA4	4
ML34	4

* Creixement residual feble

Taula 1.3. Temps necessari per detectar creixement als cultius de soques làctiques inoculades en MLO amb un 10% d'etanol. T creixement=28 °C; pH₀=4.8.

Aquesta prova, suggerida pel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ens ajuda a adscriure els cocs heterolàctics a l'espècie *O. oeni* (abans *L. oenos*) diferenciant-los de la resta de membres del gènere *Leuconostoc* (Holt *et al.*, 1994). Aquests creixements en medi sintètic, útils al moment de realitzar les proves d'identificació i adscripció a taxons, no pressuposen la capacitat per desenvolupar la FML en vi sota condicions físico-químiques molt diferents (Pardo, 1987).

La capacitat de produir dextrà a partir de sacarosa és una característica pròpia d'algunes espècies del gènere *Leuconostoc* però no així d'*O. oeni* (abans *L. oenos*). La realització d'aquesta prova ens va mostrar com cap de les soques assajades metabolitzaven la sacarosa fins a dextrà. Amb això descartem la pertinença dels nostres aïllats a cap espècie de *Leuconostoc* productora de biopolimers. La presència de *L. mesenteroides* al vi no és un fet estrany i ja ha estat descrita abans (Lonvaud-Funel i Strasser de Saad, 1982).

La realització de les proves d'assimilació d'àcids orgànics ens ajuden bé a la diferenciació d'espècies dins el gènere *Leuconostoc*, bé a caracteritzar les soques aïllades. A més, la degradació d'àcids orgànics permet obtenir informació relativa al seu aprofitament com a font d'energia i carboni per part dels bacteris i les seves implicacions en els canvis organolèptics que es produeixen al vi. Més informació sobre aquests aspectes es troba a la introducció d'aquesta tesi.

La degradació dels àcids màlic i cítric ha estat tradicionalment assajada per caracteritzar noves soques d'*O. oeni* (Garvie, 1967a; Piloni i Kunkee, 1972; Beelman *et al.*, 1977; Pardo, 1987). Encara que aquestes degradacions no presenten resultats unívocs ja que moltes vegades canvien de soca en soca (Pardo, 1987), els resultats obtinguts en aquestes determinacions mostraren com totes les soques estudiades eren capaces de degradar l'àcid màlic (taula 1.4). La capacitat d'una soca d'*O. oeni* per degradar l'àcid màlic és indispensable per a la seva utilització industrial ja que la realització de l'FML és el principal objectiu del seu ús. El creixement d'*O. oeni* amb màlic com a única font de carboni és un fet estudiat abans, així com la producció d'ATP associada a la via quimiosmòtica d'entrada de l'àcid a l'interior cel·lular (Cox i Henick-Kling, 1989). Tanmateix, aquesta no és una activitat indispensable per al creixement si els bacteris poden trobar al vi quantitats residuals d'hexoses que els ofereixin una font d'energia mínima per desenvolupar-se.

L'àcid cítric fou assimilat per tots els aïllats heterofermentatius i per alguns homofermentatius tan sols (taula 1.4). Tanmateix, la velocitat de degradació per part de tots els aïllats no fou uniforme. Així, mentre GE3 i GE5 a penes l'havien metabolitzat en quatre setmanes d'assaig, CH3 i CH4 l'exhaurien quasi completament a la primera. Els heterolàctics també tenien un comportament variable. Després de dues setmanes d'assaig BM2, BO3B, TV4, BM2 i VV4 havien consumit més d'un 10% de la quantitat inicial, mentre que la resta de soques no arribaven al 2%. Aquest tipus de variabilitat ja va ser detectat abans per Pardo (1987).

		Àcid orgànic			
		Màlic	Cítric	Fumàric	Tartàric
S O C A	CS2	+	+	+	-
	CH3	+	+	+	+
	CH4	+	+	+	+
	BM2	+	+	+	-
	BM3	+	+	+	-
	BE5	+	+	+	-
	TV3	+	+	+	-
	TV4	+	+	+	*
	TE3	+	+	+	-
	BO3A	+	+	+	-
	BO3B	+	+	+	-
	RM2	+	+	+	-
	RM3	+	+	+	-
	GE3	+	-	+	+
	GE5	+	-	+	+
	VV4	+	+	+	-
	VV5	+	+	+	-
	MA4	+	+	+	-
ML34	+	+	+	-	

* Degradació feble

Taula 1.4. Degradació de diferents àcids orgànics en medi C (màlic, cítric o tartàric) o en medi TJ (fumàric) per les soques estudiades. T creixement=28°C; pH₀=4.8. Dades finals.

L'àcid cítric, a banda de resultar un suport pel creixement és un substrat inicial a partir del qual es formen diferents compostos aromàtics al vi (Cogan *et al.*, 1981; Shimazu *et al.*, 1985; Revel *et al.*, 1989). L'excessiva degradació podria produir elevades quantitats d'aquests compostos i ser perjudicial pel vi. Tanmateix, les baixes quantitats d'aquest àcid que allí es troben normalment quan es desenvolupa l'FML fan pensar en aquest possible problema de manera secundària. Amb tot, sembla ser que el creixement amb qualsevol d'aquests dos àcids com a única font de carboni no resulta

tant profitós per les cèl·lules com la seva cometabolització amb els carbohidrats (Salou *et al.*, 1991; 1994).

També es van realitzar proves d'assimilació dels àcids tartàric i fumàric pel seu interès pràctic en la selecció de soques de bacteris làctics (Pardo, 1987). L'àcid tartàric és difícilment metabolitzat pels bacteris làctics i mai per *O. oeni* (Holt, 1994). A les nostres proves, només hem obtingut resultats positius de degradació amb les soques homolàctiques i un de molt lleuger amb una soca heterolàctica (taula 1.4). Aquesta soca heterolàctica, TV4 també presentava un creixement positiu a 45 °C no concordant amb les descripcions habitualment reconegudes per *O. oeni*. La incapacitat per degradar l'àcid tartàric es considera positiva per impedir la formació d'excessives quantitats d'àcid acètic i acetoïna (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983; Buckenhüskes, 1993). Les elevades quantitats d'àcid tartàric presents al vi requereixen d'una gran cura al moment de triar una soca per utilitzar-la com a inductora de l'FML, ja que si degradara l'àcid tartàric podria malmetre el vi ràpidament i inexorablement. La degradació d'àcid fumàric també va ser positiva a totes les soques estudiades, tant homolàctiques com heterolàctiques (taula 1.4). Tanmateix, mentre que aquesta degradació es va produir en només una setmana de cultiu amb les homolàctiques, les heterolàctiques van necessitar fins a quatre setmanes per consumir-lo totalment. Kunkee (1974) recomanà l'afegiment d'àcid fumàric al vi en quantitats superiors al 600 mg L⁻¹ per aturar el desenvolupament microbià aprofitant el seu efecte antibactericida (Kunkee, 1974). Sembla ser, doncs, que *O. oeni* és capaç d'assimilar aquest àcid quan es troba present en baixes quantitats mentre que s'inhibeix quan augmenta la concentració.

Una de les proves més característiques que es solen efectuar tant per adscriure nous aïllats a una espècie com per a caracteritzar diferents soques és la capacitat d'assimilació de diferents carbohidrats. Quan es pretén caracteritzar individus de diferents gèneres i espècies, una bona introducció consisteix en utilitzar sistemes d'identificació miniaturitzats, com ara l'API 50 CH (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1985). Tanmateix, els resultats obtinguts als nostre laboratori amb aquests sistemes miniaturitzats no foren gens satisfactoris (Pardo, 1987) i per això vam optar per efectuar les proves fisiològiques d'assimilació en tubs amb medi FC (annex 1). Els perfils de fermentació resultants es mostren a la taula 1.5.

SUCRE SOCA	D-ARA	L-ARA	XIL	FRU	GLC	GAL	MAS	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MEL	RAF	DEX	ESQ	SAL	MAT	RIB
ML34	-	+	r	+	+	-	+	+	-	-	-	+	r	-	-	+	+	r	+
GE3	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
GE5	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
CH3	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
CH4	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
TV4	d	d	-	+	+	-	+	+	d	-	-	+	-	-	d	+	+	-	d
TV3	-	+	+	+	d	-	+	+	-	-	-	d	-	-	-	+	-	-	+
VV4	d	d	d	+	d	d	d	d	d	d	d	d	+	d	d	+	d	d	+
VV5	-	+	+	+	d	+	-	d	-	-	-	d	+	-	+	+	-	d	+
BO3A	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
BO3B	-	+	-	+	+	-	r	+	-	-	d	+	+	-	-	+	+	-	+
CS2	-	-	+	+	+	+	+	+	-	d	-	+	-	-	-	+	+	+	+
TE3	-	+	+	+	+	-	-	+	-	d	r	d	-	r	-	+	+	-	+
MA4	r	+	r	+	r	r	-	r	d	d	-	r	+	r	r	r	r	r	r
RM2	-	-	-	+	d	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
RM3	-	-	+	+	+	-	+	r	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
BM2	d	+	+	+	+	+	+	+	d	+	d	+	+	-	d	+	+	+	+
BM3	-	+	+	+	+	+	r	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
BE5	-	-	d	d	d	-	d	-	-	-	-	-	+	-	+	d	-	+	-

D-ARA=D-arabinosa; L-ARA=L-arabinosa; XIL=xilosa; FRU=fructosa; GLC=glucosa; GAL=galactosa; MAS=mannosa; CEL=cel·lobiosa; LAC=lactosa; MAL=maltosa; SAC=sacarosa; TRE=trehalosa; MEL=mel·libiosa; RAF=rafinosa; DEX=dextrina; ESQ=esqualina; SAL=salicina; MAT=mannitol; RIB=ribosa

Taula 1.5. Fermentació de carbohidrats per les soques aïllades en medi basal FC amb diferents carbohidrats. -, negatiu; +, positiu; r, amb retràs o molt lleuger; d, dubtós. T de creixement=28°C; pH₀=5.2; temps d'incubació: 3-4 setmanes

Una anàlisi global dels resultats permet veure com la glucosa i la fructosa, les hexoses majoritàriament presents al vi, són consumides més o menys ràpidament per totes les soques assajades. No és un fet d'estranyar ja que la seva supervivència als vins de procedència s'hauria de deure a la seva metabolització. Tanmateix, i sota aquestes condicions experimentals, vam detectar dificultats de consum de la glucosa per vèries soques que fins i tot després de dues setmanes d'incubació només presentaven creixements molt lleugers. La producció d'àcid a partir de la trehalosa i la hidròlisi de l'esqualina són altres dues proves interessants que permeten caracteritzar *O. oeni* (Pardo, 1987). Quasi totes les soques assajades, tant homofermentatives com heterofermentatives eren capaces d'actuar sobre aquests dos carbohidrats, amb l'excepció de BE5. Aquesta soca presentava problemes de creixement en el medi FC independentment del carbohidrat subministrat a l'assaig. La sacarosa, la maltosa, el mannitol, la lactosa i la rafinosa no haurien de ser assimilades per les soques d'*O. oeni* segons el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994). Resultats d'assimilació clarament positius per a la sacarosa només els vam detectar amb dues soques homolàctiques (taula 1.5). La resta de soques no produïen quantitats suficients d'àcids com per virar l'indicador de pH. Així mateix vam detectar resultats positius per a la maltosa amb altres dues soques homolàctiques, GE3 i GE5, i dues heterolàctiques, BM2 i BM3. Aquestes últimes oferiren perfils de degradació de carbohidrats més semblants a *O. oeni* que a qualsevol altre microorganisme. La fermentació del mannitol va ser sorprenentment detectada en diferents aïllats, incloent-hi tots els homolàctics i només alguns heterolàctics. De nou, els perfils d'algunes soques heterolàctiques, malgrat donar resultats contradictoris amb els descrits, s'assemblaven més a *O. oeni* que a cap altre bacteri. Això indica una diversitat intraespecífica més gran que l'admesa pels criteris clàssics d'identificació (Holt et al., 1994). Les proves efectuades per a la lactosa i la rafinosa oferiren resultats més coincidents; cap de les soques en estudi eren capaces de metabolitzar-les satisfactòriament durant les dues setmanes d'assaig. Els altres tres carbohidrats assajats seguint les recomanacions del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, L-arabinosa, mel·libiosa i salicina, així com altres addicionalment utilitzats en les proves de caracterització de les soques ens oferiren els resultats que es mostren a la taula 1.5. La variabilitat específica detectada fou característica per a cadascun dels aïllats i ens va permetre diferenciar un dels altres, de tal manera que cap d'ells presentava un perfil idèntic al d'un altre amb almenys un tret diferencial (taula 1.5).

2.1.3 Soques adscrites a l'espècie *Oenococcus oeni*.

Fonamentant-nos en totes aquestes determinacions, vam incloure totes les soques heterolàctiques assajades dins l'espècie *O. oeni*. Si bé es cert que algunes de les proves bioquímiques efectuades no concordaven exactament amb les característiques pròpies descrites per altres investigadors, sobre tot a les proves de degradació de carbohidrats, la resta d'assaigs efectuats si que mostren una concordança acceptable (Garvie, 1967a; Pardo, 1987). També resultaven dubtoses les soques BM2, BO3B, RM2, BE5 i TV4 per la producció d'àcid L(+)-làctic en baixes quantitats. Per totes aquestes raons no foren utilitzades en posteriors assaigs d'aquest tesi.

No obstant, abans d'utilitzar les soques aïllades en la producció de vi a major escala, es va realitzar una sèrie de proves de pre-caracterització enològica. La realització d'aquests assaigs permet establir la capacitat dels aïllats per realitzar l'FML de manera satisfactòria, tant pel que respecta a l'efectivitat de creixement i la degradació de l'àcid màlic com per la possible producció de components aromàtics.

2.2 ANÀLISI DE LA PRODUCCIÓ DE COMPOSTOS VOLÀTILS

Un dels aspectes que cal tenir en compte alhora de seleccionar una soca làctica per utilitzar-la com a cultiu iniciador de l'FML en vi, és la seva capacitat de producció d'aromes en vi (Buckenhüskes, 1993). Amb la finalitat de determinar la possible producció d'aquests aromes, els metabòlits volàtils produïts per cinc de les soques aïllades en aquesta tesi (BM3, MA4, VV5, TE3 i CH4) van ser analitzades per cromatografia de gasos. La taula 1.6 mostra la intensitat relativa front al patró intern (2-nonanol) dels pics dels components volàtils detectats als vins fermentats amb diferents soques abans i després de l'FML. Quan es disposava de solucions estàndard apropiades, els metabòlits corresponents amb aquests pics foren quantificats (taula 1.7). Totes les soques assajades en aquest experiment van degradar quasi completament l'àcid màlic inicialment present al vi, excepte *Lactobacillus* sp. CH4 que només el va consumir parcialment (taula 1.8).

Pel que respecta als components volàtils, cal dir que alguns d'ells foren detectats en les mateixes concentracions abans i després de la realització de l'FML (1-hexanol, 2-pentanol, àcid isovalèric i àcid hexanoic) essent doncs considerats com a característics del vi base de partida i no assimilables ni sintetitzables pels bacteris làctics assajats (taula 1.6). L'anàlisi dels resultats obtinguts va mostrar variacions en la resta de components volàtils. Algun d'aquests compostos es trobaven en quantitats superiors a la inicial a qualsevol dels vins inoculats amb cultius làctics, mentre que la concentració d'altres components presentava més variació depenent de la soca utilitzada. Només els valors relatius del 4-hidroxibutirat d'etil van disminuir de manera apreciable.

La realització d'una anàlisi detallada de les modificacions als components volàtils dels vi mostra els següents resultats:

Els alcohols superiors presents al vi són produïts principalment pels llevats i en menor mesura pels bacteris làctics, a partir dels aminoàcids o de les hexoses *via* piruvat, contribuint activament a l'aroma final del vi. La quantitat total d'alcohols superiors en vins de taula es sol trobar entre 0.14 i 0.42 g L⁻¹ (Amerine *et al.*, 1982) coincidint amb els nostres resultats experimentals. Així, vam detectar increments en la quantitat total d'alcohols en tots aquells vins que havien sofert l'FML (amb excepció del inoculats amb les soques MA4 i BM3) en comparació amb els controls. Aquests increments foren deguts principalment a la producció d'alcohol benzílic detectada a tots els vins que havien

Component	MS	Abans FML		Després FML									
		Control	CV	<i>Oenococcus oem</i>				<i>Lactobacillus</i> sp.					
				BMB	CV	MA-4	CV	VV5	CV	TF3	CV	CH4	CV
Alcohols													
1-Propanol	99.7	0.20	5.0	0.16	0.1	0.12	17.0	0.46	0.7	0.31	5.9	0.38	1.9
Isobutanol	96.2	1.59	2.3	1.25	0.0	0.98	3.3	2.65	0.6	2.11	2.6	2.24	2.4
2-Pentanol	90.8	0.16	1.6	0.15	1.0	0.13	1.6	0.18	0.3	0.17	8.3	0.16	1.3
1-Butanol	94.6	0.14	6.4	0.12	8.1	0.11	7.4	0.21	3.0	0.19	8.4	0.21	1.5
Alcohol isoamílic	95.9	43.49	0.8	39.13	0.3	37.15	0.8	50.47	0.3	46.21	1.6	48.28	1.0
1-Hexanol	92.3	0.40	2.3	0.40	0.8	0.39	2.4	0.39	3.8	0.39	0.1	0.40	1.0
Alcohol benzílic	*	0.14	0.7	0.23	0.5	0.22	2.7	0.21	7.1	0.21	0.1	0.54	2.8
2-Feniletanol	86.1	16.95	4.2	17.45	0.3	15.83	2.0	15.84	2.7	15.66	4.9	16.74	3.0
		63.07		58.89		54.92		70.41		65.24		68.95	
Esters													
Acetat d'etil	*	4.50	1.5	2.38	1.5	1.69	2.2	9.86	0.9	6.01	10.4	7.86	8.6
Caprilat d'etil	80.6	0.31	0.1	0.29	3.2	0.34	11.5	0.26	1.8	0.32	1.3	0.30	15.4
Acetat d'isoamíl	93.4	0.26	0.7	0.31	1.5	0.32	3.1	0.60	0.8	0.22	4.6	0.60	4.3
Caproat d'etil	90.9	0.16	1.6	0.15	0.3	0.14	2.3	0.19	1.7	0.17	1.5	0.18	1.2
Lactat d'etil	*	9.91	2.7	13.07	0.4	11.85	1.2	13.00	1.5	12.69	0.1	14.83	1.1
3-hidroxi-butirat d'etil	92.9	0.04	5.8	0.04	0.7	0.04	3.0	0.04	1.0	0.03	3.1	0.04	1.7
Caprilat d'isoamíl	*	0.22	17.2	0.19	16.8	0.11	17.1	0.03	33.3	0.06	12.2	0.07	1.4
Succinat de dietil	93.6	0.82	3.9	0.98	6.8	0.82	6.9	0.80	0.3	0.69	2.7	0.88	0.3
4-hidroxi-butirat d'etil	*	1.29	5.0	0.73	0.3	0.80	1.8	0.59	1.5	0.81	0.4	0.77	3.9
Acetat 2-fenetil	85.1	0.07	2.9	0.15	0.9	0.14	3.8	0.19	0.8	0.07	2.5	0.17	3.3
Benzoat 2-fenetil	*	0.46	1.6	1.04	2.5	0.74	8.9	0.64	6.3	1.04	7.5	0.63	13.9
		18.07		19.34		16.99		26.21		22.11		26.32	
Àcids													
Àcid isovalèric	95.7	0.90	9.3	1.03	6.1	0.89	6.5	0.82	0.6	0.87	3.2	0.93	3.8
Àcid isobutíric	90.3	0.74	2.1	0.83	1.5	0.74	10.2	0.77	3.2	0.72	3.3	0.72	22.0
Àcid hexanoic	95.3	1.32	5.8	1.32	1.5	1.19	0.7	1.18	1.2	1.19	0.6	1.25	2.1
Àcid 10-undecanoic	*	0.10	14.3	0.79	4.9	0.46	14.8	0.64	8.6	0.61	3.1	0.77	12.3
Àcid capríc	*	0.08	39.5	0.12	1.9	0.12	21.6	0.14	18.7	0.33	24.4	0.12	5.9
Àcid caprílic	*	0.87	4.4	1.37	8.7	1.01	6.2	1.15	5.1	1.33	9.1	1.31	4.4
		28.53		33.43		27.56		41.82		35.67		41.07	
Altres components													
γ-butirolactona	92.8	2.78	3.2	3.65	0.4	3.17	4.1	3.22	0.8	3.19	3.9	3.20	0.9
† 2,3-butanodiol	93.1	11.86	4.9	22.82	0.0	14.33	2.1	13.81	0.4	15.64	4.4	13.53	2.1
† 2,3-butanodiol	93.3	1.79	1.4	6.76	1.1	4.22	3.9	4.55	4.8	4.13	4.5	3.72	16.5
‡ 2,3-butanodiol	*	0.42	2.3	0.59	15.0	0.38	21.7	0.21	5.4	0.26	5.7	0.00	-
3-(Metil-tio)-1-propanol	93.9	0.26	5.4	0.33	0.3	0.29	3.2	0.28	3.6	0.33	0.7	0.28	3.6

CV= desviació estàndard / concentració mitjana (%)

MS=espectrometria de masses

* = components no identificats per MS

Taula 1.6. Concentracions relatives (respecte al 2-nonanol) i coeficients de variació per als extractes dels sis vins analitzats per GLC: vi control sense fermentar i cinc vins fermentats amb diferents bacteris làctics.

Component	MS	<i>Oenococcus oeni</i>											
		Control		BM3		MA4		VV5		TE3		<i>Lactobacillus</i> sp. CH4	
		Conc.	CV	Conc.	CV	Conc.	CV	Conc.	CV	Conc.	CV	Conc.	CV
Alcohols													
1-Propanol	99.7	3.35	5.0	2.80	0.1	1.99	17.0	7.79	0.7	5.23	5.9	6.38	1.9
Isobutanol	96.2	9.68	2.3	7.58	0.0	5.93	3.3	16.12	0.6	12.84	2.6	13.64	2.4
1-Butanol	94.6	0.13	6.4	0.12	8.1	0.11	7.4	0.20	3.0	0.19	8.4	0.20	1.5
Alcohol isoamílic	95.9	96.46	0.8	86.79	0.3	82.39	0.8	111.94	0.3	102.48	1.6	107.07	1.0
1-Hexanol	92.3	0.68	2.3	0.68	0.8	0.66	2.4	0.67	3.8	0.66	0.1	0.69	1.0
Alcohol benzílic	*	0.25	0.7	0.41	0.5	0.39	2.7	0.37	7.1	0.38	0.1	0.96	2.8
2-Feniletanol	86.1	22.75	4.2	23.43	0.3	21.25	2.0	21.27	2.7	21.02	4.9	22.48	3.0
Èsters													
Acetat d'isoamil	93.4	0.30	0.7	0.35	1.5	0.37	3.1	0.68	0.8	0.25	4.6	0.67	4.3
Acetat d'etil	*	98.69	1.5	52.23	1.5	36.94	2.2	216.04	0.9	131.69	10.4	172.11	8.6
Caproat d'etil	90.9	0.24	1.6	0.23	0.3	0.21	2.3	0.28	1.7	0.25	1.5	0.26	1.2
Lactat d'etil	*	39.90	2.7	52.62	0.4	47.71	1.2	52.33	1.5	51.10	0.1	59.69	1.1
Caprilat d'etil	80.6	1.16	0.1	1.05	3.2	1.27	11.5	0.97	1.8	1.17	1.3	1.11	15.4
3-hidroxibutirat d'etil	92.9	0.11	5.8	0.10	0.7	0.09	3.0	0.09	1.0	0.08	3.1	0.09	1.7
Succinat de dietil	93.6	1.05	3.9	1.25	6.8	1.05	6.9	1.02	0.3	0.88	2.7	1.12	0.3
Àcids													
Àcid isobutíric	90.3	1.70	2.1	1.90	1.5	1.69	10.2	1.77	3.2	1.65	3.3	1.66	22.0
Àcid isovalèric	95.7	1.24	9.3	1.42	6.1	1.23	6.5	1.13	0.6	1.20	3.2	1.29	3.8
Àcid caprílic	*	1.71	4.4	2.70	8.7	1.98	6.2	2.27	5.1	2.62	9.1	2.58	4.4
Àcid càpric	*	0.14	39.5	0.22	1.9	0.22	21.6	0.26	18.7	0.61	24.4	0.22	5.9
Altres components													
γ -butirolactona	92.8	2.82	3.2	3.71	0.4	3.22	4.1	3.27	0.8	3.23	3.9	3.25	0.9
2,3-Butanodiol	93.1	431.29	4.9	829.91	0.0	521.22	2.1	502.31	0.4	569.02	4.4	492.30	2.1
m 2,3-Butanodiol	93.3	123.34	1.4	465.02	1.1	290.25	3.9	312.62	4.8	283.97	4.5	255.92	16.5
e 2,3-Butanodiol	90.5	33.85	2.3	48.15	15.0	30.63	21.7	16.78	5.4	21.50	5.7	0.00	*
3-(Metiltio)-1-propanol	93.9	0.90	5.4	1.14	0.3	0.98	3.2	0.98	3.6	1.14	0.7	0.97	3.6

CV= desviació estàndard / concentració mitjana (%)

MS= espectrometria de masses

*= components no identificats per MS

Taula 1.7. Concentració (mg L⁻¹) i coeficients de variació per als extractes dels vins analitzats per GLC: vi control sense fermentar i cinc vins fermentats amb diferents bacteris làctics.

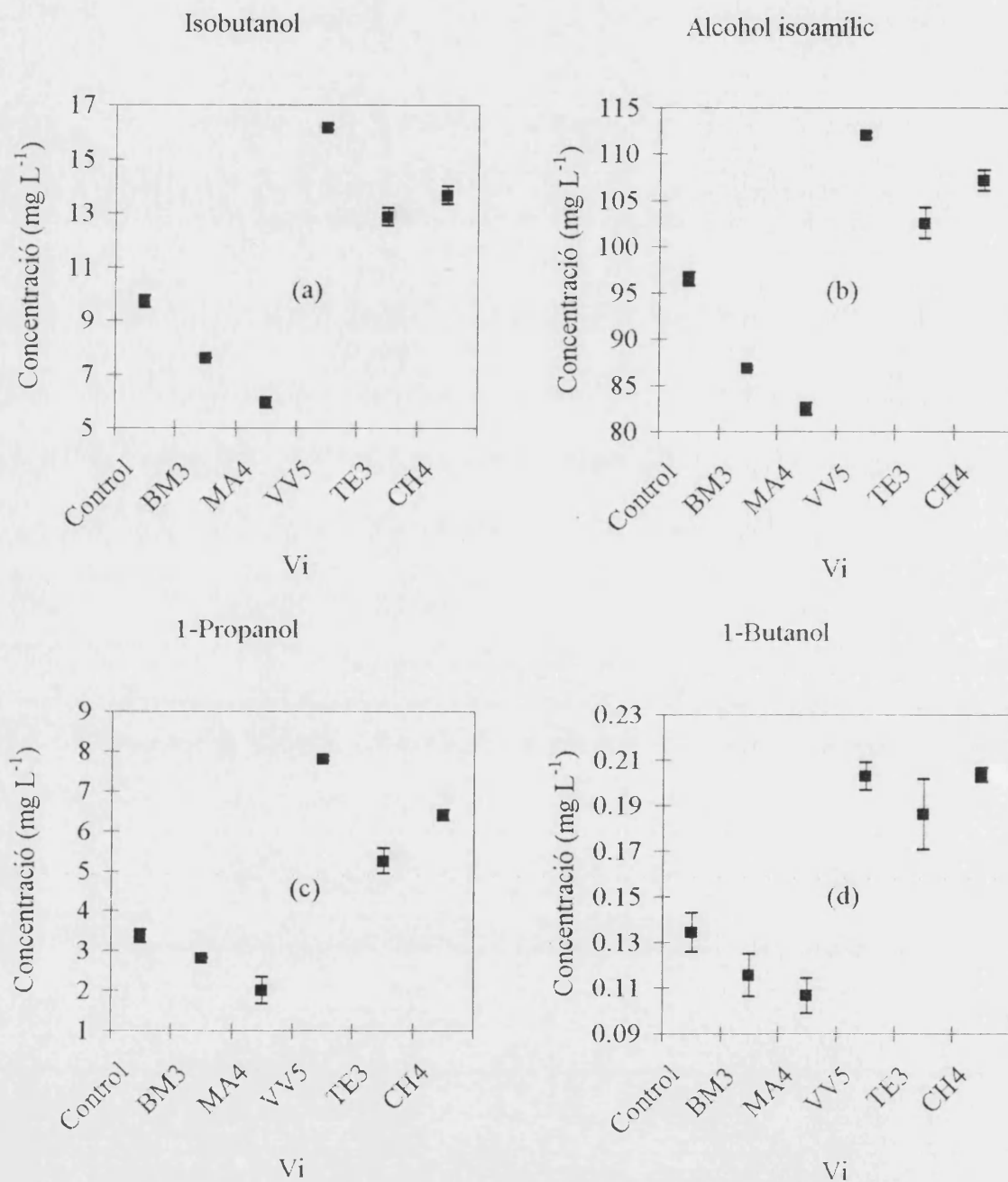


Figura 2.1. Concentració de diferents alcohols superiors al vi. Determinacions efectuades per GLC a partir d'extractes de vins obtinguts abans i després de l'FMI, realitzada per diferents soques de bacteris làctics. T de creixement=20°C; pH₀=3.5.

soferit l'FMI. Les quantitats produïdes als vins inoculats amb cadascuna de les quatre soques d'*O. oeni* foren similars (al voltant de 0.4 mg L⁻¹) mentre que un nivell superior

fou detectat al vi fermentat per la soca homolàctica CH4 (0.96 mg L⁻¹) (taula 1.7). Els resultats obtinguts per a l'isobutanol, 1-propanol, 1-butanol i alcohol isoamílic mostraren un resultat característic dependent de la soca utilitzada per induir l'FML (figura 2.1). Mentre que els valors obtinguts amb les soques BM3 i MA4 foren lleugerament inferiors als del vi control (sense fermentar), les quantitats finals de tots quatre compostos foren superiors per a la resta de soques.

Com era d'esperar, s'observà un patró de producció característic degut a que tots aquests alcohols presenten rutes biosintètiques similars. Els nivells del 2-feniletanol disminuïren lleugerament al final de l'FML, possiblement degut a un fenomen d'adsorció física a les membranes bacterianes promogut per grup fenilo. Com ja esmentàvem abans, ni l'1-hexanol ni el 2-pentanol contribueixen a l'increment del nivell d'alcohols superiors als vins analitzats.

La concentració d'àcid acètic als vins va augmentar al voltant de 0.2 g L⁻¹ durant la realització de l'FML, arribant-se a obtenir concentracions finals en vi al voltant de 0.60-0.65 g L⁻¹ (taula 1.8). Aquest fet no és estrany donat que *O. oeni* és un bacteri làctic heterofermentatiu i sota condicions favorables la producció d'àcid acètic a partir de l'acetil-CoA és habitual. Els nivells que nosaltres vam enregistrar eren similars als trobats per altres autors, que generalment coincideixen en rebutjar els vins que superen els 0.8 g L⁻¹ d'àcid acètic. (Davis *et al.*, 1985; Henick-Kling, 1995). Cal tenir en compte, entre altres coses, que aquests assaigs foren efectuats sota condicions de laboratori. L'obtenció periòdica de mostres microbiològiques requeria l'agitació de les botelles de cultiu per homogeneïtzar que implicava una elevada oxigenació i afavoria la producció d'acetats.

Respecte als àcids grassos detectats en vi cal dir que, encara que es troben en quantitats traça, el seu baix nivell de detecció i la seva forta olor els fan contribuents essencials de l'aroma final del vi. Els àcids isovalèric, isobutíric i hexanoic no van incrementar els seus valors després de la realització de l'FML. La concentració dels àcids càpric i caprílic sí que va augmentar durant l'FML però sense arribar mai a nivells de 0.2 mg L⁻¹, quantitat elevada considerada com a negativa per algun autor (Miranda-López *et al.*, 1992). L'àcid que sí que va augmentar notablement, fins a unes vuit vegades, fou el 10-undecanoic. La seva presència no ha estat detectada abans en fermentacions víniques per la qual cosa no existeixen valoracions respecte al seu paper a nivell organolèptic.

La contribució dels esters a l'aroma final del vi també és notable destacant sobretot el lactat d'etil. Als vins que havien sofert l'FML, vam trobar al voltant de 50 mg L^{-1} en vins fermentats amb soques d'*O. oeni* i 60 mg L^{-1} quan s'utilitzava la soca homolàctica CH4. Valade i Laurent (1992) mostraren valors significativament superiors als nostres (190 mg L^{-1}). Fleet (1983) va descriure concentracions estàndard de lactat d'etil en vi negre al voltant de 50 mg L^{-1} . Aquesta disparitat de valors té la seva explicació en l'acoblament existent entre la producció de lactat d'etil i la d'àcid làctic. Això fa que els increments del lactat depenen directament de la realització de l'FML i que aquelles soques que més àcid làctic produeixen, bé siga per la seva activitat o senzillament perquè les concentracions inicials d'àcid màlic siguen superiors, més lactat d'etil produeixen. Els resultats obtinguts amb les soques assajades per nosaltres nivells superiors de lactat d'etil després de la realització de l'FML quan s'utilitzà la soca CH4 (taula 1.7). Aquests nivells de producció concorden amb el fet de la seva homofermentativitat (producció exclusiva d'àcid làctic en la via de degradació d'hexoses). La producció d'acetat d'etil també pot afectar l'aroma del vi quan els nivells sobrepassen els 200 mg L^{-1} (Amerine *et al.*, 1982). Aquest valor només fou assolit al vi fermentat per la soca VV5. Aquesta soca, que es caracteritzà per l'elevada producció d'acetats, no presentà però, nivells de producció d'àcid acètic notablement superiors als de les altres soques.

Altres esters presents al vi contribueixen activament al seu aroma final. L'acetat d'isoamil i el caproat d'etil són especialment importants per la nota fruitada que aporten al vi (Gil *et al.*, 1996). El nivell de producció d'aquests dos esters no fou uniforme amb totes les soques assajades (taula 1.7). Els increments més destacats foren els observats en els vins fermentats amb les soques CH4 i VV5 al cas de l'acetat d'isoamil, mentre que no eren d'importància per a la resta de soques. D'entre la resta d'esters identificats, el 2-fenil acetat i el 2-fenil benzoat foren els que mostraren increments més destacats després de la realització de l'FML (taula 1.6).

L'increment en el nivell d'esters als vins durant el desenvolupament de l'FML suggereix doncs la seva participació en l'aroma final del vi.

Respecte a altres components habitualment presents al vi, vam observar com aquells vins que havien sofert l'FML mostraven un notable increment del nivell de γ -butirolactona, al voltant de 0.4 mg L^{-1} . Aquest increment fou similar a l'observat per Valade i Laurent (1992) a vins que havien realitzat l'FML. Les diferències quantitatives detectades entre soques poden explicar-se en base a característiques individuals pròpies de

cadascuna d'elles. El 3-metionol, també anomenat 3-metiltio-1-propanol, fou identificat com a principal component sulfurat al vi. Tan sols els vins fermentats amb *O. oeni* TE3 o BM3 mostraven altes concentracions, sense passar de 1.14 mg L^{-1} en cap cas. Així, encara que la contribució del 3-metionol a l'aroma final del vi és important i sobrepassar certs límits és perjudicial, les quantitats que nosaltres vam detectar es trobaven dins de rangs acceptables per als vins negres, entre 0.5 i 2.0 mg L^{-1} (Miranda-López *et al.*, 1992). Però, tal vegada, un dels components més interessants trobats al vi fou el 2,3-butanodiol, trobat en les seves tres formes racèmiques (*eritro*, *treo* i *meso*) al vins assajats (taula 1.6). Totes les soques de bacteris làctics tenen la capacitat de metabolitzar anaeròbiament el piruvat produint quantitats variables de CO_2 , acetoïna, 2,3-butanodiol, àcid acètic, etanol i àcid làctic (Davis *et al.*, 1985; Wibowo *et al.*, 1985). Les elevades quantitats de 2,3-butanodiol trobades en aquests vins coincideixen amb l'absència de diacetil que per via enzimàtica s'hauria transformat en 2,3-butanodiol. Aquesta reducció espontània fou descrita per Martineau i Henick-Kling (1995) qui trobaren nivells de diacetil inferiors a 0.005 mg L^{-1} a diferents vins després de l'FML. La presència o absència d'aquests dos components volàtils vindrà doncs condicionada pel tipus de vi i pràctica enològica efectuada per a la seva elaboració. Un altre component habitualment trobat al vi després de l'FML, l'acetoïna, tampoc fou detectat a les nostres mostres. La seva desaparició podria ser deguda a la seva transformació en 2,3-butanodiol per l'acetoïn reductasa. Aquesta transformació contribuiria també a l'elevada quantitat de 2,3-butanodiol detectada als vins assajats (taula 1.7).

Com es pot deduir d'aquests resultats, les implicacions dels bacteris làctics en la producció de vi no són únicament degudes a la degradació de l'àcid màlic. Els vins inoculats amb bacteris làctics presenten característiques organolèptiques finals diferents als vins no inoculats. Aquests increments en alcohols superiors, esters etílics i àcids contribueixen a augmentar les propietats sensorials i la qualitat dels vins que han sofert l'FML. A més, cal destacar que sols algunes de les soques assajades contribueixen activament a la producció de components volàtils, la qual cosa resulta beneficiosa. Aquesta és la raó per suggerir la inducció de l'FML en vins negres només amb soques de bacteris làctics seleccionats. Aquestes soques hauran de ser prèviament assajades en fermentacions en planta pilot i determinar la seva possible contribució positiva a l'aroma final del vi.

Vi	ufc mL ⁻¹ en vi després de la inoculació	Dies necessaris per realitzar l'FML completament	Àcid màlic residual (g L ⁻¹)	Àcid làctic produït (g L ⁻¹)	Àcid acètic produït (g L ⁻¹)
Control (no inoculat)	-	-	3.826	-	-
<i>Oenococcus oeni</i> MA4	1.9x10 ⁵	30	0.094	2.293	0.210
<i>Oenococcus oeni</i> VV5	1.8x10 ⁵	23	0.134	2.222	0.202
<i>Oenococcus oeni</i> TE3	4.6x10 ⁵	35	0.090	2.203	0.132
<i>Oenococcus oeni</i> BM3	1.4x10 ⁵	29	0.104	2.161	0.164
<i>Lactobacillus</i> sp. CH4	3.0x10 ⁵	*	0.810	1.616	0.233

* La fermentació es va aturar després de 60 dies, sense que s'haguera exhaurit completament l'àcid màlic.

Taula 1.8. Paràmetres relatius a la fermentació malolàctica en vi realitzada per diferents soques seleccionades. T de creixement=20°C; pH₀=3.5.

2.3 ADAPTACIÓ DE SOQUES D'*Oenococcus oeni* AL CREIXEMENT EN VI

Com ja exposàvem a la introducció d'aquesta tesi, la readaptació de soques d'*O. oeni* al vi és un dels aspectes més importants quan es vol induir l'FML utilitzant cultius iniciadors prèviament identificats, caracteritzats i seleccionats.

La inoculació directa d'*O. oeni* en vi a partir de medis nutritius complexos com l'MLO (annex 1), en quantitats de 10⁵-10⁶ ufc mL⁻¹ és un procés que esdevé en un ràpid decreixement de la viabilitat cel·lular en pocs dies (Henick-Kling, 1988). Una forma de solucionar aquesta elevada mortalitat en inocular el cultius en vi consisteix en adaptar progressivament els bacteris a les noves condicions ambientals creixent-los prèviament en medis de pre-cultiu (Naouri *et al.*, 1989). Amb aquesta finalitat, es van preparar medis de pre-cultiu amb diferents composicions (annex 1) on es van inocular algunes soques seleccionades per analitzar la seva funcionalitat i possible aplicació amb la resta d'aïllats.

Una primera aproximació va consistir en la inoculació d'una soca de laboratori (*O. oeni* M42) en els medis A, B, C, D, 10 i P (figura 2.2) i determinar els seus paràmetres de creixement. A partir d'aquests resultats es pot deduir que la presència de vi al medi de pre-cultiu 10 incideix negativament sobre el creixement d'*O. oeni*. Així, la biomassa màxima assolida en aquest medi fou notablement inferior a la detectada amb la resta de medis.

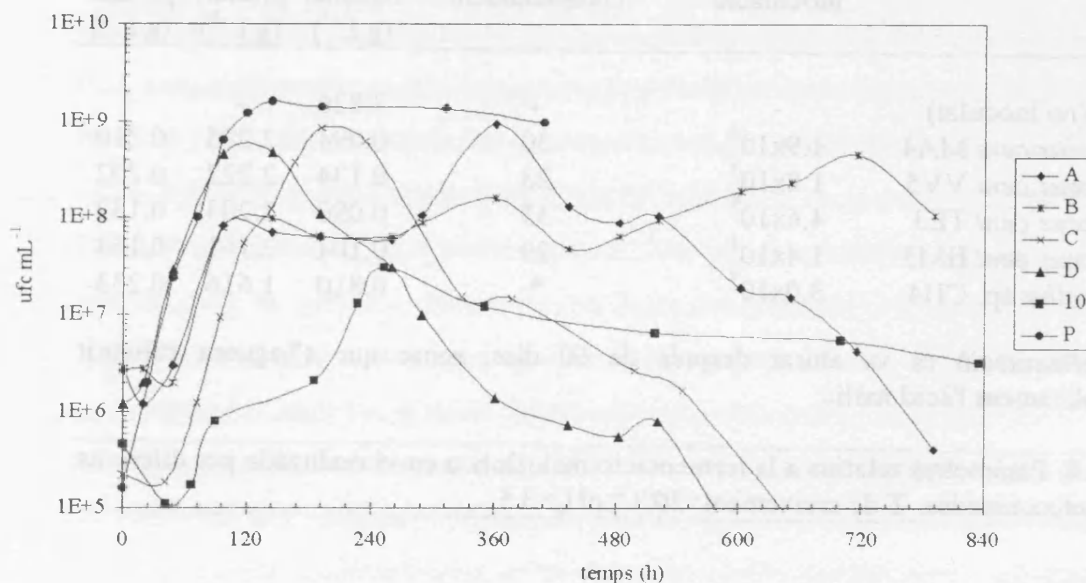


Figura 2.2. Creixement d'*O. oeni* M42 en diferents medis de pre-cultiu. T de creixement=28°C; pH₀=4.5 (4.0 al medi 10).

Aquest comportament no fou massa estrany tenint en compte que aquest medi és fonamentalment vi suplementat de components nutritius. L'estrès causat per la presència del vi tenia un efecte negatiu sobre el desenvolupament bacterià. Els resultats amb la resta de medis de pre-cultiu, on el vi es va substituir per most, foren més satisfactoris. Tanmateix, la composició de cadascun d'aquests medis afectava notablement sobre el creixement. Així, amb medis més rics, D i P, en menys d'una setmana s'arribava a obtenir nivells de biomassa màxima, mentre que a la resta eren necessaris entre una i dues setmanes. Amb tot, els nivells màxims de biomassa s'aconseguien amb la utilització del Medi P. Aquest medi, que inclou diferents vitamines a la seva composició, fou el més complet a nivell nutritiu de tots els assajats i això explica l'obtenció de resultats tan favorables (taula 1.9). A més, la utilització del Medi P presentava un avantatge addicional consistent en l'estabilitat dels nivells de biomassa. A la resta de medis de pre-cultiu, una vegada assolida la biomassa màxima, es produïa una ràpida i forta davallada en el número de viables que exigia un control més acurat del procés de creixement del bacteri i una menor flexibilitat en el moment del recolliment de les cèl·lules i inoculació en vi.

El Medi P permetia recollir un elevat número de cèl·lules viables, superior a 10^9 ufc mL⁻¹, durant dues setmanes (figura 2.2) per la qual cosa resultava interessant la seva utilització. Tanmateix, la decisió final per utilitzar un o altre medi de pre-cultiu no va ser presa tan sols en base a criteris de creixement al propi medi sinó que també es va avaluar l'adaptació dels cultius quan eren posteriorment inoculats en vi.

Medi	Paràmetres de creixement		
	g [h]	K [ufc mL ⁻¹]	dia (K)
A	10	$1.30 \cdot 10^8$	18
B	9	$4.50 \cdot 10^8$	30
C	5	$5.17 \cdot 10^8$	7
D	7	$4.70 \cdot 10^8$	6
10	16	$3.10 \cdot 10^7$	10
P	6	$1.60 \cdot 10^9$	6

Taula 1.9. Paràmetres del creixement d'*O. oeni* en diferents medis de pre-cultiu. T de creixement=28°C; pH₀=4.5 (4.0 al medi 10).

Aquesta inoculació es feia partint del volum adequat de cultiu al final de la fase logarítmica de creixement per aconseguir una biomassa inicial en vi al voltant de 10^5 - 10^6 ufc mL⁻¹.

Els vins inoculats amb cèl·lules prèviament crescudes als medis de pre-cultiu A, B, C i D no suportaven l'estrés en ser inoculades en vi i ràpidament veien disminuïdes les seves poblacions fins a nivells a partir de les quals no era possible una posterior recuperació (figura 2.3). Només els cultius que havien estat pre-cultivats en medi 10 i en Medi P podien suportar l'estrés en ser inoculades al vi i després d'una fase inicial de mortalitat que durava entre una i dues setmanes, creixien fins a assolir biomasses al voltant de 10^7 ufc mL⁻¹ i realitzaven l'FML. Les cèl·lules inoculades en medi de pre-cultiu 10 sofrien una elevada mortalitat inicial, arribant a nivells molt baixos, per després recuperar-se ràpidament. Això permetia arribar a nivells de 10^6 ufc mL⁻¹ 2-3 setmanes després de la seva inoculació. Aquest comportament ja fou descrit anteriorment per Pardo (1987). La mortalitat de les cèl·lules pre-cultivades en Medi P fou inferior però en canvi, la recuperació era també més lenta. Aquests períodes de mortalitat inicial al realitzar les inoculacions en vi disminuïen progressivament quan s'anava semblant les cèl·lules en vi fresc després de realitzar l'FML en el vi de procedència.

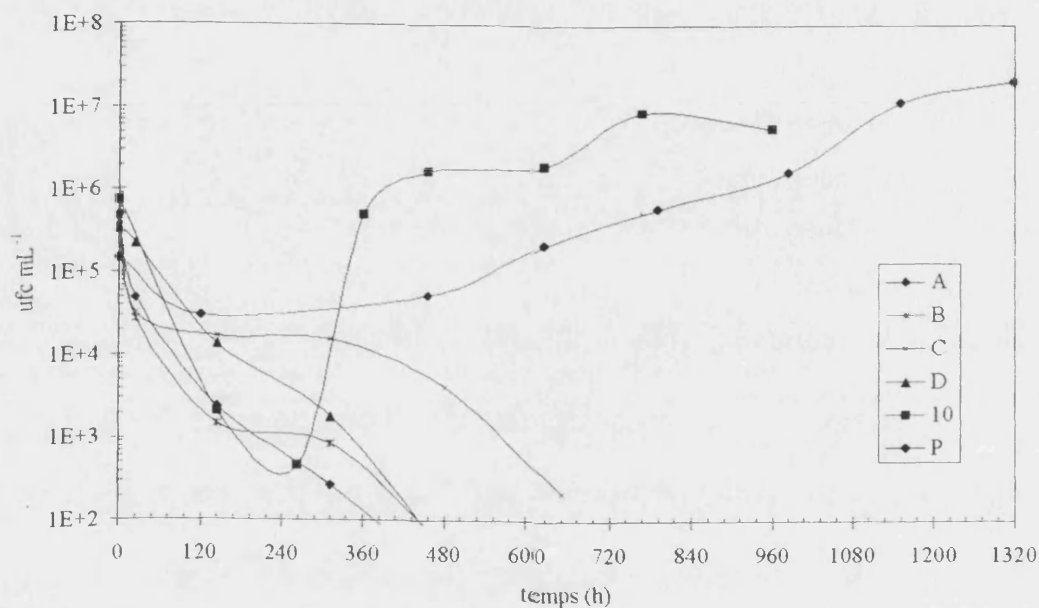


Figura 2.3. Creixement d'*O. oeni* M42 en vi inoculat des de diferents medis de pre-cultiu. T de creixement=20°C; pH₀=3.5.

El comportament observat amb la soca M42 es repetia utilitzant altres soques d'*O. oeni* dipositades a la col·lecció del nostre grup d'investigació així com amb les soques noves descrites en aquesta tesi. Aquesta capacitat d'adaptació era millor en Medi P que en medi 10 de manera global per a aquestes soques. Aleshores, fou el medi de pre-cultiu utilitzat durant la resta d'experiments d'aquesta tesi quan es volia inocular un vi amb cèl·lules d'*O. oeni*.

Amb la finalitat de continuar caracteritzant les soques aïllades en aquesta tesi (annex 3), una vegada crescudes en Medi P, eren inoculades en vi (annex 1). Quan creixien satisfactoriament i desenvolupaven l'FML en aquest vi a pH=3.5 eren resembrades en el mateix vi però a pH=3.4, per analitzar la seva capacitat d'adaptació a pH més baixos. Entre totes les soques assajades, només MA4, VV5, TV3 i BO3A eren capaces de desenvolupar-se i metabolitzar completament els 3.5 g L⁻¹ d'àcid L-màlic inicialment presents al vi. Tanmateix, els temps necessaris per degradar totalment l'àcid màlic augmentà fins a les 5-6 setmanes. Això suposava increments d'entre una i dues setmanes respecte als creixements en vi a pH=3.5, però permetia la utilització d'aquestes

soques en vins amb aquest valor de pH. Aquesta fou una més de les raons que ens van fer triar les soques MA4 i VV5 com a candidates per a la realització d'estudis posteriors al llarg d'aquesta tesi. Les quatre soques d'*O. oeni* que s'havien desenvolupat en vi a pH=3.4 foren també resembrades en vi a pH 3.3 per veure si era possible el seu desenvolupament però malauradament, després de tres mesos des de la inoculació, aquest no fou possible. Els intents directes d'inoculació de les soques crescudes en de vi a pH=3.5 fins a vi a pH 3.3 resultaren igualment infructuosos.

2.4 CONSERVACIÓ DE SOQUES D'*Oenococcus oeni* I MANTENIMENT DE LA SEVA ACTIVITAT MALOLÀCTICA

Una vegada es va aconseguir l'adaptació dels cultius al vi, interessava esbrinar quines eren les millors condicions per mantenir aquesta adaptació al llarg del temps. A banda de la sembra directa periòdica, amb els seus avantatges i inconvenients, nosaltres vam assajat tant la congelació com la liofilització dels cultius per veure la incidència del tractament sobre la supervivència de les soques així com sobre el manteniment de l'activitat malolàctica en vi.

Medis de pre-cultiu

El primer que vam intentar determinar fou la conveniència d'utilitzar un o altre medi per créixer les cèl·lules abans de sotmetre-les als tractaments de conservació. El creixement en medi sintètic MLO, que posava a l'abast dels bacteris tots els nutrients necessaris pel seu creixement a un pH òptim, possibilitava l'assoliment d'elevades quantitats de biomassa en temps curts (10^9 ufc mL⁻¹ en 2-3 dies). L'addició de components nutritius als medis de pre-cultiu (extret de llevat, Tween 80 i most entre altres) ja fou avaluada per Beelman *et al.* (1982) que van aconsellar la seva inclusió en la composició per la seva influència favorable sobre la producció de biomassa. La utilització de Medi P permetia assolir resultats tan bons o millors que els aconseguits amb l'MLO, tant pel que fa al temps necessari pel creixement, com a la biomassa final assolida (10^{10} ufc mL⁻¹ en 2-3 dies). Finalment, la utilització del mateix vi com a medi de pre-cultiu, requeria la prèvia adaptació de l'inòcul que havia de sembrar-se successivament en MLO i Medi P per disminuir l'elevada mortalitat produïda en una sembra directa des d'un medi de pre-cultiu sintètic. Les limitacions nutritives presents

al vi determinaven l'obtenció de biomasses inferiors (10^7 ufc mL⁻¹ en 15-20 dies), però en canvi millor adaptades que les crescudes en MLO per a la realització de l'FML sota les adverses condicions físico-químiques allí presents. Aquesta adaptació positiva també fou detectada als cultius crescuts en Medi P.

Tractaments de conservació

Però el que realment ens interessava en aquest punt del treball era comprovar l'efecte de la conservació (per congelació o liofilització) en si, sobre la supervivència i manteniment d'activitat dels cultius.

Les taxes de supervivència aconseguides amb les cèl·lules pre-cultivades en MLO i vi foren generalment millors que les obtingudes amb Medi P, als tractaments de congelació (taula 2.10). Tanmateix, la inoculació dels supervivents en vi (biomasses inicials al voltant de 10^5 ufc mL⁻¹) només conduïa a la realització de l'FML en 3-4 setmanes amb les soques pre.-cultivades en Medi P o vi, mentre que l'elevada mortalitat a les pre-cultivades en MLO ho impedia (taula 2.11). Aquests resultats ens farien descartar la utilització dels cultius congelats a partir d'MLO i suggereixen la utilització dels pre-cultivats en Medi P, perquè malgrat presentar una supervivència inferior a la obtinguda amb cèl·lules pre-cultives en vi, permetien reduir en 2-3 setmanes el temps necessari per a la seva preparació, amb els beneficis que això implica tant per l'abaratiment del procés de producció com per la disminució del perill de contaminació (taules 2.10; 2.11).

Les taxes de supervivència aconseguides amb els cultius liofilitzats (taula 2.10) foren similars a les obtingudes amb els congelats. Els resultats aconseguits en MLO i vi foren millors que amb Medi P. tanmateix, només les soques anteriorment pre-cultivades en Medi P i vi foren capaces de realitzar l'FML (taula 2.11).

L'anàlisi comparatiu efectuat entre els percentatges de supervivència per un mateix medi de pre-cultiu i soca, mostra com aquesta fou inferior als cultius liofilitzats en comparació amb els conservats per congelació a -20°C. Aquest resultat ja fou suggerit anteriorment per Henick-Kling (1991) qui va recomanar la congelació a -20°C (i fins i tot millor a -80°C). Aquest fet, conjuntament amb els resultats obtinguts a partir de l'estudi dels medis de pre-cultiu, ens faria triar el pre-cultiu en Medi P i la conservació per congelació com a mètode a seguir per a conservar les soques d'*O. oeni*.

Soca	Tractament de conservació									
	Congelació					Liofilització				
	MA4	TE3	VV5	BM3	TV3	MA4	TE3	VV5	BM3	TV3
Medi de cultiu										
MLO	78.9	95.2	92.3	72.0	82.0	57.9	27.4	23.3	7.7	3.3
Medi P	20.0	26.9	10.5	13.3	10.4	62.5	5.2	5.8	2.1	1.5
Vi	87.5	93.3	73.3	88.9	80.0	29.1	20.8	26.0	8.5	8.3

Taula 2.10. Percentatge de supervivència de soques d'*O. oeni* crescudes en diferents medis de cultiu després de ser soteses a conservació.

Soca	Tractament de conservació														
	Re sembra directa (control)					Congelació					Liofilització				
	MA4	TE3	VV5	BM3	TV3	MA4	TE3	VV5	BM3	TV3	MA4	TE3	VV5	BM3	TV3
Medi de cultiu															
MLO	*	*	5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	7	*	*
Medi P	3	3	3	3	4	3	4	3	3	4	3	3	3	3	3
Vi	3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3

* Soques que no van realitzar l'FML 7 setmanes després de la inoculació en vi.

Taula 2.11. Temps necessari per a la realització de l'FML en vi (setmanes) inoculant diferents soques d'*O. oeni* després de ser sotmeses a tractaments de conservació o re sembrades directament.

Tanmateix, si es compara el temps necessari per realitzar l'FML entre els cultius liofilitzats i els congelats, s'observa com no existeixen diferències notables (taula 2.11). La liofilització, si bé oferiria viabilitats inferiors que la congelació, permetia obtenir taxes de degradació de l'àcid L-màlic similars. D'altra banda, l'emmagatzemament, el transport i el manteniment dels cultius liofilitzats és menys costós i complicat que el dels glicerinat, que requereixen condicions de congelació permanents. Aquests resultats globals han de ser estudiats de manera detallada per a cada soca degut a un comportament diferenciat i propi de cadascuna d'elles. Així, per exemple, cal esmentar l'alta taxa de supervivència obtinguda amb cultius liofilitzats d'MA4 front a les de la resta de soques que ofereixen millors resultats davant la congelació (taula 2.10).

2.5 RECAPITULACIÓ

La fermentació malolàctica, desacidificació biològica de l'àcid màlic, és un procés que, de vegades, es desenvolupa de manera espontània al vi. Els causants d'aquest procés són el grup dels bacteris làctics, al quals pertanyen diferents espècies tant bacil·lars com cocoïdals que tenen en comú la capacitat de produir àcid làctic. D'entre tots aquests microorganismes, *Oenococcus oeni* (abans *Leuconostoc oenos*) és el que es troba millor preparat per desenvolupar l'FML, alhora que també és el més adient per a obtenir els resultats desitjats des d'un punt de vista biotecnològic.

El treball d'aquesta tesi començà amb un procés d'aïllament i caracterització de noves soques. En una primera etapa es va procedir a realitzar una identificació morfològica així com proves metabòliques per adscriure els aïllats a gènere. Totes les soques obtingudes, amb l'excepció de quatre que possiblement pertanyien al gènere *Lactobacillus*, foren incloses dins el gènere antigament anomenat *Leuconostoc*. Avui en dia, els microorganismes d'aquest gènere es troben repartits entre els gèneres *Leuconostoc*, *Weissella* i *Oenococcus*.

Una vegada assignat el gènere es va procedir a la identificació a nivell d'espècie realitzant diferents proves fisiològiques, creixement sota diferents condicions ambientals i assimilació de substrats, que ens va permetre identificar catorze soques com a *Oenococcus oeni*, amb diferents graus de concordança amb les dades de referència de l'espècie. Això ens va permetre la caracterització d'aquests nous aïllats.

Algunes d'aquestes soques, que complien tots els requisits descrits per a ser identificades com *Oenococcus oeni* foren utilitzades en assaigs de caracterització posteriors. Així, es van realitzar fermentacions en vi amb algunes d'elles a petita escala, es van extraure els components de la fracció volàtil i es van analitzar per cromatografia de gasos. Una anàlisi global dels resultats ens va permetre comprovar com la inoculació dels vins amb *O. oeni* contribuïa a incrementar la seva càrrega final en àcids, esters, alcohols superiors i altres components. Aquests augments solen associar-se amb una millor qualitat final del vi.

Una vegada aïllades les soques ens vam centrar en dos aspectes molt importants a nivell tecnològic. Un d'ells era la necessitat de readaptar les soques, acostumades a viure en medis sintètics al laboratori, al vi. Aquesta readaptació es va realitzar resembrant les soques en diferents medis de pre-cultiu, i una vegada crescudes ací passant-les a vi. Es van utilitzar diferents composicions de medis, arribant-se al final a concloure que el Medi P era el que millors resultats ofería a nivell global, tant en l'aconseguitment d'elevats nivells de biomassa com en l'adaptació que permetia als cultius per reeixir quan s'inoculaven en vi a pH 3.5. Els intents d'acostumar les soques a créixer a pH inferior només tingueren èxit amb quatre de les soques a pH=3.4, mentre que cap d'elles fou capaç de sobreviure i realitzar l'FML a valors inferiors.

L'altre aspecte que ens va interessar estudiar fou la possibilitat de conservar les soques a medi-llarg termini. Per això, es van créixer en tres medis diferents: l'MLO que era l'utilitzat habitualment al laboratori per créixer les soques, el Medi P que era el que millors resultats de readaptació al vi ens havia ofert, i el propi vi. Els resultats de supervivència aconseguits amb els cultius en MLO i vi foren generalment millors que amb Medi P. Tanmateix, la inoculació dels supervivents en vi només conduïa a la realització de l'FML amb les soques pre-cultivades en Medi P o vi, mentre que l'elevada mortalitat amb les pre-cultivades en MLO ho impedia. Aquests resultats foren igualment vàlids per als cultius sotmesos a congelació com als que foren liofilitzats. Tanmateix, el comportament no era igualment comparable per a totes les soques assajades, ja que algunes responien millor a un mètode de conservació que a l'altre. Amb tot, a nivell de laboratori foren utilitzats tots dos de manera habitual. A escala industrial, la liofilització seria el mètode triat pels avantatges tant a nivell econòmic com tecnològic que ofereix.

CAPÍTOL 3
METABOLISME DE CARBOHIDRATS

1 MATERIALS I MÈTODES

La soca microbiana utilitzada per a la realització dels experiments continguts en aquest capítol fou *Oenococcus oeni* M42 (annex 3).

1.1 ASSAIGS EN TAMPÓ

Els assaigs de degradació de sucres es van realitzar en tampó TF (annex 1) ajustat al valor de pH desitjat en tubs de vidre Pyrex de 25 mL. Els carbohidrats, glucosa o fructosa, es van esterilitzar per filtració i es van afegir al tampó abans de començar l'assaig per obtenir una concentració final de 10 g L⁻¹. Als assaigs en presència d'NADH o NADPH, aquests cofactors es van afegir al tampó a una concentració final de 0.1 mM. Les cèl·lules es van créixer en MLO (annex 1) fins obtenir la biomassa desitjada, es van centrifugar a 18000 x g 20 min 4°C i es van rentar dues vegades amb tampó TF. Aleshores es va resuspendre la quantitat de cèl·lules necessària per tenir una A_{600 nm}=1.2 en 20 mL de tampó. Els tubs es van incubar a 28°C durant 2-3 h i periòdicament es van realitzar mostreigs: 1.5 mL de mostra es van centrifugar a 18000 x g 20 min, es va descartar el sediment i el sobrenadant es va congelar a -20 °C fins a l'anàlisi química (veure apartat 1.3).

1.2 ASSAIGS EN MEDI DE CULTIU

L'estudi de la regeneració de cofactors NAD(P)H es va realitzar obtenint extreus crus a partir de cultius d'*O. oeni* M42 crescuts en MBC (annex 2) en diferents condicions d'airejat (annex 4) afegint-se les quantitats de carbohidrats i agents reductors que s'indiquen a cada experiment. Aleshores es va realitzar la quantificació dels cofactors presents als extreus i es va determinar l'activitat de diferents enzims implicats a la regeneració (tant dels presents a la via de formació de l'etanol com de les NAD(P)H-oxidases).

1.2.1 Obtenció dels extreus

El procediment de preparació fou el descrit per Zúñiga (1994) amb algunes modificacions. Un volum d'entre 100-200 mL del medi de cultiu es va centrifugar a 18000 x g 20 min 4°C. Aleshores, el sediment es va resuspendre en 1 volum de tampó fosfat potàssic 0.01 M pH 7.0 i es va centrifugar en les mateixes condicions. El procés es va repetir amb Tris-HCl 3.0 mM pH 7.0 i el sediment es va resuspendre en 1 mL de

Tris-HCl 6.4 mM pH 8.4. Aleshores es va transferir la suspensió cel·lular a un tub Corex de 30 mL i es va afegir una massa equivalent (al voltant d'1 g) de perles de vidre de 0.1 mm de diàmetre. La suspensió es va sotmetre a un procés intermitent de ruptura cel·lular en un agitador de tubs i incubació en bany de gel en períodes de 1 minut. El tractament es va repetir 10-15 vegades fins que la suspensió va adquirir una aparença viscosa. Aleshores es centrifugà a 18000 x g 15 min a 4 °C, es descartà el sediment i el sobrenadant, aliquotat en petits volums, es congelà a -20°C fins la seva utilització.

1.2.2 Determinació de proteïnes en extrems acel·lulars

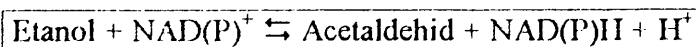
La concentració de proteïna als extrems es va mesurar utilitzant el sistema Pierce Micro BCA Protein Assay Reagent (Smith *et al.*, 1985) segons les instruccions del fabricant. Es van assajar diferents dilucions decimals dels extrems crus preparades en aigua Milli-Q (Millipore), utilitzant tubs d'assaig de vidre prèviament netejats amb mescla cròmica. Es va utilitzar seroalbúmina bovina per efectuar les rectes de calibrat. Les determinacions es van efectuar amb un espectrofotòmetre Beckman Model DU-7.

1.2.3 Determinació d'activitats enzimàtiques a la via de formació de l'etanol

La molècula de dos carbonis resultant de l'escissió de la ribulosa-5-P, l'acetil-P, en determinades condicions pot destinar-se a la formació d'etanol amb importants implicacions en el balanç redox (veure el capítol d'introducció). Per això vam mesurar les tres activitats enzimàtiques implicades a la seva via de producció (alcohol deshidrogenasa, aldehyd deshidrogenasa i fosfat acetil transferasa).

Alcohol deshidrogenasa (ADH)

La determinació de les activitats alcohol deshidrogenasa NAD⁺-depenent E.C. 1.1.1.1 i NADP⁺-depenent E.C. 1.1.1.2 (figura 1.1) es va realitzar segons Kägi i Vallee (1960) amb algunes modificacions. El mètode es basa en la detecció a 340 nm de la reducció del cofactor NAD⁺ (o NADP⁺), en un espectrofotòmetre Beckman Model DU-7, en presència d'etanol en un medi bàsic, d'acord amb la següent reacció:



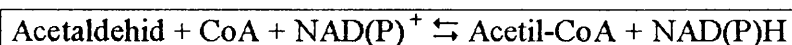
El reactius utilitzats foren els següents:

- Tampó Glicina-NaOH 0.2 M pH 9.0
- Etanol 95% (v/v)
- Solució estàndard d' NAD^+ (o NADP^+) 15 mM

La reacció començà afegint a una cubeta d'espectrofotometria 1.5 mL de solució tampó Glicina-NaOH, 1.5 mL de solució estàndard d' NAD^+ (o NADP^+), 0.1 mL d'aigua Milli-Q i 0.1 mL d'etanol. Es mesclà i es deixà equilibrar fins obtenir una lectura estable a 340 nm. Aleshores s'afegiren 10 μL d'alcohol deshidrogenasa i s'enregistrà l'increment d'absorbància per minut, deguda a l'augment d' NAD(P)H , fins arribar a una fase d'estabilització. Una vegada obtinguda una corba de calibració, es repetiren els assaigs canviant l'alcohol deshidrogenasa per 1-10 μL dels extrems. La concentració de proteïna a la mostra s'ajustà entre 5 i 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ depenent de l'extret. Els valors de les activitats representaven la mitjana aritmètica d'almenys tres determinacions amb el mateix extret. Les unitats d'activitat específica s'expressaren com a $\text{mmol (mg proteïna} \cdot \text{min)}^{-1}$.

Acetaldehid deshidrogenasa (ALDH)

L'activitat acetaldehid deshidrogenasa E.C. 1.2.1.10 (figura 1.1) es va determinar d'acord amb Andrews (1964) amb algunes modificacions. El mètode es basa en la reducció del cofactor NAD^+ (o NADP^+) a 340 nm^+ , en presència d'acetaldehid que actua com a substrat. La reacció catalitzada és la següent:



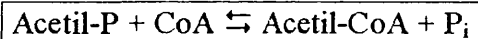
El procediment d'assaig, les quantitats de proteïna utilitzades i les unitats d'activitat utilitzades foren similars a les descrites per a la determinació de l'ADH però amb els següents reactius:

- Tampó fosfat 0.2 M amb 2-mercaptoetanol 10 mM pH 7.4
- Acetaldehid 50 mM
- Coenzim-A 50 mM
- Solució estàndard d' NAD^+ (o NADP^+) 5 mM
- H_2O Milli-Q (Millipore)

En un volum de reacció total de 3.0 mL s'afegiren 1.2 mL de tampó fosfat-mercaptoetanol, 1.2 mL d'H₂O, 300 µL d'acetaldehid, 100 µL de CoA i 100 µL de solució estàndard d'NAD⁺ (o NADP⁺). Quan s'obtenia una lectura estable s'afegien 100 µL de l'extret a assajar i s'enregistrava l'increment d'absorbància per minut fins que s'aturava la reacció. La quantificació de l'NADH (o NADPH) produït es realitzà per comparació amb patrons externs.

Fosfat acetil transferasa (PAT)

L'activitat fosfat acetil transferasa E.C. 2.3.1.8 es va determinar d'acord amb el mètode descrit per Kelly i Patchett (1996). L'assaig es fonamenta en la mesura de la descomposició de l'acetil fosfat en presència de coenzim A i arsenat. La conversió enzimàtica de l'acetil-P a acetil-CoA és el primer pas en via de formació d'etanol i permet a la cèl·lula la regeneració de dues molècules de NAD(P)H (figura 1.1).



Un volum de reacció total de 0.4 mL contenint 5 µmol de tampó Tris-HCl pH=8.0, 3 µmol d'acetil-P, 0.008 µmol de CoA i 100 µL de l'extret a assajar fou incubat 5 min a 30 °C. Aleshores s'afegien 25 µmol d'arsenat potàssic pH=8.0 i es deixava incubar 10 min més. En aquest moment, l'acetil-P residual es determinava de la següent manera: s'afegia 1 mL d'hidroxilamina (28 % v/v en H₂O) neutralitzada amb NaOH (14% v/v en H₂O) i es deixava incubar 10 min a temperatura ambient. Aleshores es mesclava aquesta solució amb 1.5 mL d'una solució àcida de FeCl₃ (volums iguals de FeCl₃ 5 % v/v en HCl 0.1 M, TCA 12 % v/v en H₂O i HCl 3 M). Una vegada mesclat, es centrifugava a 11500 x g 1 min per eliminar el sediment i es mesurava l'absorbància a 540 nm. Com a solució estàndard s'utilitzaven concentracions patró d'àcid acetohidroxàmic i acetil-CoA.

Les quantitats de proteïna utilitzades i les unitats d'activitat utilitzades foren similars a les utilitzades per a la determinació de l'alcohol deshidrogenasa. Les unitats d'activitat específica s'expressaren com a µmol d'acetil-P (mg proteïna·min)⁻¹.

1.2.4 Determinació de les activitats NADH I NADPH oxidasa

Un sistema de regeneració de cofactors alternatiu, habitualment present als bacteris làctics i actiu en presència d'oxigen, el constitueixen les NAD(P)H oxidases (veure introducció). Les activitats NADH i NADPH-oxidasa es van determinar d'acord amb el mètode descrit per Sakamoto *et al.* (1996) amb algunes modificacions. L'assaig es fonamenta en l'oxidació del cofactor NAD⁺ (o NADP⁺) que és detectada per un decreixement de l'absorbància a 340 nm.

La reacció s'iniciava afegint 2.9 mL de la següent solució en una cubeta d'espectrofotòmetre de 3.0 mL: tampó fosfat-potàssic 50 mM, EDTA 1 mM i NADH (o NADPH) 0.1 mM. Als assaigs amb flavin adenin dinucleòtid (FAD), aquest es va afegir a una concentració final de 8 µM. Es deixà equilibrar fins obtenir una línia basal estable i aleshores s'afegiren 100 µL de l'extret acel·lular i s'enregistrà el decreixement d'absorbància fins que s'aturà la reacció. La quantificació de l'NADH (o NADPH) reduït es realitzava en base a patrons externs.

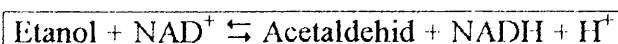
Les quantitats de proteïna utilitzades i les unitats d'activitat utilitzades foren les descrites per a la determinació de l'alcohol deshidrogenasa. Les unitats d'activitat específica s'expressaren com a µmol de cofactor (mg proteïna·min)⁻¹.

1.2.5 Quantificació de cofactors

La quantificació dels cofactors, tant en les seves formes oxidades com en les reduïdes, ens permet determinar els valors de la relació forma oxidada/forma reduïda i veure la seva influència sobre el catabolisme dels carbohidrats (veure introducció).

Quantificació d'NAD⁺

La quantificació de l'NAD⁺ es va realitzar d'acord amb el mètode descrit per Klingenberg (1985) amb algunes modificacions. El mètode es basa en la reducció de l'NAD⁺ per l'enzim alcohol deshidrogenasa de llevat E.C. 1.1.1.1.



La producció d'NADH es detectà per fluorimetria en un luminòmetre Perkin-Elmer Model LS-50 amb una longitud d'ona d'excitació a 340 nm i una d'emissió a 460 nm. Per afavorir la formació d'NADH, la reacció es desenvolupà en un tampó bàsic amb

hidrazina a la seva composició. Els reactius necessaris per realitzar l'assaig s'especifiquen a continuació.

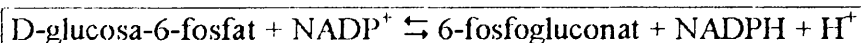
- Tampó Tris base 0.1 M hidrat d'hidrazina 0.4 M pH 8.5
- Etanol 95% (v/v)
- Alcohol deshidrogenasa de llevat E.C. 1.1.1.1, solució de 3 mg mL⁻¹
- Solució estàndard d'NAD⁺ (0.1 mM)

L'assaig començà mesclant en la cubeta de fluorimetria 1.5 mL de Tris-hidrat d'hidrazina i 7.5 µL d'etanol. Es deixà 5-10 min fins què s'equilibrà la temperatura i aleshores s'afegiren 3.5 µL d'alcohol deshidrogenasa. S'homogeneïtzà i es deixà equilibrar 5-10 min més fins què donà una lectura estable. Aleshores, s'afegiren 7.5 µL de la solució estàndard d'NAD⁺ o de l'extret a assajar. La reacció es desenvolupa ràpidament, 1-2 min, donant-se un increment en la fluorescència. L'assaig s'aturà quan es detectà una emissió de fluorescència constant. L'evolució del procés fou enregistrada de forma constant i gravada en ordinador.

La quantificació es realitzà per interpolació amb patrons externs (solució estàndard d'NAD⁺) a diferents concentracions. La concentració d'NAD⁺ en la solució estàndard es va determinar segons es descriu a l'apartat de preparació de solucions estàndard de cofactors (pp. 78). La concentració de proteïna a la mostra s'ajustà entre 5 i 20 µg mL⁻¹ depenent de l'extret. Els valors de les activitats representaven la mitjana aritmètica d'almenys tres determinacions amb el mateix extret.

Quantificació d'NADP⁺

La quantificació de l'NADP⁺ es va realitzar d'acord amb el mètode descrit per Klingenberg (1985) amb algunes modificacions. El mètode es basa en la reducció de l'NADP⁺ per l'enzim glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa E.C. 1.1.1.49.



La producció d'NADPH fou detectada per fluorimetria de la manera abans esmentada per a l'NADH amb el següents reactius:

Tampó TME (Trietanolamina-HCl 0.05 M MgCl₂ 10 mM EDTA 5 mM pH 7.4)

Glucosa-6-fosfat 0.1 M

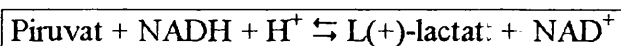
Glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa E.C. 1.1.1.49, solució de 0.2 mg mL⁻¹

Solució estàndard d'NADP⁺ (50 μM)

L'assaig i la quantificació es realitzà de la manera descrita per a l'NAD⁺.

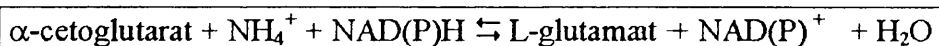
Quantificació d'NAD(P)H

La quantificació d'NAD(P)H es va realitzar d'acord amb el mètode descrit per Klingenberg (1985) amb algunes modificacions. La lactat deshidrogenasa catalitza la conversió del piruvat a L(+)-lactat en presència d'NADH segons la següent equació:



En presència d'un excés de piruvat, l'NADH es quantitativament oxidat a NAD⁺. L'NADH pot ser substituït per l'NADPH però la velocitat de reacció és cent vegades inferior.

La glutamat deshidrogenasa catalitza la reducció de l'α-cetoglutarat a glutamat en presència de ions d'amoni i nicotin adenin dinucleòtids, segons l'equació:



En presència d'un excés d'α-cetoglutarat i d'ions amoni, l'NAD(P)H es quantitativament oxidat a NAD(P)⁺. Com esta reacció es desenvolupa després de la de l'LDH, es presumeix que tot l'NADH s'ha consumit i tot l'increment de fluorimetria és degut a l'NADPH.

La disminució de fluorescència deguda al consum de l'NADH o de l'NADPH fou detectada de la mateixa manera a la descrita abans per la quantificació de l'NAD⁺. El reactius utilitzats per l'assaig es descriuen a continuació:

- Tampó TEA (trietanolamina-HCl 0.1M pH 7.4)
- Solució estàndard de piruvat 0.3 M^1
- Solució estàndard d' α -cetoglutarat 0.3 M^1
- Sulfat amònic 3.0 M
- Solució estàndard d'NADH (0.1 mM) en tampó TEA pH 8.2
- Solució estàndard d'NADPH (0.1 mM) en tampó TEA pH 8.2
- Lactat-deshidrogenasa E.C. 1.1.1.27, solució de 0.2 mg mL^{-1}
- Glutamat-deshidrogenasa E.C. 1.4.1.3, solució de 4.0 mg mL^{-1}

¹ Les solucions estàndard de piruvat i l' α -cetoglutarat es neutralitzaven a pH 6.0 amb NaHCO_3 1 M i es conservaven congelades a -20°C . Al moment de realitzar l'assaig es preparava una solució de substrats mesclant 0.1 mL de les solucions de piruvat, α -cetoglutarat i sulfat amònic pesat en fresc.

L'assaig començà mesclant en la cubeta 1.5 mL de tampó TEA pH 7.4 i $7.5 \mu\text{L}$ de la solució de substrats. Quan la línia base s'estabilitzà, s'afegiren $7.5 \mu\text{l}$ d'NADH que actuaven com a estàndard extern. Es produïa un increment de fluorescència que després de 5-10 min s'estabilitzava. Aleshores s'afegien $3.5 \mu\text{l}$ de lactat deshidrogenasa. S'homogeneïtzava i es deixava incubar fins que el valor de la fluorescència tornava a estabilitzar-se. El decreixement en la fluorescència després de l'addició de l'enzim era proporcional a la quantitat d'NADH afegida com a estàndard extern. El mateix procediment es repetia canviant l'NADH per l'NADPH i la lactat deshidrogenasa per la glutamat deshidrogenasa. Quan es tornà a obtenir una lectura de fluorescència estable, s'aturà l'assaig. Una vegada assajats els estàndards, es repetia el mateix procediment per als extrets, ajustant prèviament la quantitat total de proteïna d'aquests a valors entre 5 i $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Tot el procés fou enregistrat i les dades foren gravades en ordinador per al seu estudi posterior.

La quantificació es realitzà per interpolació amb patrons externs (solucions estàndard d'NADH i NADPH) a diferents concentracions. Les concentracions d'NADH i NADPH en la solució estàndard es van determinar segons es descriu a l'apartat de preparació de solucions estàndard de cofactors. Totes les quantificacions es van realitzar per triplicat.

Solucions estàndard de cofactors

L'estandardització de les concentracions de cofactors a les solucions patró es van realitzar amb un espectrofotòmetre Beckman Model DU-7 d'acord amb el mètode descrit per Klingenberg (1985) amb algunes modificacions.

NAD⁺

Es preparà una mescla de reacció amb tampó Tris-hidrat d'hidrazina 3.0 mL, etanol 100 µL, NAD⁺ 3-10 µL i es deixà equilibrar 2-3 min fins obtenir un valor d'absorbància estable a 340 nm. Aleshores, es va afegir ADH 10 µL i es deixà reaccionar 10-20 min fins que s'aturà l'increment de l'absorbància. El mateix assaig es realitzà canviant l'NAD⁺ per H₂O. L'increment d'absorbància per µL de solució estàndard d'NAD⁺ es prenia com a referència per a la normalització de la quantitat de cofactor. Aquesta estandardització es realitzà per triplicat cada vegada que es necessita utilitzar el cofactor en la realització dels assaigs abans descrits.

NADP⁺

L'estandardització de la solució d'NADP⁺ es realitzà de manera similar a la de l'NAD⁺, utilitzant tampó TME 3.0 mL, G-6-P 20 µL G-6-P-deshidrogenasa 10 µL i NADP⁺ 3-10 µL.

NAD(P)H

La concentració dels estàndards d'NADH i NADPH es va normalitzar de manera similar a la de l'NAD⁺ però enregistrant el decreixement de l'absorbància a 340 nm. Els reactius utilitzats foren: tampó TEA 3.0 mL, solució substrat α-cetoglutarat-piruvat-NH₄⁺ 50 µL i NADH (o NADPH) 3-10 µL. Per a la normalització de l'NADH utilitzà la lactat-deshidrogenasa 10 µL i per a l'NADPH la glutamat-deshidrogenasa 10 µL.

1.3 ANÀLISI QUÍMICA I ESTEQUIOMÈTRICA

La quantificació dels productes i substrats de fermentació es va realitzar per HPLC (annex 2). Les dades resultants es van rectificar tenint en compte els volums d'evaporació i mostreig. Per a la realització d'estequiometries es van tenir en compte els productes quantificats i es va assumir la producció d'un mol de CO₂ a partir de cada mol d'hexosa consumida a la via heterolàctica. El glicerol i el manitol només es van incloure als càlculs estequiomètrics quan es va detectar la seva presència per HPLC.

2 RESULTATS I DISCUSSIÓ

Com ja comentàvem al capítol 2, la optimització de les condicions de cultiu d'*Oenococcus oeni*, és un dels objectius d'aquesta tesi. Al present capítol pretenem fer una anàlisi més detallada d'aquestes condicions, centrant-nos en el metabolisme dels carbohidrats i en les condicions físico-químiques en que es produeix. El creixement d'*Oenococcus oeni* està acoblat a l'existència de carbohidrats, glucosa i fructosa principalment, al medi de cultiu a partir dels quals es desenvolupa, utilitzant-los per obtenir energia en una fosforilació a nivell de substrat (veure introducció). Els productes finals del catabolisme dels carbohidrats són principalment l'àcid làctic, l'àcid acètic, l'etanol i el CO₂ però no sempre s'obtenen en les mateixes proporcions finals. El percentatge de producció d'aquests compostos està relacionat amb els requeriments de poder reductor dins la cèl·lula. Aquests requeriments poden cobrir-se bé mitjançant la metabolització de l'hexosa per la ruta heterolàctica, bé en rutes catabòliques alternatives (figura 1.1) o bé aprofitant les condicions oxido-reductores del seu medi ambient (aeròbic o anaeròbic). I és que la regeneració dels cofactors NADH i NADPH resulta clau al metabolisme de carbohidrats en *O. oeni*. El creixement i el manteniment del metabolisme bacterià depenen de les reaccions d'oxido-reducció de cofactors tant per a la biosíntesi de metabòlits intermedis com per a la generació d'equivalents de reducció. Així, la presència d'un tipus d'hexosa (glucosa o fructosa) i les condicions d'airejat (aerobiosi o anaerobiosi) permetran al microorganisme desenvolupar-se d'una manera més o menys satisfactòria.

Aleshores, en una primera fase del estudi, ens interessava estudiar quins eren els efectes que tenien aquests dos factors: tipus de carbohidrat i atmosfera de creixement, sobre el desenvolupament d'*O. oeni* M42. Per realitzar les comparacions oportunes, vam utilitzar un multi-biorreactor Biostat-Q (annex 4), que ens permetia efectuar quatre fermentacions simultànies partint d'un mateix cultiu, en condicions fisiològiques idèntiques. Així vam assajar el creixement d'*O. oeni* M42 en MBC amb glucosa o amb fructosa, en aerobiosi o en anaerobiosi per esbrinar quina condició resultava més adient per obtenir elevades quantitats de biomassa en el menor temps possible.

2.1 EFECTE DEL CREIXEMENT ANAEROBI SOBRE EL METABOLISME DE LA GLUCOSA

Al primer dels tancs de fermentació es va inocular *O. oeni* M42 en medi MBC amb glucosa sota un flux continu de nitrogen estèril. Aquest flux ens permetia assegurar una atmosfera anaeròbia on la pressió parcial d'oxigen es trobava sempre per sota un 5%. En aquest assaig efectuat amb la pràctica absència d'oxigen, la glucosa present al medi de cultiu fou completament metabolitzada a través de la ruta heterolàctica de degradació de les hexoses (figura 1.1) i es va possibilitar una elevada producció de biomassa (figura 3.1).

La quantificació dels metabòlits resultants per HPLC mostrà com aquesta elevada productivitat es trobava íntimament relacionada amb una important activitat de la via de formació de l'etanol (VFE) que, sota aquestes condicions anaeròbies, proporcionava la ruta regenerativa de NAD(P)H més important associada a la fermentació de carbohidrats a *O. oeni* (taula 3.1). Aquesta activitat implica la reoxidació de dues molècules d'NAD(P)H i conseqüentment satisfà els requeriments de poder reductor existents a l'interior cel·lular generats pel consum d'NAD(P)⁺ efectuat per la glucosa-6-P deshidrogenasa i per la gluconat-6-P deshidrogenasa (figura 1.1).

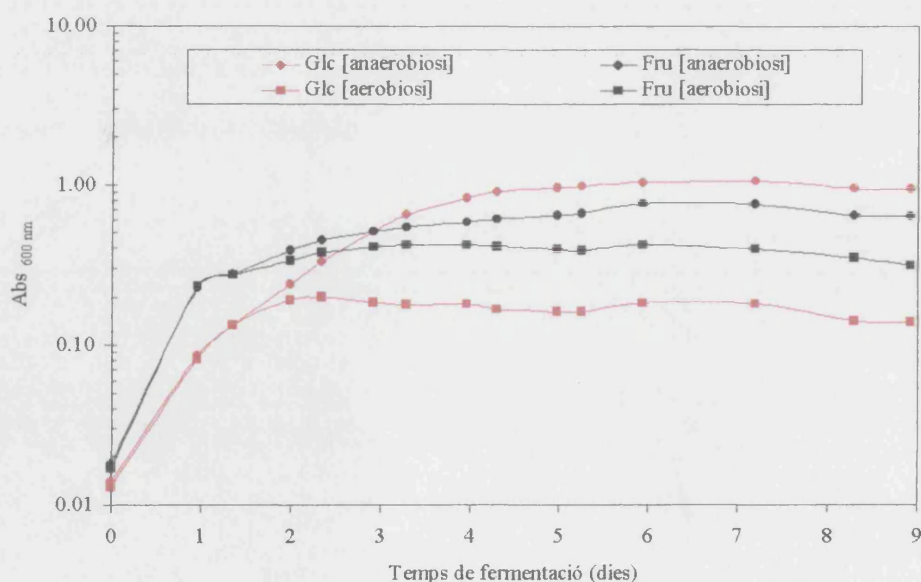


Figura 3.1. Creixement d'*O. oeni* M42 en MBC amb glucosa o fructosa (55 mM) sota diferents condicions d'airejat (flux d'aire o de nitrogen). T=28 °C; pH₀=4.8; agitació=200 rpm.

L'anàlisi dels resultats estequiomètrics (taula 3.1) mostra l'existència d'un metabolisme balancejat on 55 mM glucosa foren dedicats al creixement del bacteri i a la producció d'energia. Com a producte de la metabolització del carbohidrat es produïren quantitats equimoleculares d'àcid làctic i etanol així com importants nivells d'àcid acètic. Aquesta producció d'àcid acètic a partir de la glucosa en condicions anaeròbies, en principi no esperada, va suposar la generació d'energia (ATP) que permetia a *O. oeni* M42 un creixement tan satisfactori. Resultats similars als trobats per nosaltres van ser descrits per Murphy i Condon (1984) amb *Lactobacillus plantarum* en les mateixes condicions de creixement. Una observació en detall de l'estequiometria mostra una pèrdua de carboni que nosaltres atribuïm a la incorporació de la glucosa a la biomassa cel·lular així com a la producció de compostos no identificats, a banda del ja sabut CO₂ (taula 3.1). Veiga-da-Cunha *et al.* (1992; 1993) van trobar un altre producte d'importància quantitativa, l'eritritol, que es produïa a partir de la glucosa com a conseqüència d'una via alternativa de regeneració de cofactors. Les nostres determinacions per HPLC intentant trobar aquest poliòl van ser insatisfactòries ja que només era detectat en quantitats traça, per la qual cosa pensem que les dades d'elevada producció mostrades per aquests investigadors són específiques de les condicions i/o soques per ells assajades.

2.2 EFECTE DEL CREIXEMENT AEROBI SOBRE EL METABOLISME DE LA GLUCOSA

Quan el creixement d'*O. oeni* es realitzà en un segon biorreactor amb un flux continu d'aire que possibilitava una pressió parcial d'oxigen elevada (condicions aeròbies), el creixement amb glucosa fou força dolent, degut a una escassa utilització d'aquest carbohidrat (figura 3.1). Sota aquestes condicions, menys del 10% de la glucosa inicialment disponible fou metabolitzada i les petites quantitats d'acetil-CoA disponibles es van destinar de manera majoritària a la producció d'ATP *via* l'acetat quinasa. També es van detectar baixos nivells d'etanol i glicerol (taula 3.1).

L'absència d'un sistema actiu per a la regeneració del NAD(P)H fa que sota aquestes condicions, la producció de NAD(P)⁺ no siga suficient per suportar un creixement acceptable i com a conseqüència s'ature el metabolisme cel·lular.

AIREJAT	SUBSTRAT	PRODUCTES					
Anaerobiosi	Glucosa →	Làctic	Acètic	Glicerol	Etanol		
	Consumida						
mM	55.00	44.42	21.67	0.20	45.80	Via heterolàctica	
Estequiometria	1.00	0.81	0.39	0.00	0.83		
Aerobiosi	Glucosa →	Làctic	Acètic	Glicerol	Etanol		
	Consumida						
mM	4.27	5.27	3.56	0.29	1.09	Via heterolàctica	
Estequiometria	1.00	1.23	0.83	0.07	0.26		
Anaerobiosi	Fructosa →	Mannitol	Altres				
	consumida						
mM	55.00	36.88	18.12	Mannitol			
Estequiometria	1.00	0.67	0.33	Deshidrogenasa			
	Fructosa	Làctic	Acètic	Glicerol	Etanol		
	consumida						
mM	18.12 →	20.15	31.09	0.00	0.44	Via heterolàctica	
Estequiometria	1.00	1.11	1.72	0.00	0.02		
Aerobiosi	Fructosa →	Mannitol	Altres				
	consumida						
mM	38.43	20.41	18.02	Mannitol			
Estequiometria	1.00	0.53	0.47	deshidrogenasa			
	Fructosa	Làctic	Acètic	Glicerol	Etanol		
	consumida						
mM	18.02 →	12.68	24.41	0.29	0.85	Via heterolàctica	
Estequiometria	1.00	0.70	1.35	0.02	0.05		

Taula 3.1. Quantificació de substrats i productes en el metabolisme de carbohidrats d'*O. oeni* M42. Creixement en MBC amb glucosa o fructosa (55 mM) sota diferents condicions d'airejat (flux d'aire o de nitrogen). T=28 °C; pH₀=4.8; agitació=200 rpm.

Per comprovar la funcionalitat de les NADP(H) oxidases en aquesta soca, es van realitzar assaigs d'activitat enzimàtica utilitzant com a substrat cofactor NADH (o NADPH) en presència i en absència de FAD (taula 3.2). Donat que les activitats NAD(P)H oxidases són induïdes per la presència d'O₂ en altres bacteris làctics, no ens va estranyar l'absència d'activitat en extrems anaerobis. Els nivells detectats en aerobiosi foren molt baixos (amb millors resultats en presència de FAD) respecte als trobats amb altres soques (Sakamoto i Komagata, 1996). De qualsevol manera els nivells detectats amb la soca *O. oeni* M42 es mostraven insuficients per reoxidar tot l'NAD(P)H produït a les primeres etapes de la via heterolàctica. La presència d'aquestes NAD(P)H-oxidases

és la que possibilita la reducció dels cofactors en altres soques de bacteris làctics i permet creixements òptims en presència d'oxigen (Lucey i Condon, 1986; Sakamoto i Komagata, 1996). L'absència d'un sistema actiu de NAD(P)H-oxidases no és un fet extraordinari als bacteris làctics i ha estat també descrita a altres soques per diferents autors (Condon, 1987; Nuraida *et al.*, 1992; Warriner i Morris, 1995).

Atmosfera	$\mu\text{mol de cofactor (mg proteïna}\cdot\text{min)}^{-1}$			
	Act. NADH-oxidasa		Act. NADPH-oxidasa	
	- FAD	+ FAD	- FAD	+ FAD
Anaerobiosi	nd	nd	nd	nd
Aerobiosi	nd	0.318	0.614	0.823

nd: no detectat

Taula 3.2. Activitat específica de les NAD(P)H-oxidases amb i sense FAD. Extrets obtinguts a partir d'*O. oeni* M42 crescut en medi MBC amb glucosa sota diferents atmosferes (aerobiosi per flux d'aire o anaerobiosi per flux de nitrogen). T=28 °C; pH₀=4.8; agitació=200 rpm.

Si les NADP(H) oxidases d'*O. oeni* M42 no estaven funcionant satisfactòriament, tota la responsabilitat de regeneració de l'NAD(P)H requeria sobre els enzims de la VFE (fig. 1.1). Haurien de ser l'ADH i l'ALDH les encarregades de reoxidar les dues molècules d'NAD(P)H generades per les deshidrogenases a les etapes inicials de la via heterolàctica.

Si la VFE era funcional en condicions anaeròbies però no funcionava en aerobiosi, el següent punt que ens interessa esbrinar era saber si aquest sistema s'inhibia per l'oxigen o bé no era sintetitzat en la seva presència. Per aclarir aquest aspecte, es va realitzar el següent experiment. Es va créixer *O. oeni* M42 en 1 L de medi MBC (annex 1) amb glucosa com a única font de carboni fins arribar a una $A_{600\text{nm}}=0.3$ en una atmosfera saturada de N₂. Aleshores, es van transferir asèpticament 200 mL del cultiu a un altre fermentador i es van cultivar amb un flux constant d'aire (condicions aeròbies). El creixement al fermentador amb N₂ va continuar de manera normal fins arribar a $A_{600\text{nm}}=1.1$ mentre que a l'airejat (amb una elevada pressió parcial d'oxigen) es va aturar d' immediat el creixement cel·lular. Es van obtenir extrets acel·lulars a partir de les mostres obtingudes abans i després de la transferència de les cèl·lules a les condicions aeròbies. Es van realitzar assaigs dels enzims que intervenen a la VFE i es va comprovar la pèrdua de l'activitat regeneradora de les cèl·lules crescudes en anaerobiosi quan entraven en contacte amb l'oxigen. L'activitat de les alcohol deshidrogenases NAD⁺-depenent i NADP⁺-depenent es reduïa notablement a les

cèl·lules crescudes al fermentador en condicions aeròbiques mentre que en anaerobiosi, l'activitat enzimàtica continuava (taula 3.3) i permetia l'obtenció d'alts nivells de biomassa. Els nivells d'activitat detectats als extrems crescuts en presència de nitrogen a la fase estacionària eren menors que els enregistrats amb les cèl·lules en fase logarítmica de creixement. Així doncs, sembla confirmar-se que és la presència de l'oxigen al medi la que produeix la inhibició de la VFE i impedeix el desenvolupament d'*O. oeni* M42.

Leonardo *et al.* (1996) van mostrar com en *Escherichia coli*, els enzims involucrats a la VFE s'indueïen en condicions anaeròbiques, i només estaven presents en nivells basals durant el creixement aerobi. Nosaltres hem vist en *O. oeni* M42 que els enzims de la VFE, la ruta clau en el reciclatge de l'NAD(P)H, perden l'activitat en aerobiosi i el consum d'aquests cofactors s'atura, s'acumula NAD(P)H a l'interior cel·lular i es paralitza el desenvolupament bacterià.

Els mateixos resultats es van obtenir en assajar els altres enzims implicats a la VFE, fosfat acetil transferasa i aldehyd deshidrogenasa (taula 3.3). Tanmateix, la baixa velocitat de reacció d'aquests dos enzims fa que siga l'ADH el principal mecanisme de reoxidació de cofactors. De fet, els intents de quantificar la PAT donaren resultats insatisfactoris amb tots els extrems assajats degut a la seva baixa concentració.

	$\mu\text{mol (mg proteïna}\cdot\text{min)}^{-1}$		
	N ₂ (fase logarítmica)	N ₂ (fase estacionària)	Airejat (aerobiosi)
ADH ¹ (NAD ⁺)	718	21	nd
ADH ¹ (NADP ⁺)	89	2	nd
ALDH ² (NAD ⁺)	0.338	0.163	nd
ALDH ² (NADP ⁺)	0.023	0.042	nd
PAT ³ (NAD ⁺)	nd	nd	nd
PAT ³ (NADP ⁺)	nd	nd	nd

nd: no detectat

¹ ADH: alcohol deshidrogenasa

² ALDH: aldehyd deshidrogenasa

³ PAT: fosfat acetil transferasa

Taula 3.3. Activitat específica dels enzims de la VFE. Extrems obtinguts a partir d'*O. oeni* M42 crescut en MBC amb glucosa sota diferents atmosferes (aerobiosi per flux d'aire o anaerobiosi per flux de nitrogen). T=28 °C; pH₀=4.8; agitació=200-250 rpm.

Com queda descrit fins ara, l'estat d'oxido-reducció dels cofactors té una importància cabdal al metabolisme de carbohidrats en aquest bacteri. Per això, vam extraure els

cofactors a partir de cultius d'*O. oeni* crescuts en glucosa en anaerobiosi i en aerobiosi i vam procedir a la seva quantificació. Com es veu a la taula 3.4, els nivells de NAD^+ foren essencialment els mateixos als tres extrems acel·lulars assajats, mentre que la concentració de NADP^+ a l'extret obtingut a partir del cultiu amb nitrogen en fase de creixement logarítmic només duplicava els valors en fase estacionària.

Atmosfera	Concentració (mmol·mg proteïna ⁻¹)			Ratio NAD(P) ⁺ /NAD(P)H
	NAD ⁺	NADP ⁺	NAD(P)H	
Anaerobiosi (N ₂) fase estacionària	12.84	6.36	1.35	14.23
Anaerobiosi (N ₂) fase logarítmica	12.54	12.99	1.44	17.67
Aerobiosi (airejat)	12.88	6.61	5.01	3.89

Taula 3.4. Concentració dels cofactors i ratio $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$. Extrems obtinguts a partir d'*O. oeni* M42 crescut en MBC amb glucosa sota diferents atmosferes (aerobiosi per flux d'aire o anaerobiosi per flux de nitrogen). T=28 °C; pH₀=4.8; agitació=200-250 rpm.

Tanmateix, quan vam quantificar el total de cofactors reduïts (NADH + NADPH), si que es van observar diferències significatives entre els diferents extrems (taula 3.4). Als extrems obtinguts a partir dels cultius en aerobiosi, els nivells eren quasi quatre vegades superiors als corresponents a cultius anaerobis. En anaerobiosi, el sistema de reoxidació de cofactors actuen i impedeixen la seva acumulació. En aerobiosi, la maquinària enzimàtica es troba inhibida i els nivells de NAD(P)H augmenten.

Els resultats exposats a la taula 3.4 mostren com, sota condicions de creixement favorables, els ratios $\text{NAD(P)}^+ / \text{NAD(P)H}$ augmenten i més quantitats de NAD(P)^+ es troben a l'abast del metabolisme bacterià.

Els assaigs efectuats en tampó TF (annex 1) confirmaren aquests resultats. Així, en condicions anaeròbics, la quantitat de glucosa degradada es trobava al voltant d'1 g L⁻¹ al final de l'assaig, mentre que als tubs en condicions aeròbics la taxa de degradació era deu vegades inferior. La realització d'assaigs similars amb cèl·lules en diferents etapes de creixement, ($\text{Abs}_{600 \text{ nm}}$ entre 0.1 i 1.3), mostraren resultats similars tant en aerobiosi com en anaerobiosi. Aquestes dades recolzen els resultats prèviament descrits en medi sintètic

sobre la importància de l'airejat sobre el metabolisme de carbohidrats en *O. oeni* per la seva influència sobre la regeneració de cofactors.

2.3 EFECTE DEL CREIXEMENT AEROBI I ANAEROBI SOBRE EL METABOLISME DE LA FRUCTOSA

Les altres dues possibilitats que vam assajar foren el creixement en medi MBC amb fructosa, tant en aerobiosi com en anaerobiosi. El desenvolupament d'*O. oeni* M42 amb aquest substrat fou menys sensible que amb glucosa a les condicions aeròbies (figura 3.1). Amb fructosa, malgrat que en anaerobiosi s'aconseguien nivells de biomassa superiors als obtinguts en presència d'oxigen, les diferències no eren tan evidents com les detectades al cultius amb glucosa. La reducció de la fructosa a manitol proveïa el sistema de suficient quantitat d' NAD(P)^+ com per a suplir parcialment la inhibició de la VFE per l'oxigen. La síntesi d'ATP (acoblada a la producció d'àcid acètic) permetia l'obtenció de nivells de biomassa superiors als observats en un medi amb glucosa sota una atmosfera aeròbia (figura 3.1).

En anaerobiosi, s'aconseguia una regeneració addicional d' NAD(P)H atribuïble a la reducció de la fructosa a manitol (fins a un 67 %) que permetia obtenir nivells de biomassa superiors als aconseguits en aerobiosi. La resta de la fructosa es metabolitzava per la via heterolàctica i donava lloc a nivells de biomassa un 20% inferiors als detectats en cultius anaerobis amb glucosa. Les excessives quantitats de fructosa desaprovechades en la reoxidació d' NAD(P)H *via* manitol deshidrogenasa sota anaerobiosi, impedièren que sota aquestes condicions els cultius d'*O. oeni* M42 pogueren assolir nivells de biomassa tan satisfactoris com amb glucosa (figura 3.1).

Com ja esmentàvem anteriorment amb els cultius en MBC amb glucosa, l'acumulació de cofactors reduïts semblava ser la causa de l'aturada de la metabolització de la glucosa en condicions aeròbies (taula 3.4). Per veure si la influència d'aquests cofactors reduïts sobre la degradació de la fructosa també era present, vam realitzar assaigs amb cèl·lules d'*O. oeni* M42, preparades com es descriu a l'apartat de materials i mètodes, en tampó TF. Sota aquestes condicions experimentals, en absència de medi de cultiu i amb elevades concentracions inicials de biomassa, les cèl·lules es troben en condicions de no proliferació, dedicant els nutrients al seu abast, en aquest cas carbohidrats exclusivament, a l'obtenció d'energia i poder reductor. Als assaigs efectuats amb fructosa, la degradació fou efectiva

independentment de l'atmosfera utilitzada. Així la via de producció de mannitol permetia aconseguir degradacions en aerobiosi que no eren possibles amb la glucosa. Tanmateix, el consum de fructosa s'accelerava en anaerobiosi d'igual manera que la detectada als assaigs en medi sintètic. L'addició de cofactors NADH (o NADPH) al tampó bloquejava parcialment el metabolisme cel·lular i feia que s'aturaren les cèl·lules i que s'obtingueren taxes de degradació semblants a les detectades en aerobiosi (figura 3.2).

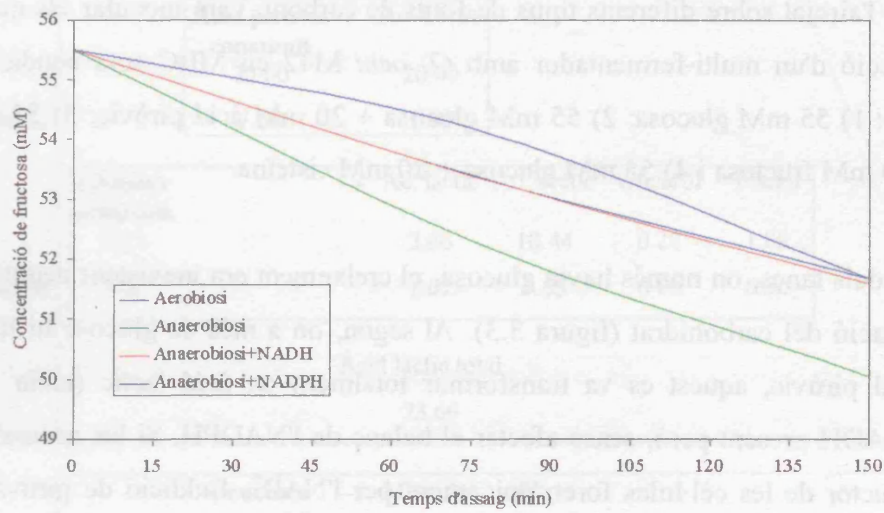


Figura 3.2. Degradació de fructosa en tampó TF amb cèl·lules no proliferants d'*O. oeni* sota diferents atmosferes (aeròbia o anaeròbia) en presència o absència de diferents cofactors reduïts. T=28 °C; pH₀=4.8.

2.4 EFECTE DE L'ADDICIÓ DE SUBSTRATS ACCEPTORS D'ELECTRONS SOBRE EL METABOLISME DE LA GLUCOSA

Els resultats obtinguts als experiments precedents ens van suggerir la realització de noves tandes de fermentacions aeròbies en medi MBC amb glucosa, suplementant-lo amb diferents agents reductors presents de manera habitual a la composició de medis de cultius utilitzats per créixer bacteris làctics. D'aquesta manera podríem veure si això solucionava els problemes de regeneració de cofactors i amb quin grau d'efectivitat. Com sabem, a les primeres etapes de la via heterolàctica es produeixen dues molècules d'NAD(P)H (figura 1.1). La reoxidació d'aquests cofactors pot efectuar-se de manera

satisfactòria a la VFE quan els enzims involucrats es troben actius. Tanmateix, això no fou possible amb *O. oeni* M42 perquè els enzims regeneradors d'NAD(P)H (ADH i ALDH), s'inhibeixen en presència d'oxigen, segons s'exposa en apartats precedents. Aleshores, la reoxidació dels cofactors podria efectuar-se afegint un agent reductor el qual, o bé poguera eliminar l'efecte inhibidor de l'oxigen sobre aquests enzims, o bé permetera a la cèl·lula l'abastament de cofactors oxidats d'una manera alternativa.

Utilitzant una aproximació metodològica similar a la abans exposada per veure la influència de l'airejat sobre diferents tipus de fonts de carboni, vam inocular els quatre tancs de reacció d'un multi-fermentador amb *O. oeni* M42 en MBC sota condicions aeròbies amb: 1) 55 mM glucosa; 2) 55 mM glucosa + 20 mM àcid pirúvic; 3) 55 mM glucosa + 20 mM fructosa i 4) 55 mM glucosa + 20 mM cisteïna.

Al primer dels tancs, on només havia glucosa, el creixement era inexistent degut a la nul·la degradació del carbohidrat (figura 3.3). Al segon, on a més de glucosa hi havia 20 mM d'àcid pirúvic, aquest es va transformar totalment en àcid làctic (taula 3.5) reoxidant l'NADH present però, sense afectar el balanç de l'NADPH. Si les necessitats de poder reductor de les cèl·lules foren únicament per l'NAD⁺, l'addició de piruvat al medi de cultiu hauria solucionat en gran mesura el problema de la seva reoxidació (*Ito et al.*, 1974; 1983; Nuraida *et al.*, 1992). Això suggereix que la reoxidació de l'NADPH (figura 1.1) té una especial importància i que és necessària per disposar d'un sistema redox balancejat. Amb tot, l'addició d'àcid pirúvic va possibilitar un augment tant del consum de glucosa com de la biomassa produïda, en comparació amb el cultiu control (figura 3.3). La generació d'equivalents de reducció a partir de l'àcid pirúvic permetia que la glucosa fora dedicada a la producció d'àcid làctic i majoritàriament a la producció d'àcid acètic (taula 3.5). Aquesta producció d'àcid acètic anava acoblada a la generació d'energia en forma d'ATP *via* l'acetat quinasa.

La tercera possibilitat que vam intentar fou l'addició de simultània de glucosa i fructosa al medi MBC. La presència de fructosa al medi li hauria de permetre regenerar els cofactors *via* manitol deshidrogenasa, mentre que la glucosa podria metabolitzar-se mitjançant la via heterolàctica (*Salou et al.*, 1994). L'addició dels dos carbohidrats va permetre una cometabolització simultània que es va traduir en un creixement inicialment satisfactori (figura 3.3). Això va permetre un notable consum de glucosa i un increment en la biomassa produïda en comparació amb els cultius addicionats de

piruvat o amb glucosa sola (taula 3.5). Una vegada s'exhaurien les reserves de fructosa, el metabolisme s'aturava i les restes de glucosa no podien ser assimilades.

		SUBSTRATS		PRODUCTES					
		Glucosa	→	Sense consum					
				Àcid pirúvic consumit	Ac. Làctic				LDH
mM				20.00	20.00				
	Estequiometria			1.00	1.00				
		Glucosa consumida	→	Ac. làctic	Ac. acètic	Glicerol	Etanol	Via heterolàctica	
mM		3.63		3.66	10.44	0.22	1.09		
	Estequiometria	1.00		1.01	2.88	0.06	0.30		
		Àcid làctic total							
		23.66							
			→	Fructosa consumida	Mannitol	Altres			MDH
mM				20.13	15.98	4.15			
	Estequiometria			1.00	0.79	0.21			
		Glucosa consumida	→	Ac. làctic		Ac. Acètic	Glicerol	Etanol	Via heterolàctica
mM		7.10		4.15		9.47	9.01	0.68	
	Estequiometria	1.00		0.84		0.80	0.06	0.04	
		Glucosa	→	Cisteïna	Ac. Làctic	Ac. acètic	Glicerol	Etanol	Via heterolàctica
mM		9.19			10.21	3.01	0.38	9.55	
	Estequiometria	1.00			1.11	0.33	0.04	1.04	

Taula 3.5. Quantificació de substrats i productes en el metabolisme de carbohidrats d'*O. oeni* M42. Creixement en MBC amb glucosa amb 1) control; 2) àcid pirúvic; 3) fructosa i 4) cisteïna. T=28 °C; pH₀=4.8; agitació=200 rpm.

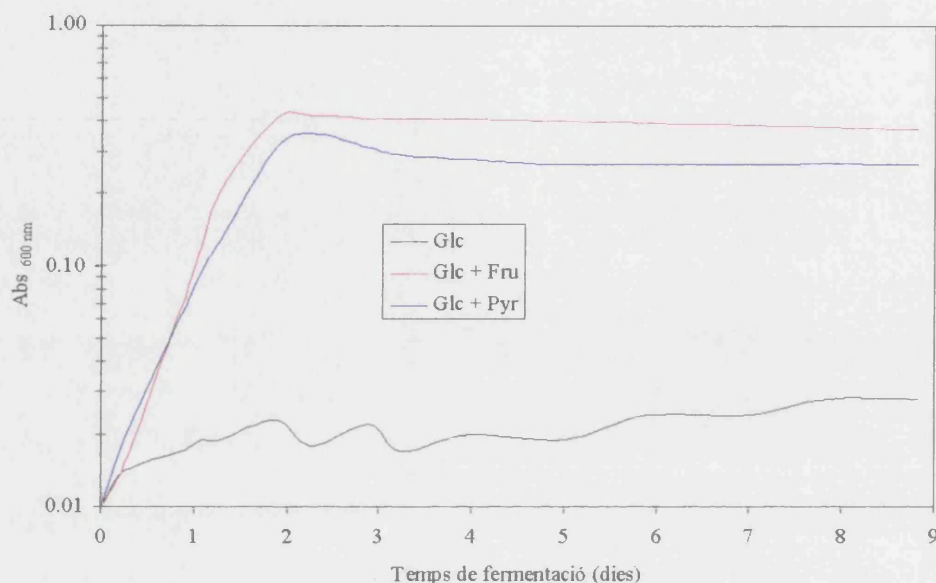


Figura 3.3. Creixement d'*O. oeni* en MBC amb glucosa amb 1) control; 2) àcid pirúvic i 3) fructosa. T=28 °C; pH₀=4.8; agitació=200 rpm.

* L'addició de cisteïna a l'MBC l'enterbolia per la qual cosa l'increment d'absorbància no era representatiu i no s'ha dibuixat en aquesta figura.

La quarta aproximació que vam efectuar consistia en l'afegiment de cisteïna a l'MBC amb glucosa. La cisteïna s'inclou habitualment als medis de cultiu utilitzats per créixer bacteris làctics degut a les seves propietats antioxidants. El creixement detectat en la seva presència era notablement superior a l'observat als assaigs amb la resta d'agents reductors (fructosa o piruvat). L'explicació d'aquest fet podia trobar-se bé a la capacitat que aquest aminoàcid posseeix per atrapar l'oxigen present al medi o la seva pròpia metabolització. Bruinenberg *et al.* (1997) van mostrar com la cisteïna podia ser metabolitzada per un bacteri làctic, *Lactococcus lactis*. La reacció d' α , β -eliminació de l'L-cisteïna genera àcid pirúvic entre altres components i aquest podria ser eficientment metabolitzat fins a àcid làctic per *O. oeni* proporcionant-li una capacitat addicional per regenerar NADH. L'existència de rutes de degradació d'aminoàcids han estat descrites anteriorment com a un sistema d'adaptació a condicions adverses de creixement (Marquis *et al.*, 1987). Aquesta disjuntiva ens va suggerir la realització d'una nova tanda de fermentacions inoculant *O. oeni* M42 en MBC amb glucosa amb diferents quantitats de cisteïna (entre 0 i 5 g L⁻¹).

Les quantificacions efectuades per HPLC (annex 2) ens van mostrar com, quan major era la quantitat de cisteïna afegida al medi, majors eren tant el consum de glucosa com la biomassa màxima assolida (taula 3.6). La presència de cisteïna al medi permetia que s'eliminara la inhibició que l'oxigen efectua sobre els enzims de la VFE i es possibilitava la seva actuació (taula 3.6). Aquest efecte favorable de la cisteïna fou detectat fins i tot quan aquest aminoàcid era afegit en quantitats traça. Amb tot, el consum total de la glucosa present als medis no s'obtenia fins que s'afegien quantitats superiors de cisteïna (5 g L^{-1}). L'altre possible efecte positiu de la cisteïna, atribuïble a la seva metabolització, fou descartat a partir dels resultats experimentals (taula 3.6).

Cisteïna [g L^{-1}]		Glucosa		Àcid làctic	Àcid acètic	Etanol
0.00	mM	1.00	→	2.14	0.00	1.30
	Estequiometria	1.00		2.14	0.00	1.30
0.25	mM	21.54	→	19.77	4.58	19.97
	Estequiometria	1.00		0.92	0.21	0.93
1.25	mM	26.36	→	23.73	16.73	27.78
	Estequiometria	1.00		0.90	0.63	1.05
2.50	mM	33.71	→	29.91	18.45	35.16
	Estequiometria	1.00		0.89	0.55	1.04
5.00	mM	52.45	→	46.48	21.68	56.00
	Estequiometria	1.00		0.89	0.41	1.07

Taula 3.6. Quantificació de substrats i productes. Creixement aeròbic d'*O. oeni* en MBC amb 10 g L^{-1} de glucosa amb diferents quantitats de cisteïna. $T=28 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}_0=4.8$.

Les dades estequiomètriques mostren com, un augment en la quantitat de cisteïna afegida al medi no es tradueix en un increment de la proporció final d'àcid làctic. Recordem que la degradació de la cisteïna donaria lloc a àcid pirúvic i seria la reducció d'aquest a àcid làctic la que proporcionaria poder reductor a la cèl·lula. Amb tot, la influència positiva de l'afegiment de la cisteïna dona suport a la seva inclusió als medis de cultiu per afavorir la metabolització de carbohidrats.

2.5 RECAPITULACIÓ

Una anàlisi global del metabolisme de les hexoses a *O. oeni* M42 ens ha permès determinar que la glucosa no és un bon substrat pel seu creixement aerobi (figura 3.1). L'explicació es troba en els problemes que té aquesta soca per reoxidar l'*NAD(P)H* produït a les etapes inicials de la fermentació heterolàctica. Aquestes dificultats són degudes a la baixa activitat de les *NAD(P)H* oxidases (taula 3.2), a la inhibició dels enzims de la VFE (taula 3.3) per l'oxigen i a la no existència de rutes alternatives descrites per altres soques d'*O. oeni* com són la de l'eritritol i la del glicerol (figura 1.1). Tanmateix, la baixa activitat d'aquestes rutes alternatives no permetria per si a soles el creixement cel·lular. A altres soques d'*O. oeni*, l'activitat d'un o més d'aquests sistemes de reoxidació de cofactors permet un creixement tan bo o millor que en absència d'oxigen. Els problemes de metabolització desapareixien quan els cultius en MBC-glucosa es realitzaven en una atmosfera anaeròbia (saturada de nitrogen). La glucosa era completament assimilada i es permetia la producció d'elevades quantitats de biomassa (figura 3.1; taula 3.1). Les anàlisis efectuades confirmaven l'eficaç activitat dels enzims implicats a la VFE amb la conseqüent regeneració de cofactors que permetien al bacteri disposar d'un sistema redox balancejat. Quan la glucosa es substituïa com a font de carboni i energia per la fructosa, es produïen canvis en la metabolització. La fructosa era assimilada per *O. oeni* M42 tant en aerobiosi com en anaerobiosi, encara que els rendiments eren superiors en absència d' O_2 (taula 3.1). La possibilitat dels bacteris heterolàctics per produir mannitol a partir de la fructosa, reoxidant *NAD(P)H* de manera paral·lela, permetia funcionar a la via heterolàctica independentment de les condicions de l'atmosfera del cultiu. Tanmateix, en anaerobiosi, els rendiments obtinguts no foren tan satisfactoris com amb glucosa en les mateixes condicions, ja que part de la fructosa enlloc de servir com a font de carboni, s'aprofitava per a l'acceptació d'electrons (figura 3.1).

Amb la intenció de combinar les aportacions positives (generació d'energia i poder reductor) d'ambdós carbohidrats (glucosa i fructosa) es va assajar la seva cometabolització. L'addició de fructosa al medi MBC-glucosa permetia solucionar les dificultats per a la reoxidació de l'*NAD(P)H*. La fructosa es dedicava majoritàriament a la reoxidació dels cofactors mentre que a partir de la glucosa s'obtenia energia i biomassa (taula 3.5). Quan l'MBC-glucosa, la fructosa era substituïda per piruvat, es possibilitava la reducció de l'àcid a lactat i la reoxidació acoblada de l'*NADH*. Això es

traduïa en lleugers augments de biomassa en comparació amb el cultiu control amb només glucosa (taula 3.5; figura 3.3). Els resultats no eren tan satisfactoris com els aconseguits amb la fructosa perquè només es permetia la regeneració de l'NADH mentre que l'NADPH no era afectat. L'altra aproximació experimental, consistent en l'afegiment de cisteïna al medi MBC-glucosa, permetia eliminar la inhibició que efectuava l'oxigen sobre els enzims implicats a la VFE. Quan s'augmentaven els nivells d'addició de l'aminoàcid, s'incrementava gradualment el consum de glucosa i s'assolien biomasses finals més elevades (taula 3.6). Tanmateix, la cisteïna no es consumia durant la metabolització de la glucosa sent la seva contribució únicament atribuïble a la generació d'una atmosfera reductora al medi.

La clau del funcionament del metabolisme de carbohidrats a *O. oeni* es centra doncs en la capacitat dels diferents sistemes cel·lulars per regenerar els cofactors reduïts que es generen a les etapes inicials de la via heterolàctica, més que en la disponibilitat d'ATP. Si les NAD(P)H oxidases no són actives i no es disposa de fructosa per a reduir-la a manitol, la tasca de reoxidació recau sobre els enzims de la VFE. Mentre funcionen activament, els nivells d'NAD(P)H es troben controlats i permeten funcionar el sistema. Quan els enzims s'inhibeixen, la quantitat d'NAD(P)H i el ratio NAD(P)H/NAD(P)^+ augmenten, el metabolisme s'atura i es deté el creixement d'*O. oeni* M42.

CAPÍTOL 4

APLICACIÓ D'ALTRES TECNOLOGIES PER A LA REALITZACIÓ DE LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA

1 MATERIALS I MÈTODES

1.1 FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA AMB CÈL·LULES LLIURES NO PROLIFERANTS D'*Oenococcus oeni*

1.1.1 Inoculació i seguiment de la fermentació malolàctica en vins

Les soques d'*O. oeni* es van inocular a l'1% (v/v) en MLO (annex 1) en botelles Pyrex de 250 mL a partir de cultius glicerinars. Una vegada crescudes les soques fins al final de la fase exponencial es van centrifugar a 18000 x g, es van rentar dues vegades en solució salina i es van resuspendre en 10 mL de vi prèviament rectificat de pH i concentració de màlic, i esterilitzat per filtració (annex 1) per obtenir la biomassa inicial desitjada. La incubació es va realitzar a 20°C. Periòdicament es van realitzar mostreigs d'1 mL, es va determinar el nivell de cèl·lules viables per recomptes en plaques d'MLO (annex 1) i la quantitat d'àcid màlic residual per cromatografia en paper o per HPLC (annex 2). El pH final dels vins es va mesurar en acabar els assaigs.

1.1.2 Selecció de paràmetres experimentals

Els nivells inicials de biomassa, al voltant de 10^6 , 10^7 o 10^8 ufc mL⁻¹, es van triar basant-nos en dades prèvies existents a la literatura (Lafon-Lafourcade, 1983). L'inòcul més baix, 10^6 ufc mL⁻¹, és va triar per ser aquest el nivell mínim necessari per obtenir una degradació efectiva de l'àcid màlic en condicions de no proliferació cel·lular. Els nivells superiors es van assajar per determinar la velocitat de degradació d'àcid màlic sota condicions de no proliferació cel·lular (Lafon-Lafourcade, 1983).

Les concentracions inicials d'àcid màlic foren 3.5 i 7.0 g L⁻¹, triades per ser dos valors presents en diferents vins (Beelman *et al.*, 1980; Davis *et al.*, 1985b; Henick-Kling, 1988). Els valors de pH triats per a realitzar els assaigs foren 3.1, pH umbracle mínim de desenvolupament de l'FML (Henick-Kling, 1986a) i 3.5, pH al qual es sol desenvolupar l'FML de manera normal al vi sense problemes d'inhibició per pH baix (Davis *et al.*, 1986a; Henick-Kling, 1986a; Henick-Kling, 1988).

L'estudi d'aquests paràmetres amb les cinc soques en assaig: M41, M42, G6, N172 i T46 (annex 3) d'una manera coordinada, ens va fer plantejar-nos una reixeta de possibilitats d'assaig (figura 4.1).

Realitzant un agrupament per soques i nivells d'inoculació enquadrem les experiències en quatre grans grups:

- pH 3.1 i 7.0 g L⁻¹ d'àcid màlic inicials
- pH 3.5 i 7.0 g L⁻¹ d'àcid màlic inicials
- pH 3.1 i 3.5 g L⁻¹ d'àcid màlic inicials
- pH 3.5 i 3.5 g L⁻¹ d'àcid màlic inicials

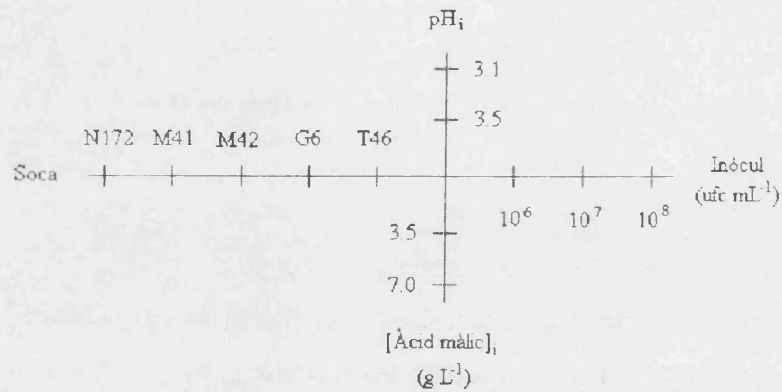


Figura 4.1. Combinació de paràmetres experimentals utilitzada per assajar l'FML amb cèl·lules no proliferants d'*O. oeni*.

1.2 FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA AMB CÈL·LULES D'*Oenococcus oeni* EN CREIXEMENT CONTINU

1.2.1 Inoculació i seguiment de la fermentació malolàctica

Les soques d'*O. oeni* MA4 i VV5 (annex 3) es van inocular a l'1% (v/v) en MLO (annex 1) a partir de cultius glicerinats. Una vegada crescudes fins al final de la fase exponencial (48-72 h) es van inocular a l'1% en Medi P (annex 1). Quan els cultius van arribar a la fase exponencial en aquest medi (48-72 h), es van inocular al 10% (v/v) en vi (annex 1). Totes aquestes inoculacions es van realitzar en tubs de rosca de 12 mL amb un volum final de 10 mL. Després de dues setmanes, els cultius es van inocular al 5% (v/v) en vi dins els biorreactors. Es va seguir periòdicament el nombre de cèl·lules viables per plaqueig en medi MLO sòlid (annex 1) i el desenvolupament de la fermentació malolàctica mitjançant cromatografia en paper o HPLC (annex 2). Els biorreactors es van operar en mode discontinu fins que les cèl·lules van degradar almenys el 95% de l'àcid màlic present al vi. Aleshores es va iniciar el procés en continu fent un seguiment de la fermentació i del nombre de viables de la manera abans descrita. El sistema es va mantenir el màxim temps possible, fins que es va detectar un elevat

nivell de cèl·lules contaminats als biorreactors i es va haver d'aturar. Tots els creixements en vi es van desenvolupar a 20°C.

1.2.2 Biorreactors: instrumentació i operació

Veure l'annex 4.

1.3 FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA AMB CÈL·LULES D'*Oenococcus oeni* IMMOBILITZADES

1.3.1 Materials utilitzats per la immobilització

La immobilització d'*O. oeni* M42 (annex 3) es va realitzar sobre esponges de cel·lulosa PRODUCTIV subministrades per BPS Separations, Spennymoor (Regne Unit) que presenta propietats assimilables a les d'una resina de bescanvi iònic (Ming i Howell, 1994). Aquestes esponges es van utilitzar tant en la seva forma neutra com carregades amb grups bàsics: DE, $N^+(CH_2CH_3)_2H$ i DEAE, $(CH_2)_2N^+(CH_2CH_3)_2H$. No es van utilitzar esponges amb grups àcids perquè les taxes d'adsorció de cèl·lules amb aquesta càrrega són molt baixes (O'Reilly i Scott, 1993; Scott *et al.*, 1995a; ~~1995b~~ Scott *et al.* 1995).

1.3.2 Procediment d'immobilització: assaigs en flascons Erlen-Meyer

Els cultius d'*O. oeni* M42 es creixien en MLO (o Medi P) fins al final de la fase exponencial. Aleshores, es centrifugaven 100 mL del cultiu a 18000 x g i les cèl·lules eren recuperades i rentades tres vegades amb tampó TF prèviament rectificat de pH (annex 1). Es van utilitzar diferents valors de pH entre 3.5 i 5.5 per optimitzar el procés d'immobilització. Aleshores, les cèl·lules es resuspenien en 100 mL del mateix tampó en un flascó de 250 mL i s'afegien 2 g d'esponja (pes humit). Per a determinar la possible interferència del medi de cultiu sobre el procés d'adsorció es van realitzar assaigs d'immobilització directament a partir de cèl·lules crescudes en medi de cultiu sense passar-les pel tampó. Els flascons eren incubats a 28°C en un agitador orbital amb una agitació constant de 100 rpm. Periòdicament, durant 5-7 h, es realitzava un mostreig per determinar l'absorbància a 600 nm de les cèl·lules en suspensió. Es va realitzar una corba de calibrat entre l'absorbància a 600 nm i el nombre d'ufc mL⁻¹ mitjançant plaqueig en MLO sòlid per estimar la quantitat de biomassa adsorbida al material d'immobilització. Com a controls, es preparava un flascó amb 100 mL de la mateixa suspensió cel·lular sense afegir-li material d'immobilització i un altre amb el mateix

volum de tampó sense cèl·lules i en presència de 2 g d'esponja. L'absorbància enregistrada en aquests dos flascons era considerada com a referència per obtenir el 0% i el 100% d'adsorció. A més, una part alíquota del volum extret del flascó amb cèl·lules en suspensió sense material d'immobilització, era utilitzada per realitzar un recompte en plaques d'MLO i comprovar el manteniment de la viabilitat cel·lular. Aquests experiments es van realitzar amb tots els tipus d'esponja esmentats a l'apartat 2.3.1.

1.3.3 Procediment d'immobilització: assaigs en columna

Els assaigs en columna es realitzaven de manera inicialment similar al descrit per als realitzats en flascons però, a partir d'1 L de medi de cultiu amb cèl·lules. Una vegada centrifugada la suspensió cel·lular, el sediment es resuspensia en tampó TF i era introduït en un biorreactor de vidre (figura 4.2).

Aquest biorreactor es connectava de manera estèril amb una columna d'immobilització en la què prèviament s'havien compactat 10 g d'esponja. Aleshores, es connectava el sistema a una bomba peristàltica (flux de 35 mL min^{-1}) i es realitzava la immobilització durant 6-8 h. Com a control es muntava una columna en les mateixes condicions però sense material d'immobilització.

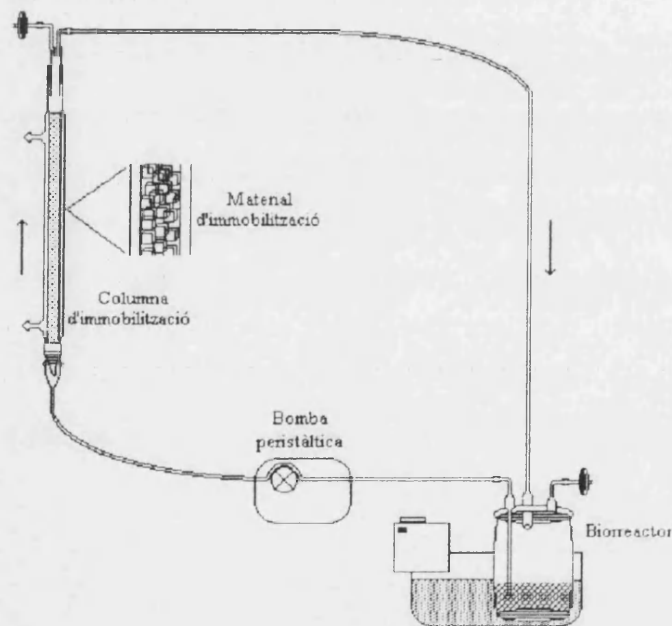


Figura 4.2. Immobilització cel·lular en columna: esquema del sistema.

Periòdicament es realitzava un mostreig tal i com es descriu a l'apartat 1.3.1. Per a determinar el flux òptim d'utilització del sistema es van realitzar assaigs de desimmobilització. Aquests assaigs consistien en l'enregistrament de l'absorbància a

l'eixida de la columna, canviant les velocitats de flux de la bomba peristàltica fins enregistrar un rentat de la columna.

1.3.4 Fermentació malolàctica amb cèl·lules immobilitzades: assaigs en flascó

Una vegada realitzada la immobilització de les cèl·lules, s'eliminà el tampó i s'afegiren 100 mL de vi o vi sintètic (annex 1). Els flascons s'agitaren en les mateixes condicions que les descrites a l'apartat 1.3.2 i periòdicament, durant 24-48 hores es realitzà un mostreig per determinar el grau de realització de l'FML. Una fracció del volum mostrejat era utilitzada per realitzar una quantificació de viables en plaques d'MLO amb l'objectiu de determinar la presència de cèl·lules lliures al medi. Totes aquestes operacions es realitzaven de manera estèril.

1.3.5 Fermentació malolàctica amb cèl·lules immobilitzades: assaigs en columna

Una vegada immobilitzades les cèl·lules dins la columna, s'eliminà el tampó i es rentaren les esponges amb solució tampó fresca per eliminar les cèl·lules no adsorbides. El procés es monitoritzà enregistrent l'absorbància a 600 nm fins que s'eliminaren totes les cèl·lules no adsorbides o adsorbides de manera feble. Aquestes dades eren utilitzades per calcular la taxa d'immobilització. Aleshores, es canvià el biorreactor utilitzat a la immobilització per un amb medi MBC-M fresc (annex 1), es connectà la bomba peristàltica i es deixà recircularitzant el medi 3-4 d. Periòdicament es realitzà un mostreig a l'eixida de columna per determinar el grau de realització de l'activitat malolàctica. Una alíquota fou utilitzada per quantificar el nombre de cèl·lules viables en suspensió que no foren adsorbides o que es desprenien durant la fermentació. Com a control del procés, s'inoculà un altre biorreactor amb una quantitat total de cèl·lules en suspensió, en condicions de no proliferació cel·lular, similar a la calculada per a la columna d'immobilització. El mostreig es realitzà en paral·lel al descrit per a la columna d'immobilització i es realitzaren les mateixes determinacions analítiques i microbiològiques.

1.3.6 Determinació de la degradació d'àcid màlic i/o aparició d'àcid làctic

La quantificació d'àcids orgànics es va realitzar per tres mètodes alternatius utilitzats segons l'exactitud requerida a cada assaig. A les proves preliminars es va realitzar una valoració semiquantitativa per cromatografia en paper (annex 2) mentre que als assaigs definitius es va utilitzar el sistema enzimàtic de quantificació d'àcid làctic Cat-39084 de Boehringer Mannheim o un equip d'HPLC (annex 2).

2 RESULTATS I DISCUSSIÓ

2.1 FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA AMB CÈL·LULES LLIURES NO PROLIFERANTS D'*Oenococcus oeni*

2.1.1 pH 3.1 i 7.0 g L⁻¹ d'àcid màlic inicials

Dels quatre grans grups que hem descrit a l'apartat materials i mètodes, aquest és el que *a priori* presenta unes condicions més adverses per al desenvolupament de l'FML. Així, amb cap de les cinc soques assajades no es produeix una degradació total dels 7.0 g L⁻¹ d'àcid màlic inicials ni tan sols amb nivells alts d'inòcul cel·lular (taula 4.1). Però, encara així, es presenten diferències entre soques prou destacades.

La soca T46 mostra uns nivells de resistència a pH baix (3.1) força dolents, arribant a detectar-se quantitats inferiors a 10⁴ ufc mL⁻¹ després d'una setmana d'experimentació fins i tot quan els nivells inicials es trobaven al voltant de 10⁸ ufc mL⁻¹. Les reduccions en les quantitats d'àcid màlic són menyspreables excepte quan els nivells d'inòcul són molt alts, 10⁸ ufc mL⁻¹, i arriben a degradar-se 2.0 g L⁻¹ (taula 4.1). Encara així, aquest és el pitjor resultat obtingut amb qualsevol de les soques assajades ja que suposa percentatges de degradació inferiors al 30%, després de dues setmanes de fermentació (taula 4.1). Així mateix, l'increment de pH al vi amb aquestes condicions és poc important (inferior a 0.03 unitats) (figura 4.3).

Les soques M41 i M42 mostren nivells de viabilitat similars als observats a les fermentacions amb T46 excepte als assaigs amb els inòculs més alts (10⁸ ufc mL⁻¹) on la mortalitat no és tan pronunciada (figura 4.4a). Utilitzant aquestes soques, la degradació d'àcid màlic comença a ser efectiva amb nivells cel·lulars inicials superiors a 10⁷ ufc mL⁻¹. Sota aquestes condicions es degraden al voltant de 3.0 g L⁻¹ d'àcid màlic i es produeixen augments de pH més importants que amb la soca T46 però sempre inferiors a 0.1 unitats (figura 4.3).

O. oeni G6 i N172 són les soques que presenten un millor comportament amb les condicions de pH i àcid màlic inicialment establertes. Així, mentre a les fermentacions amb 10⁶ ufc mL⁻¹ inicials la mortalitat és semblant a l'observada utilitzant les tres soques abans descrites, quan s'augmenten els nivells fins a 10⁷-10⁸ ufc mL⁻¹, la taxa de mortalitat no és tan important i es poden detectar quantitats de cèl·lules vives superiors a 10⁴ ufc mL⁻¹ després de quatre setmanes d'experimentació. És precisament aquest factor, el manteniment de cèl·lules vives al vi, el que possibilita una major degradació d'àcid

màlic (fins a 4.0-5.0 g L⁻¹) depenent de la soca i del nivell d'inòcul inicial (taula 4.1). Això permetria la degradació parcial d'àcid màlic en vins de baix pH utilitzant biomasses inicials en ordres de magnitud entre 10⁷ i 10⁸ ufc mL⁻¹. Aquest procés necessita entre una i dues setmanes per a completar-se però s'acompleix prou efectivament de manera parcial durant les primeres 48-72 hores de fermentació en les què es consumeixen 3.0-4.0 g L⁻¹ d'àcid màlic. Aquest factor es correlaciona amb l'existència d'un nombre elevat de cèl·lules durant aquest període. Quan augmenta la mortalitat, l'FML s'atura dràsticament (figura 4.4 c; e).

2.1.2 pH 3.1 i 3.5 g L⁻¹ d'àcid màlic inicials

Amb aquests valors inicials, els resultats obtinguts són similars als exposats al punt anterior. Això confirma l'enquadrament de les soques en tres grups comportamentals formats per G6-N172, M41-M42 i T46. És justament aquesta última la soca que presenta un pitjor comportament als tres inòculs inicials assajats. Només amb nivells de biomassa inicial de 10⁸ ufc mL⁻¹ és capaç de degradar al voltant d'un 40% de l'àcid màlic present al vi (taula 4.1). Aquest fet es correlaciona amb un increment de pH d'una dècima que en gens afecta a les baixes taxes de supervivència detectades (figura 4.4a).

Els resultats obtinguts utilitzant les soques M41 i M42 sota aquestes condicions són una mica millors i, encara que el nombre de cèl·lules viables sofreix una forta reducció, la quantitat d'àcid màlic degradada és superior a la obtinguda utilitzant la soca T46 (taula 4.1). Les taxes de degradació oscil·len entre els 2.7 g L⁻¹ amb inòculs de l'ordre de 10⁸ ufc mL⁻¹ fins a 1.5 g L⁻¹ amb 10⁷ ufc mL⁻¹ inicials (taula 4.1). Totes aquestes degradacions s'efectuen fonamentalment durant la primera setmana d'assaig com a conseqüència dels motius anteriorment esmentats i possibiliten augments de pH entre 0.1 i 0.2 unitats (figura 4.3).

De nou són els resultats aconseguits amb les soques G6 i N172 els més positius en permetre l'acurtament del temps de degradació total fixant-lo en 2-3 dies. Així, amb nivells de 10⁷-10⁸ ufc mL⁻¹ la reducció és quasi total i únicament resten al vi entre 0.1 i 1.5 g L⁻¹ segons soca (figura 4.4 c; e). Amb aquestes soques fins i tot es detecten degradacions d'entre 0.4 i 1.1 g L⁻¹ d'àcid màlic amb inòculs baixos (10⁶ ufc mL⁻¹). Cal ressaltar aquest aspecte per ser aquestes les úniques soques assajades que poden disminuir el nivell d'àcid màlic a pH 3.1 amb aquest nivell de biomassa inicial.

TEMPS DE MOSTREIG

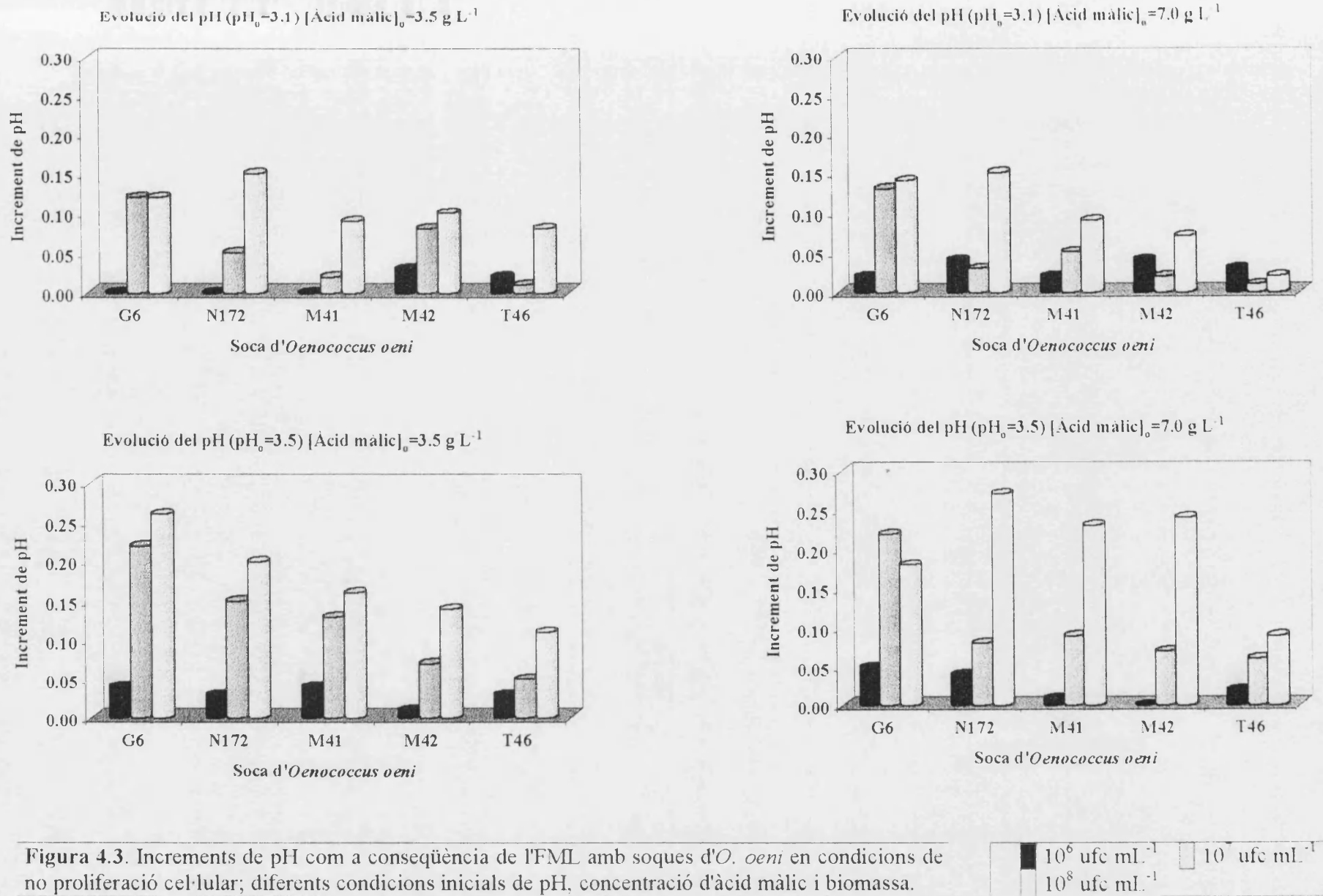
	1d	1s	2s	3s	1d	1s	2s	3s	1d	1s	2s	3s	1d	1s	2s	3s			
S O C A	M41	0	0	0	nd	5	6	14	25	0	0	0	nd	4	5	11	41	10^6	
		9	19	19	nd	14	28	37	43	3	5	5	nd	15	nd	26	30	10^7	
		39	66	66	67	48	99	99	100	33	47	47	47	28	84	nd	94	10^8	
	M42	nd	nd	0	nd	nd	0	0	0	0	0	0	0	nd	0	0	0	0	10^6
		14	38	42	nd	17	51	nd	61	nd	17	17	nd	14	32	37	37	37	10^7
		59	77	77	77	56	91	94	98	34	43	43	43	43	73	74	86	86	10^8
	T46	2	2	2	nd	4	4	nd	10	6	6	6	nd	1	1	1	1	1	10^6
		9	14	14	nd	10	26	28	34	7	7	nd	nd	6	20	22	27	27	10^7
		37	41	41	nd	44	59	61	nd	14	27	27	nd	30	43	43	nd	nd	10^8
G6	31	32	32	32	nd	22	30	48	8	12	12	12	nd	13	23	36	36	10^6	
	66	91	91	92	69	94	100	100	41	55	55	55	56	93	98	99	99	10^7	
	57	72	74	75	48	85	nd	99	53	64	64	64	35	81	nd	93	93	10^8	
N172	nd	nd	11	nd	nd	30	nd	54	0	0	0	0	nd	6	nd	32	32	10^6	
	nd	38	42	nd	45	61	nd	81	nd	nd	27	nd	nd	26	46	62	62	10^7	
	59	93	98	98	56	94	98	100	34	63	69	69	40	81	99	100	100	10^8	
	pH ₀ =3.1 [Àcid màlic] ₀ =3.5 g L ⁻¹				pH ₀ =3.5 [Àcid màlic] ₀ =3.5 g L ⁻¹				pH ₀ =3.1 [Àcid màlic] ₀ =7.0 g L ⁻¹				pH ₀ =3.5 [Àcid màlic] ₀ =7.0 g L ⁻¹						

nd=no determinat

d=dia

s=setmana/es

Taula 4.1. Percentatge de degradació de l'àcid màlic sota diferents condicions inicials de pH, nivell d'inòcul i concentració d'àcid màlic.



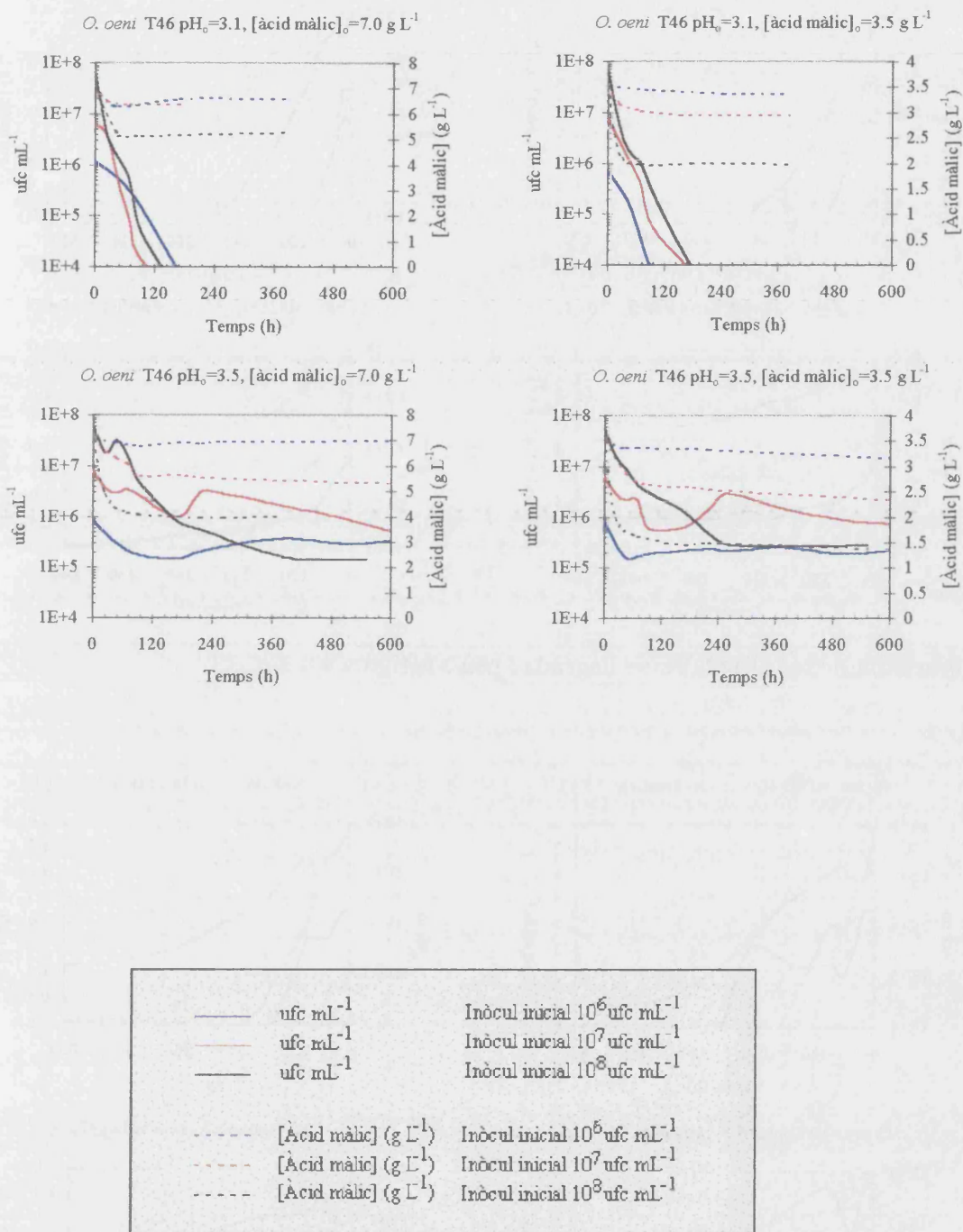


Figura 4.4.a. Creixement i degradació d'àcid màlic amb la soca *O. oeni* T46 sota varies condicions experimentals (veure figura 4.1).

CAPÍTOL 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

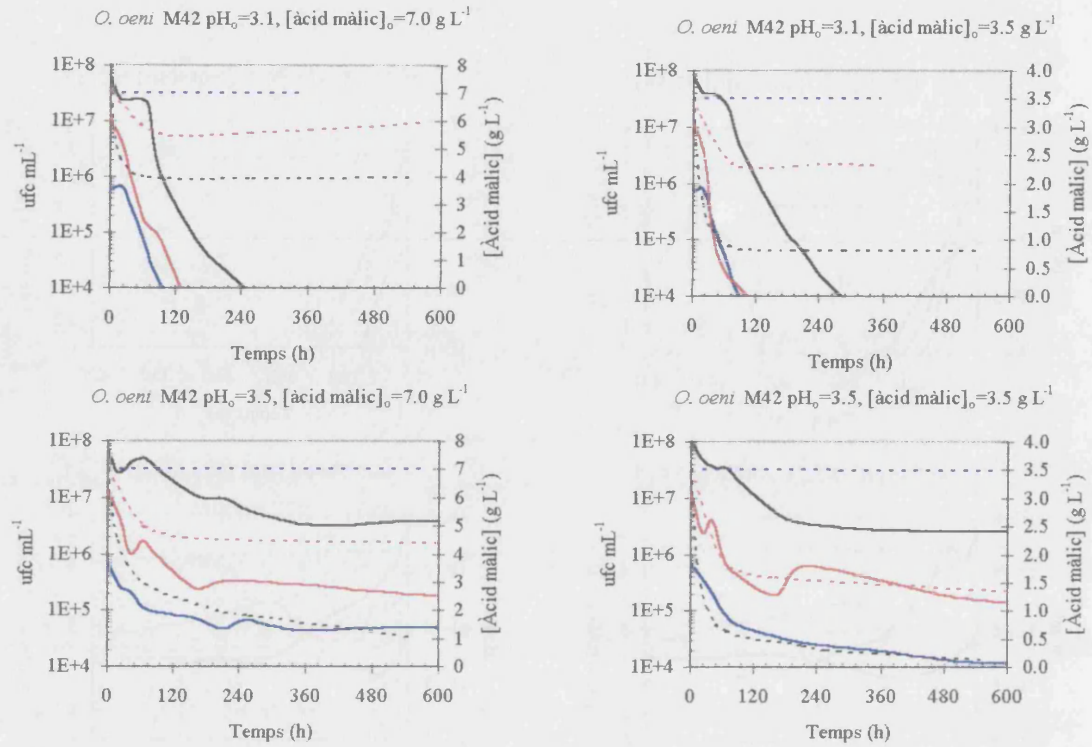


Figura 4.4.b. Soca M42. Veure llegenda i peu a la figura 4.4.a.

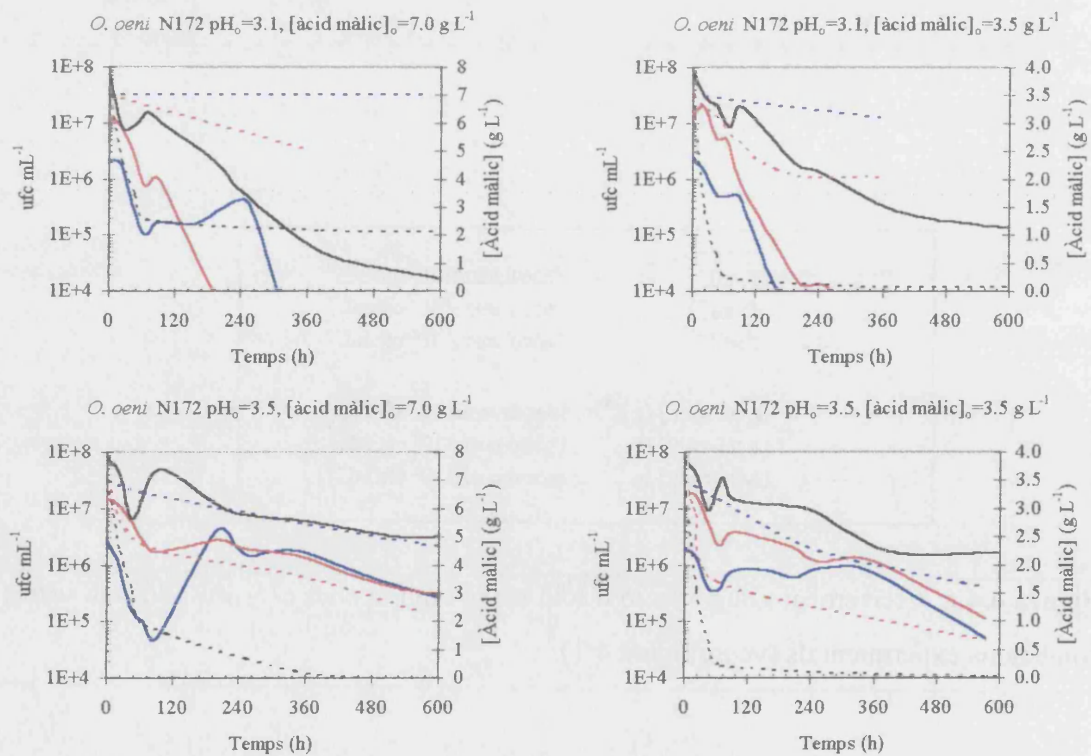


Figura 4.4.c. Soca N172. Veure llegenda i peu a la figura 4.4.a.

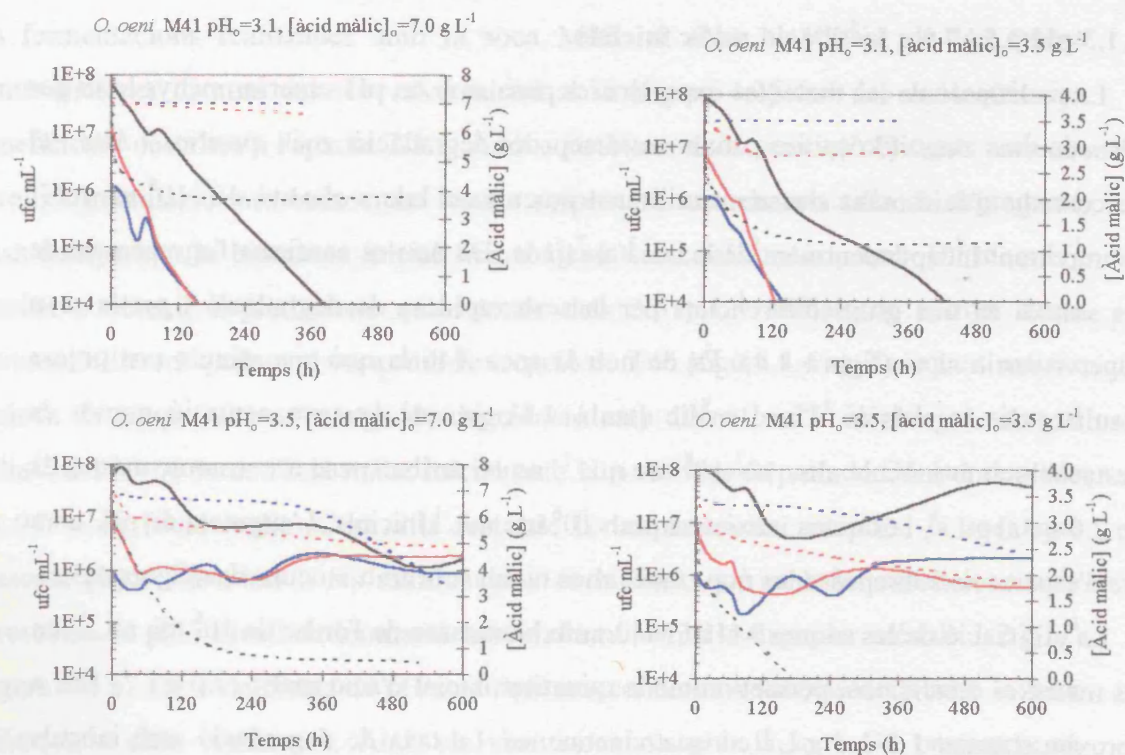


Figura 4.4.d. Soca M41. Veure llegenda i peu a la figura 4.4.a.

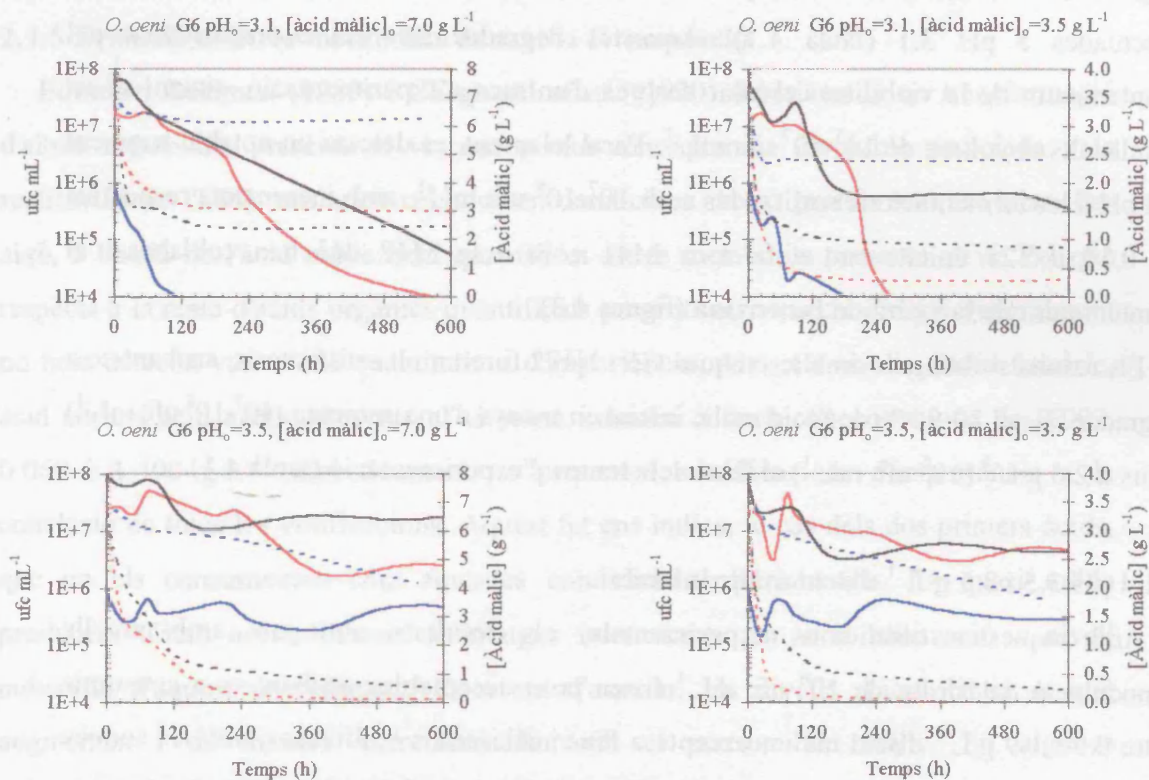


Figura 4.4.e. Soca G6. Veure llegenda i peu a la figura 4.4.a.

2.1.3 pH 3.5 i 7.0 g L⁻¹ d'àcid màlic inicials

La realització de les mateixes experiències però amb un pH superior menys lesiu per *Oenococcus oeni* (3.5), ens dona resultats de degradació més positius. Així, el percentatge d'àcid màlic consumit utilitzant inòculs cel·lulars elevats, 10⁷-10⁸ ufc mL⁻¹ és important independentment de la soca assajada. De nou es confirma l'agrupament de les soques en tres grups diferenciats per la seva rapidesa de degradació i per la seva supervivència al vi (figura 4.4). És de nou la soca T46 la que ens ofereix uns pitjors resultats de degradació d'àcid màlic (taula 4.1), ja que la seva actuació només és destacable amb inòculs alts, 10⁷-10⁸ ufc mL⁻¹, sense arribar però a consumir més enllà de 2.0 o 3.0 g L⁻¹, i és quasi inexistent amb 10⁶ ufc mL⁻¹ inicials. L'augment de pH, com era d'esperar no sobrepasa les nou centèsimes ni tan sols amb inòculs alts (figura 4.3).

La utilització de les soques M41 i M42 amb biomasses de l'ordre de 10⁸ ufc mL⁻¹, en les mateixes condicions, permet reduir la quantitat inicial d'àcid màlic (7.0 g L⁻¹) fins a aproximadament 1.0-1.5 g L⁻¹ en quatre setmanes. La taxa de degradació amb inòculs inferiors, 10⁶-10⁷ ufc mL⁻¹, no és tan important consumint-se únicament 2.0-3.0 g L⁻¹ d'àcid màlic en el mateix període de temps (figura 4.4 b; d). Amb tot, aquests nivells de degradació són lleugerament superiors als observats a les experiències anàlogues efectuades a pH 3.1 (taula 4.1). Aquestes degradacions van acompanyades pel manteniment de la viabilitat cel·lular després d'un mes d'experimentació, situant-se en nivells alts al voltant de 10⁵-10⁷ ufc mL⁻¹. Paral·lelament, es detecta un notable augment del pH a les fermentacions realitzades amb 10⁷-10⁸ ufc mL⁻¹, amb increments respectius de 0.10 i 0.25 unitats tant a la soca M41 com a la M42 que han col·laborat al manteniment de la viabilitat bacteriana (figura 4.3).

Els resultats obtinguts amb les soques G6 i N172 foren molt satisfactoris, arribant-se a degradar fins al 80-90 % de l'àcid màlic inicial en menys d'una setmana (10⁷-10⁸ ufc mL⁻¹) i fins a 2.5 g L⁻¹ (10⁶ ufc mL⁻¹) al final dels temps d'experimentació (taula 4.1).

2.1.4 pH 3.5 i 3.5 g L⁻¹ d'àcid màlic inicials

Amb aquestes condicions experimentals, els resultats obtinguts amb nivells d'inoculació de l'ordre de 10⁶ ufc mL⁻¹ foren prou acceptables arribant-se a consumir entre 0.9 i 1.9 g L⁻¹ d'àcid màlic, excepte a les vinificacions realitzades amb les soques T46 i M42 on les taxes de degradació són quasi inapreciables (taula 4.1). Aquests resultats són explicables pel manteniment de la viabilitat cel·lular durant varies setmanes a nivells d'entre 10⁵-10⁶ ufc mL⁻¹ (figura 4.4). L'evolució del pH, excepte per a

les fermentacions realitzades amb la soca M42, el situa al voltant de les quatre centèsimes per damunt del seu valor inicial al vi (figura 4.3) amb les conseqüències beneficioses descrites a l'apartat 2.1.3. Amb aquests resultats positius obtinguts amb els nivells d'inoculació més baixos, no resulta sorprenent una elevada taxa de degradació quan s'augmenta la biomassa inicial fins a 10^7 - 10^8 ufc mL⁻¹. Així, amb 10^8 ufc mL⁻¹ s'arriba a obtenir degradacions quasi totals dels 3.5 g L⁻¹ inicials en menys d'una setmana utilitzant qualsevol soca amb l'excepció de T46 (figura 4.4 a). En aquest mateix període de temps, el percentatge de degradació amb 10^7 ufc mL⁻¹ inicials es situa al voltant del 30-60 % de l'àcid màlic inicial amb la positiva excepció de G6 que degrada un 94 % de l'àcid màlic. Com a la resta de les experiències anteriors, la soca que presenta pitjors resultats a les vinificacions és la T46, que amb les condicions més favorables de pH i nivell de biomassa inoculada no arriba a degradar més de 1.2 g L⁻¹ (figura 4.4 a). Els increments de pH sota aquestes condicions van associats amb la soca utilitzada a cada vinificació. Així, els vins inoculats amb la soca G6 presenten un augment de pH de 0.25 unitats mentre que a les vinificacions realitzades amb la resta de soques aquest oscil·la entre 0.10 i 0.20 unitats (figura 4.3).

2.1.5 Evolució d'altres metabòlits durant la fermentació

Edwards i Beelman (1989) i Chagnaud *et al.* (1990) descriuen la no transformació d'altres metabòlits presents al vi com a una conseqüència favorable associada a la realització de l'FML utilitzant cèl·lules en condicions de no proliferació cel·lular. Per això, a banda de l'àcid màlic hem quantificat altres metabòlits presents al vi. Pel que respecta a la resta d'àcids orgànics quantificats presents als vins cal dir que generalment no hem detectat variacions quantitatives d'importància. Així, els nivells d'àcid fumàric, àcid cítric i àcid acètic presents al vi sense inocular a unes concentracions de 0.002, 0.060 i 1.400 g L⁻¹ respectivament no presenten modificacions d'importància a la conclusió de totes les vinificacions. Aquest fet ens indica, al cas dels dos primers àcids, que no els consumeixen sota aquestes condicions experimentals. La quasi nul·la producció d'àcid acètic ofereix avantatges interessants per a la utilització a nivell industrial d'aquest procediment. Com era d'esperar, els nivells d'àcid làctic sí que augmenten i de manera correlacionada amb el consum de màlic. En algunes vinificacions es detecta una sobreproducció d'aquest àcid que nosaltres atribuïm a la fermentació làctica produïda a partir de les hexoses residuals presents al vi.

2.1.6 Anàlisi global de l'apartat

De tots aquests resultats podem concloure que l'èxit en la realització de l'FML utilitzant cèl·lules lliures no proliferants d'*O. oeni* depèn entre altres dels factors analitzats en aquests experiments. Així, el primer d'ells i el més important és el pH del vi on es vol induir la fermentació; les degradacions a pH=3.5 són sempre més ràpides i completes que les efectuades a pH=3.1. La influència del pH sobre el creixement i el manteniment de la viabilitat cel·lular és un fet constatat anteriorment (Bousbouras i Kunkee, 1971; Liu i Gallander, 1983; Salou *et al.*, 1991). Tanmateix, amb cèl·lules no proliferants, l'absència de creixement bacterià no és el motiu que afecta el desenvolupament de l'FML (Clementi, 1982; Clementi i Vinti, 1983; Rossi i Clementi, 1984). Cal més bé buscar-lo tant en la inhibició que exerceix el baix pH sobre l'actuació de l'enzim malolàctic com en la disminució neta de l'entrada d'àcid màlic a l'interior cel·lular per la inactivació del sistema de transport (Henick-Kling, 1988; 1989). Aquesta inactivació del transport és la que impedeix el desenvolupament de l'FML per absència de substrat i amb això la generació d'energia. Com a conseqüència, una vegada esgotades les reserves internes de la cèl·lula s'atura el seu metabolisme i la degradació d'àcid màlic deixa de ser efectiva (Henick-Kling, 1989).

De gran importància resulta també el nivell de biomassa cel·lular inicialment inoculada. Tal i com era d'esperar, la taxa de degradació de l'àcid màlic augmenta quan així ho fa la biomassa. Això és especialment cert a partir de nivells inicials d'*O. oeni* al vi al voltant de 10^8 ufc mL⁻¹, independentment d'altres condicions experimentals. Les degradacions de certa importància quantitativa amb nivells de biomassa inferiors, de l'ordre de 10^7 ufc mL⁻¹ només s'aconsegueixen amb la combinació d'altres paràmetres experimentals (pH=3.5 i una soca adequada).

Pel que respecta a les soques, no totes presenten el mateix comportament. Entre les cinc assajades per nosaltres, *O. oeni* T46 és la que pitjor comportament presenta en qualsevol de les vinificacions efectuades (figura 4.4 a). Les soques G6 i N172 són en canvi més apropiades per a ser utilitzades per realitzar l'FML en vins de diferent pH fins i tot amb altes concentracions inicials d'àcid màlic. La inoculació de les soques M41 i M42 només és efectiva en vins amb condicions de pH i concentració de màlic no massa restrictives, quan són inoculades en alta concentració (taula 4.1).

2.2 FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA AMB CÈL·LULES D'*Oenococcus oeni* EN CREIXEMENT CONTINU

El disseny de mètodes alternatius per realitzar l'FML d'una manera ràpida i eficaç ens va dur a intentar induir-la en un sistema de fermentació en continu. Per fer-ho vam utilitzar les soques d'*O. oeni* MA4 i VV5 (annex 3) que eren algunes de les que millors resultats de creixement i degradació d'àcid màlic ens havien ofert als assaigs de pre-caracterització realitzats (capítol 2 d'aquesta tesi). Una vegada inoculats els cultius en vi estèril al biorreactor (annex 1), es va operar el sistema fins que els cultius van realitzar quasi totalment l'FML. Això es va produir tres setmanes després de la inoculació quedant només 0.18 i 0.27 g L⁻¹ d'àcid màlic als biorreactors inoculats amb les soques VV5 i MA4 respectivament, dels 4.17 g L⁻¹ inicialment presents al vi. En aquest moment el nombre de cèl·lules viables es trobava al voltant de 10⁷ ufc mL⁻¹, en ambdues fermentacions i començà el temps "0" de l'experiment en continu (figura 4.5).

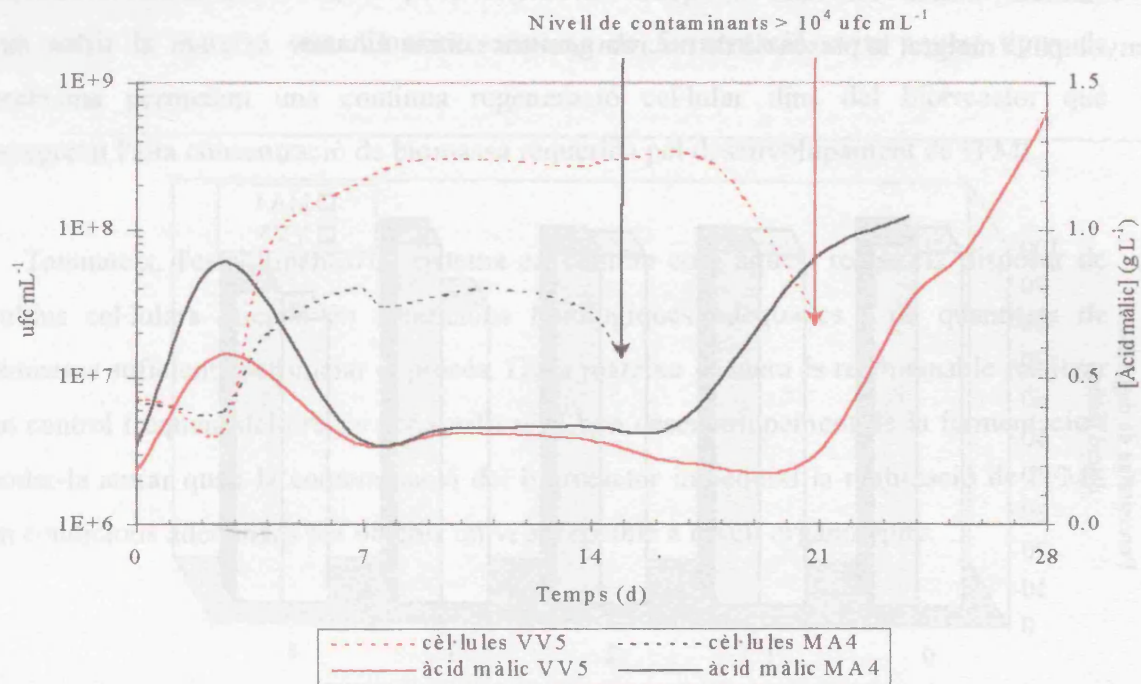


Figura 4.5. Fermentació malolàctica en continu: nivells d'àcid màlic residual al vi i concentració de cèl·lules viables d'*O. oeni* als biorreactors.

Aleshores es va iniciar l'operació en continu dels biorreactors fixant la taxa de dilució (D) en 0.0155 h^{-1} . Això suposava l'establiment d'un flux d'entrada i eixida de 3 mL h^{-1} i el processament d'un volum de vi de 75 mL d^{-1} . La quantitat d'àcid màlic al vi d'eixida es trobava per sota de 0.3 g L^{-1} d'àcid màlic, representant una reducció del 95% sobre la quantitat inicial a l'entrada. Durant l'operació del sistema en continu, el pH del vi, inicialment a 3.5, augmentava fins a 3.7 a l'eixida d'ambdues fermentacions (valor habitual després d'una fermentació en mode discontinu) (Davis *et al.*, 1985b). Les taxes de degradació representen valors 2-4 vegades superiors als detectats en un procés en mode discontinu, on la degradació efectiva de l'àcid màlic requereix l'assoliment previ d'uns elevats nivells de biomassa bacteriana. Així, l'establiment d'un sistema de fermentació com l'aquí descrit, permet acurtar el temps necessari de realització de l'FML i possibilita l'obtenció de vi amb baixes quantitats d'àcid màlic de manera continuada. Els biorreactors van ser operats de manera satisfactòria durant dues (MA4) i tres (VV5) setmanes, moment en què es va detectar un alt nivell de bacteris Gram - contaminants (possiblement bacteris acètics), superior a 10^4 ufc mL^{-1} . Els experiments van continuar durant un total de quatre setmanes per comprovar si l'FML es desenvolupava malgrat la presència de microorganismes contaminants.

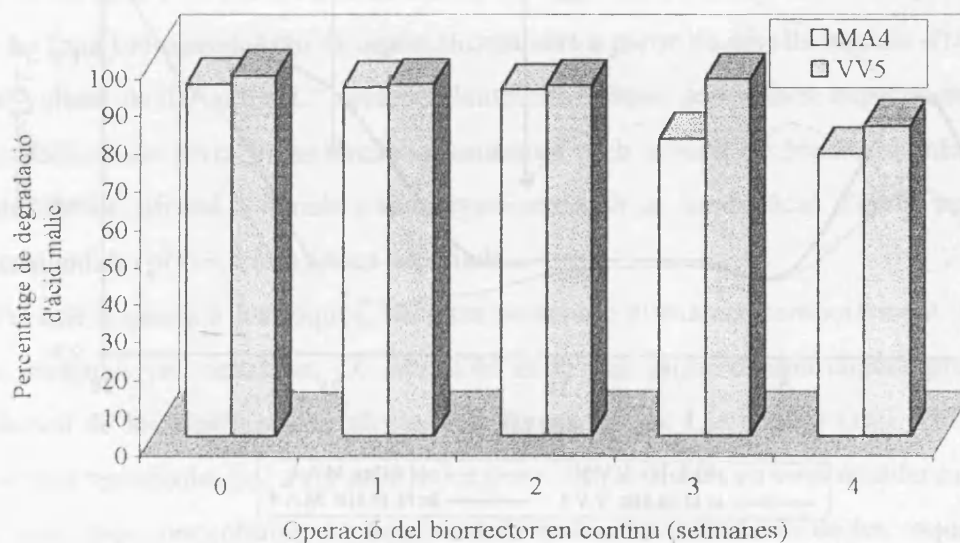


Figura 4.6. Percentatge de degradació d'àcid màlic durant l'operació dels biorreactors en mode continu amb soques d'*O.oeni*.

En eixe moment, la competència entre la soca d'*O. oeni* inoculada i el microorganisme contaminant produïa una reducció en el número de bacteris làctics i disminuïa el percentatge de degradació de l'àcid màlic que encara així es trobava per damunt del 75% respecte a la quantitat inicial (figura 4.6).

A partir d'aquest període el vi resultant no resultava satisfactori a nivell organolèptic, donat que l'augment de la població contaminant exhauria les hexoses residuals al vi (glucosa i fructosa) i produïa elevades concentracions d'àcid acètic (4.0-4.5 g L⁻¹).

Amb el mateix propòsit s'han desenvolupat abans diferents tipus de biorreactors utilitzant cèl·lules immobilitzades. Encara que es van detectar degradacions notables, els processos s'havien d'aturar als 2-7 dies degut a l'estrés químic que sofrien les cèl·lules d'*O. oeni* immobilitzades (Cuenat i Villetaz, 1984; Crapisi *et al.*, 1987). Gao i Fleet (1995) van operar un biorreactor amb reciclatge de cèl·lules durant 56 h obtenint també percentatges de degradació de màlic de l'ordre del 95% respecte de les quantitats inicials. El motiu d'aturada semblava ser el mateix que el detectat pels autors abans esmentats. Els intents realitzats per Naouri *et al.* (1990; 1991) amb *Lactobacillus* sp. van sofrir la mateixa sort. El nostre sistema de fermentació evita aquest tipus de problema permetent una contínua regeneració cel·lular dins del biorreactor que asseguren l'alta concentració de biomassa requerida pel desenvolupament de l'FML.

Tanmateix, l'establiment d'un sistema en continu com aquest requereix disposar de cultius cel·lulars inicials en condicions fisiològiques adequades i de quantitats de biomassa suficients per iniciar el procés. De la mateixa manera és recomanable realitzar un control freqüent del procés per verificar el bon desenvolupament de la fermentació i poder-la aturar quan la contaminació del biorreactor impedeixi la realització de l'FML en condicions adequades per obtenir un vi acceptable a nivell organolèptic.

2.3 FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA AMB CÈL·LULES D'*Oenococcus oeni* IMMOBILITZADES

2.3.1 Taxes d'immobilització i nivells d'adsorció: influència de diferents aspectes

L'adsorció d'*O. oeni* M42 a les esponges de cel·lulosa sense càrrega química fou de l'ordre de 10^8 ufc (mL·g d'esponja)⁻¹. Aquesta taxa d'adsorció suposava que només un 2-5% de les cèl·lules inicialment presents s'adsorbien als 2 g d'esponja. Quan s'utilitzaven esponges amb grups funcionals positius, les taxes d'adsorció augmentaven arribant-se a adsorbir al voltant de 10^9 ufc (mL·g d'esponja)⁻¹. Aquests increments, d'un ordre de magnitud, suposaven la immobilització d'entre el 50 i el 75% de les cèl·lules presents a la suspensió utilitzant respectivament les esponges amb grups funcionals DEAE i DE d'esponja (figura 4.7). El procés d'immobilització d'*O. oeni* sobre les esponges neutres (sense recobriment de grups funcionals) és un procés únicament físic que es produeix per l'ancoratge de les cadenes de cèl·lules a una malla amb una extensa xarxa de porus de 25-100 µm de diàmetre (Scott i O'Reilly, 1995).

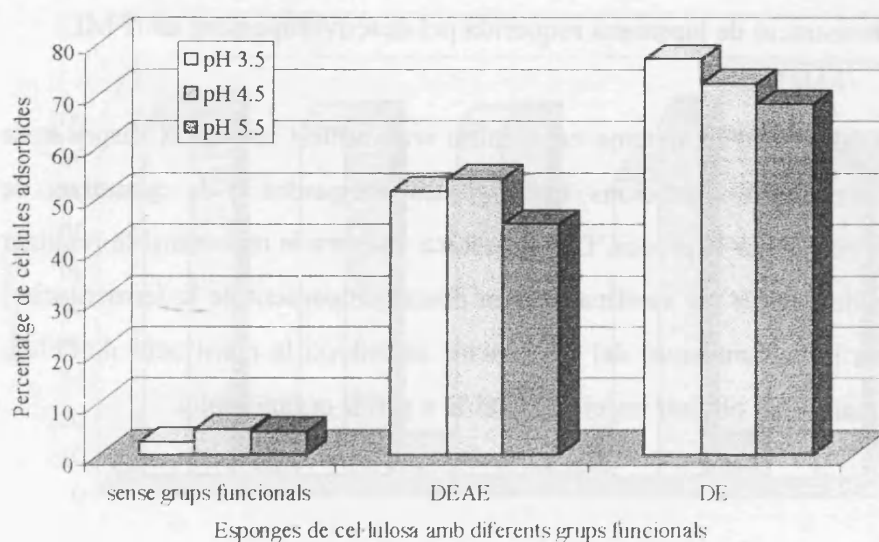


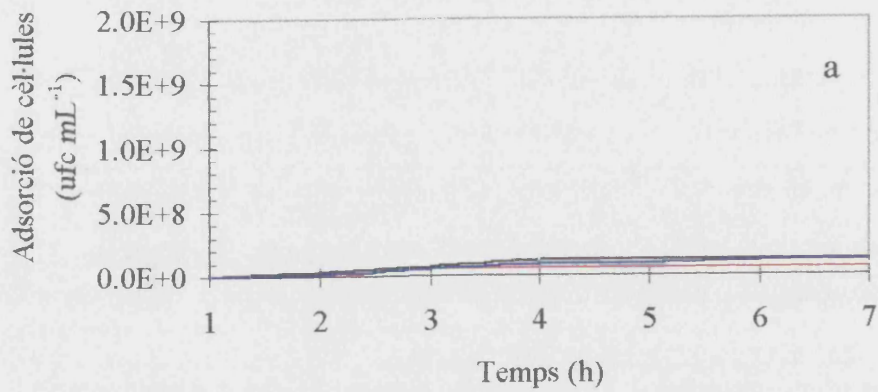
Figura 4.7. Taxes finals d'immobilització de cèl·lules d'*O. oeni* M42, a partir de suspensions en tapó TF a diferent pH, sobre esponges de cel·lulosa amb grups funcionals de diferent càrrega química.

Les dimensions d'aquesta estructura porosa permeten una penetració completa de les cèl·lules, que troben un microhàbitat idoni per al seu desenvolupament on la transferència de nutrients és perfecta. D'aquesta manera únicament poden ser adsorbides les cèl·lules que penetren dins l'esponja. Si enlloc d'aquestes esponges neutres s'utilitzen altres amb grups funcionals bàsics (DE o DEAE) les taxes d'adsorció augmenten degut a la interacció amb les cèl·lules d'*O. oeni* que presenten càrrega negativa (figura 4.7). Això possibilita que inicialment les cèl·lules formen una monocapa, per a posteriorment servir com a punt d'ancoratge que permeti l'engantxall de més cèl·lules. Les diferents taxes d'adsorció entre les esponges amb grups funcionals DE i DEAE es fonamenten en la diferent longitud de la cadena que presenten cadascun d'aquests grups. Així, per a successius assaigs, triarem les esponges amb grup funcional DE que són les que millors taxes d'adsorció ens ofereixen.

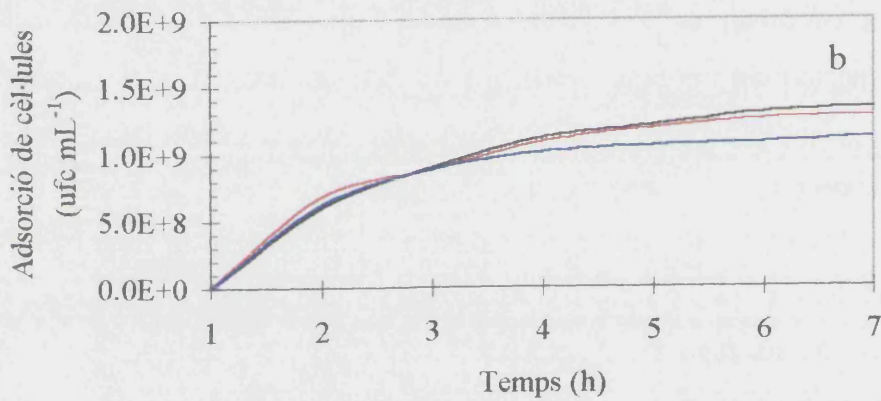
L'adsorció no fou un procés de desenvolupament uniforme (figura 4.8). Durant les primeres 2-3 h s'adsorbiren al voltant del 75% de les cèl·lules totals. Aquestes cèl·lules eren les que connectaven directament amb la matriu esponjosa i presentaven una unió més estable i efectiva. Després d'aquesta fase inicial d'adsorció, el procés continuava d'una manera més lenta i menys eficaç. En aquest període, les cèl·lules s'enganxaven a aquelles cèl·lules inicialment adsorbides a l'esponja fins arribar a una fase d'estabilització en 6-7 h. El manteniment del procés durant 24 h no va suposar cap increment en la càrrega final de les esponges, per la qual cosa, en successius assaigs, el temps d'immobilització no excedia d'aquest termini.

En aquests experiments es va comprovar de manera paral·lela la influència del pH del medi de suspensió sobre la taxa d'adsorció (figura 4.8). A les esponges sense grup funcional afegit, la influència del pH fou mínima (dins del rang 3.5-5.5) i només es detectà una lleugera disminució de la taxa d'immobilització a pH 3.5, en comparació amb els valors superiors de pH (figura 4.8a). Scott *et al.* (1995) van estudiar la influència del pH realitzant immobilitzacions en aquest tipus d'esponja assajant valors de pH entre 2.5 i 10 amb els mateixos resultats. Els assaigs efectuats utilitzant esponges modificades amb grups funcionals DE o DEAE oferiren resultats similars (figura 4.8b; c). Només s'observaven lleugeres millories a pH baixos (3.5 i 4.5) possiblement degudes a una major interacció química entre els grups funcionals bàsics i la suspensió cel·lular àcida (figura 4.7).

Esponges sense càrrega



Esponges amb càrrega (DEAE)



Esponges amb càrrega (DE)

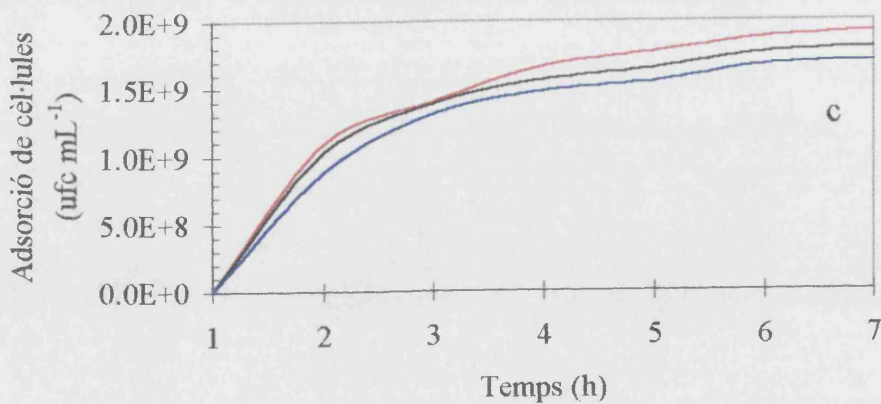
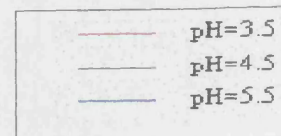


Figura 4.8. Taxes d'adsorció d'*O. oeni*, en suspensions a diferents pH, a esponges de cel·lulosa sense (a) i amb (b, c) càrrega.



Un altre punt que calia determinar era la influència del tipus de medi de suspensió utilitzat sobre la taxa d'immobilització de les cèl·lules. Com es veu a la figura 4.9, el medi a partir del qual es va realitzar la immobilització de les cèl·lules d'*O. oeni* condicionà tant la velocitat d'immobilització com la càrrega final de cèl·lules adsorbides a l'esponja. Quan la immobilització es realitzà a partir d'MLO (annex 1) els components del medi, principalment les proteïnes, entraren en competència amb *O. oeni* per adsorbir-se a les esponges disminuint l'eficàcia del procés. Si abans de realitzar la immobilització es centrifugaven les cèl·lules i es resuspenien en tampó TF (annex 1), el percentatge de cèl·lules adsorbides augmentava al voltant d'un 20%. Aquest efecte, comprovat amb esponges modificades amb els dos tipus de grups funcionals bàsics utilitzats (DE i DEAE), era degut a la mínima competència existent entre els bacteris i els ions del tampó pels llocs d'unió a l'esponja. La realització d'experiments anàlegs utilitzant *Saccharomyces cerevisiae* amb esponges sense grups funcionals modificats ofereix un resultat invers. En aquest cas, el medi de cultiu actua com a lligam entre les cèl·lules i les esponges permetent una immobilització parcial que arriba a representar un 40% dels llevats originalment presents a la suspensió (Scott *et al.*, 1995).

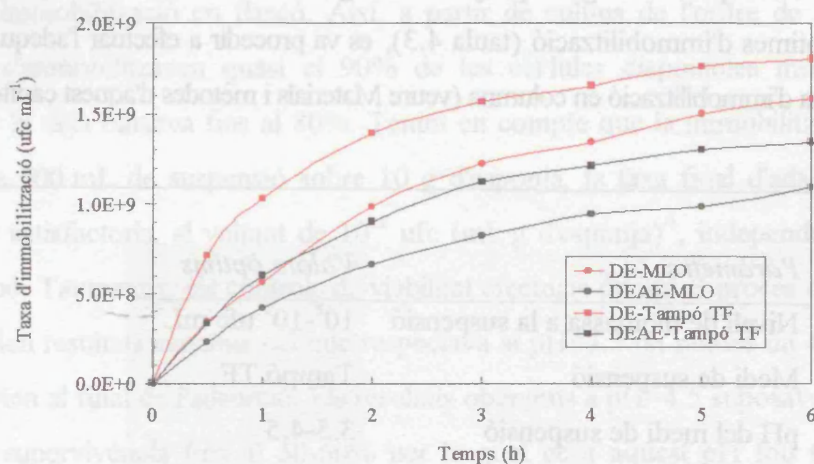


Figura 4.9. Influència del medi de suspensió sobre la taxa d'immobilització de cèl·lules d'*O. oeni*.

Per a determinar la capacitat de càrrega màxima de les esponges es van realitzar assaigs d'immobilització partint de suspensions cel·lulars d'*O. oeni* M42 entre 10^6 i 10^{11} ufc mL⁻¹. Així es

va determinar que nivells de 10^8 - 10^9 ufc mL⁻¹ eren els òptims per realitzar les immobilitzacions. Biomasses inferiors de cèl·lules eren adsorbides completament mentre que la utilització de concentracions superiors si bé es traduïa en augments de la taxa d'immobilització, provocava una alta mortalitat cel·lular en sobrepassar-se la càrrega màxima del sistema (taula 4.2). Aquest assaig es va efectuar amb cèl·lules resuspeses en tampó TF (pH 4.5) adsorbint-se sobre esponges amb grup funcional DE durant 7 h.

Biomassa inicial a la suspensió	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}
Percentatge de cèl·lules adsorbides	99.8	100.0	86.3	71.4	68.9*

* La viabilitat cel·lular decreixia ràpidament per la qual cosa el número de cèl·lules efectives era inferior.

Taula 4.2. Percentatge de cèl·lules d'*O. oeni* immobilitzades a partir de suspensions cel·lulars amb diferent nivell inicial de biomassa.

Tots aquests assaigs es van efectuar en matrassos Erlen-Meyer de 250 mL amb 100 mL de medi de suspensió i 2 g d'esponja. Una vegada es van determinar quines eren les condicions òptimes d'immobilització (taula 4.3), es va procedir a efectuar l'adequació del procés a un sistema d'immobilització en columna (veure Materials i mètodes d'aquest capítol).

Paràmetre	Valors òptims
Nivell de biomassa a la suspensió	10^8 - 10^9 ufc mL ⁻¹
Medi de suspensió	Tampó TF
pH del medi de suspensió	3.5-4.5
Temps d'immobilització	6-7 h
Grup funcional de l'esponja (2 g)	DE o DEAE

Taula 4.3. Condicions òptimes per a la immobilització de cèl·lules d'*O. oeni* M42.

Els primers assaigs efectuats en columna es van realitzar per determinar la influència del pH sobre el procés d'immobilització (figura 4.10).

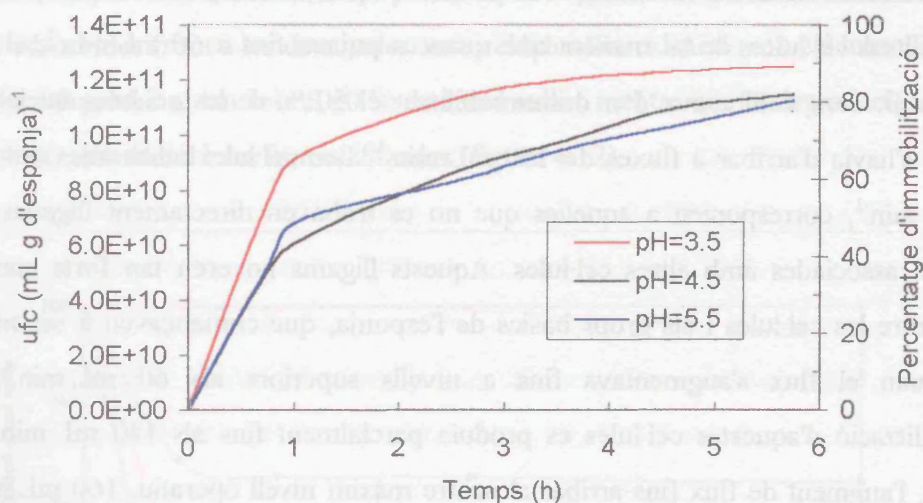


Figura 4.10. Taxes d'adsorció de cèl·lules d'*O. oeni*, en suspensions a diferents pH, a sponges de cel·lulosa amb grups bàsics DE. Experiments en columna.

El valor de pH afectava a la taxa d'adsorció cel·lular en major mesura que l'observada amb la immobilització en flascó. Així, a partir de cultius de l'ordre de 10^9 ufc mL⁻¹ a pH 3.5 s'immobilitzaven quasi el 90% de les cèl·lules disponibles mentre que a pH superior la taxa baixava fins al 80%. Tenint en compte que la immobilització s'efectua a partir de 500 mL de suspensió sobre 10 g d'esponja, la taxa final d'adsorció ens ofería resultats satisfactoris, al voltant de 10^{11} ufc (mL·g d'esponja)⁻¹, independentment del pH del tampó. Tanmateix, els controls de viabilitat efectuats durant el procés d'immobilització ens oferien resultats negatius pel que respectava al pH=3.5 on només un 4-6% del cultius sobreviuen al final de l'adsorció. Els resultats obtinguts a pH=4.5 suposaven augmentar la taxa de supervivència fins al 50-60% per la qual cosa aquest pH fou triat per assaigs posteriors. Aquestes taxes d'immobilització representen nivells finals d'adsorció en columna d'entre un i dos ordres de magnitud superiors als detectats als assaigs en flascons Erlen-Meyer. Aquest fet s'explica per la major compactació de les sponges i un flux dirigit que faciliten l'adsorció de les cèl·lules.

L'últim aspecte que ens proposàvem estudiar era l'optimització del flux de treball per realitzar les fermentacions en columna, determinant-lo amb experiments de desimmobilització (figura 4.11). Treballant amb fluxos inferiors a 30 mL min^{-1} , no es produïa desimmobilització cel·lular. A partir d'aquest fluxe, es començaven a desimmobilitzar cèl·lules, de tal manera que quan es pujava fins a 60 mL min^{-1} , el 25% del cultiu d'*O. oeni* s'alliberava. Per desimmobilitzar el 50 % de les cèl·lules inicialment adsorbides s'havia d'arribar a fluxes de 150 mL min^{-1} . Les cèl·lules alliberades entre els $30\text{-}60 \text{ mL min}^{-1}$, corresponien a aquelles que no es trobaven directament lligades a la matriu sinó associades amb altres cèl·lules. Aquests lligams no eren tan forts com els existents entre les cèl·lules i els grups bàsics de l'esponja, que començaven a ser menys efectius quan el flux s'augmentava fins a nivells superiors als 60 mL min^{-1} . La desimmobilització d'aquestes cèl·lules es produïa parcialment fins als 140 mL min^{-1} . A partir d'ací, l'augment de flux fins arribar al nostre màxim nivell operatiu, 160 mL min^{-1} , no es traduïa en un increment de cèl·lules en el rentat. Al voltant d'un 50 % de les cèl·lules inicialment immobilitzades s'associaven internament a l'esponja i només era possible desimmobilitzar-les substituint el tampó TF pH 4.5, per un agent més agressiu, HCl 2M.

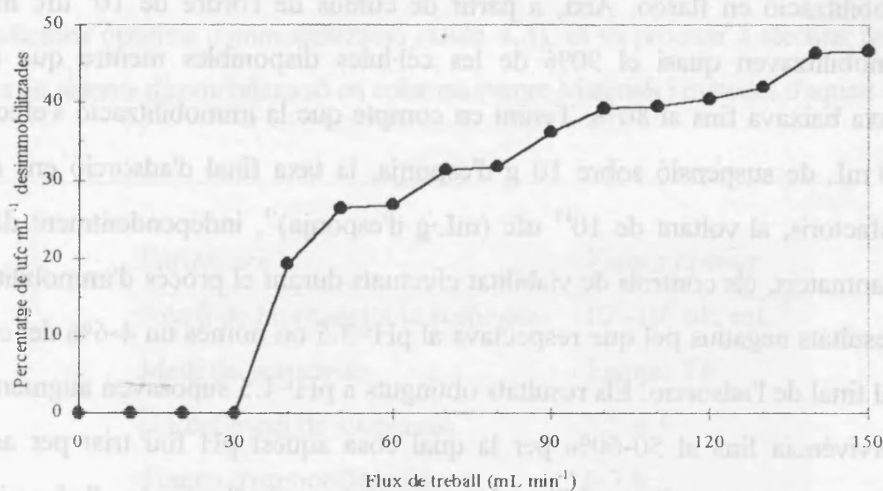


Figura 4.11 Efecte del flux de treball sobre la desimmobilització de cèl·lules d'*O. oeni* inicialment adsorbides a esponges de cel·lulosa amb grups bàsics DE.

La conseqüència d'aquest experiment fou la determinació d'un límit màxim de flux de treball al voltant de 150 mL min^{-1} i d'un límit efectiu situat al voltant de 30 mL min^{-1} on no es produïa un nivell de desimmobilització detectable.

2.3.2 Fermentacions en flascó

Una vegada s'havien establert les condicions d'immobilització, es van realitzar experiments de fermentació per assajar la degradació de l'àcid màlic per les cèl·lules adsorbides. El procés d'immobilització permetia un augment en les taxes d'activitat de les cèl·lules adsorbides front a les detectades amb cèl·lules lliures. Així amb cèl·lules lliures no s'arribava a degradar ni tan sols el 50 % de l'àcid màlic, mentre que la degradació era total amb la utilització de cèl·lules immobilitzades (figura 4.12).

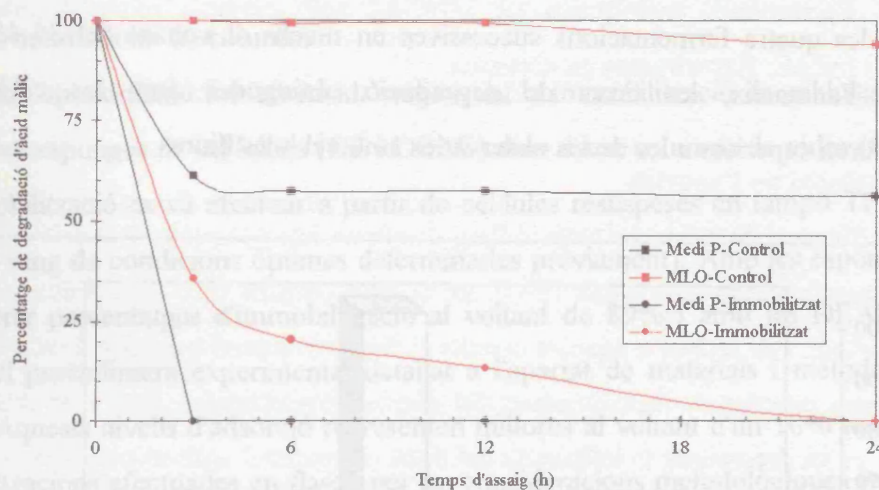


Figura 4.12. Fermentació malolàctica en vi sintètic amb cèl·lules d'*O. oeni* M42 immobilitzades en esponges DE-cel·lulosa a partir de cultius crescuts en diferents medis.

Tanmateix, com es descriu al capítol 2 d'aquesta tesi, l'estabilitat del cultius d'*O. oeni* en vi es veia notablement augmentada quan aquestes cèl·lules es pre-cultivaven abans en un medi de cultiu, com el Medi P, que facilitara la seva adaptació al vi. Això permetia que en menys de tres hores, els 3.5 g d'àcid màlic inicials es degradaren completament. Així, la degradació del 100 % de l'àcid màlic inicialment present al vi sintètic fou quatre vegades més ràpida quan les cèl·lules immobilitzades havien crescut en Medi P que quan ho havien fet en MLO (annex 1). La degradació final, amb cèl·lules crescudes en MLO era total, però requeria al voltant de 24 h per efectuar-se. La pre-inoculació de les cèl·lules en Medi P, requereix un temps addicional de 2-3 dies però permet obtenir degradacions totals de l'àcid màlic en poques hores. Els resultats de les taxes de degradació aquí exposats ens aconsellaven la immobilització a partir de Medi P, per la qual cosa es va seguir aquest procediment als següents experiments.

La següent experiència es va efectuar realitzant un procés anàleg però posant en contacte les cèl·lules crescudes en Medi P, després de la immobilització, amb vi (annex1). Després de 24 h de fermentació, s'eliminava el vi i es canviava per vi fresc (figura 4.13). El cicle de 24 h es repetia varies vegades per veure l'estabilitat del procés. Així, al primer cicle de fermentació, les cèl·lules immobilitzades degradaven tot l'àcid màlic present al vi (3.5 g L^{-1}) mentre que les cèl·lules lliures utilitzades com a control només eren capaces de consumir un 50 % de l'inicial. A les successives fermentacions realitzades amb les mateixes cèl·lules, el percentatge de degradació amb les cèl·lules immobilitzades es reduïa dràsticament a la meitat. El decreixement no fou tan notable amb les cèl·lules control mantenint-se a les quatre fermentacions successives en nivells al voltant del 35-45 % (figura 4.13). Tanmateix, les taxes de degradació obtingudes amb les cèl·lules immobilitzades eren superiors a les de les observades amb cèl·lules lliures.

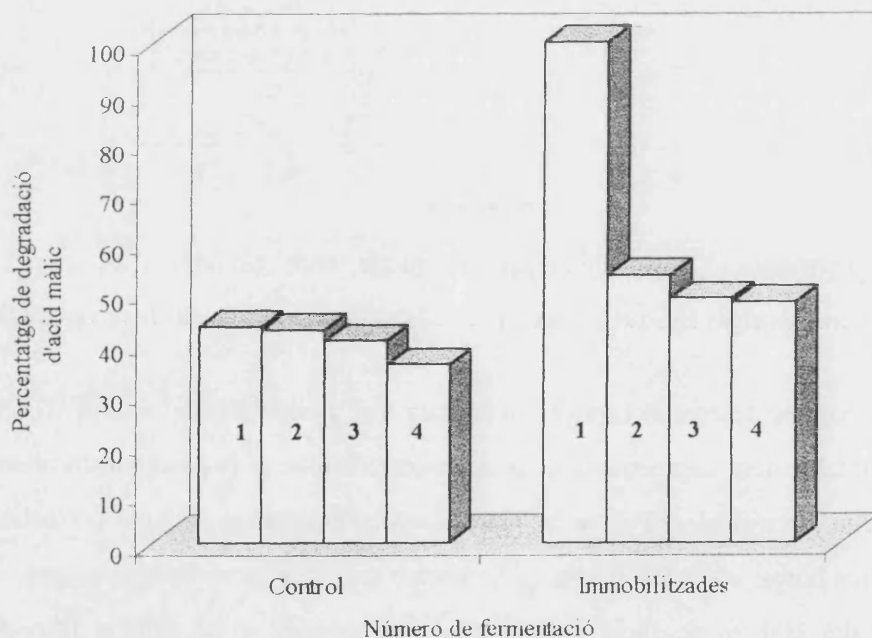


Figura 4.13. Fermentació malolàctica en vi amb cèl·lules d'*O. oeni* M42 immobilitzades en esponges DE-cel·lulosa. 1) cèl·lules crescudes en Medi P. 2, 3 i 4) cèl·lules provinents de fermentacions anteriors en vi.

Cal destacar el decreixement en l'activitat de les cèl·lules immobilitzades, quan es comparaven els successius cicles de fermentacions. Aquest comportament era explicable en part pel fet de que la primera fermentació era desenvolupada per tres grups de

cèl·lules: les directament immobilitzades sobre la matriu, les lligades d'una manera més lleugera a les cèl·lules unides a la matriu i les suspeses al medi intersticial. Aquestes cèl·lules, sense una unió directa a les esponges, eren eliminades amb el vi ja fermentat i només les íntimament lligades eren les encarregades de realitzar la resta de fermentacions. Aquesta pèrdua de cèl·lules no es produïa amb els assaigs control, on la pràctica totalitat (98%) era recuperada per centrifugació. Això permetia mantenir els percentatges de degradació als successius cicles de fermentació que amb tot eren sempre inferiors als aconseguits amb les cèl·lules immobilitzades.

2.3.3 Fermentacions en columna

Un altra aproximació fou efectuada mitjançant la immobilització de cèl·lules d'*O. oeni* M42 sobre esponges de cel·lulosa (DE i DEAE) dins d'una columna de vidre (figura 4.2). La immobilització es va efectuar a partir de cèl·lules resuspeses en tampó TF a pH 4.5 (dins del rang de condicions òptimes determinades prèviament). Amb les esponges DE es van obtenir percentatges d'immobilització al voltant de 89% i amb les DEAE de 62% seguint el procediment experimental detallat a l'apartat de materials i mètodes d'aquest capítol. Aquests nivells d'adsorció representen millores al voltant d'un 10% respecte a les immobilitzacions efectuades en flascó per les consideracions metodològiques exposades a l'apartat 2.3.1.

Pel que respecta a la fermentació en sí, aquesta fou efectuada en paral·lel amb tres columnes contenint: 1) cèl·lules immobilitzades en esponges de DE, 2) cèl·lules immobilitzades en esponges de DEAE i 3) cèl·lules lliures no immobilitzades utilitzades com a control. La quantitat de cèl·lules control es va calcular en base al total de cèl·lules immobilitzades en les esponges de cel·lulosa amb radical de càrrega bàsica DE. La quasi total degradació de l'àcid màlic es va completar en menys de 3 dies tant amb les cèl·lules lliures com amb les immobilitzades en esponges carregades amb DE (figura 4.14). Tanmateix, i en aquest període de temps, el nombre de cèl·lules immobilitzades sobre esponges-DEAE no fou suficientment alt, i només eren degradats un 75 % dels 5 g L⁻¹ d'àcid màlic inicial.

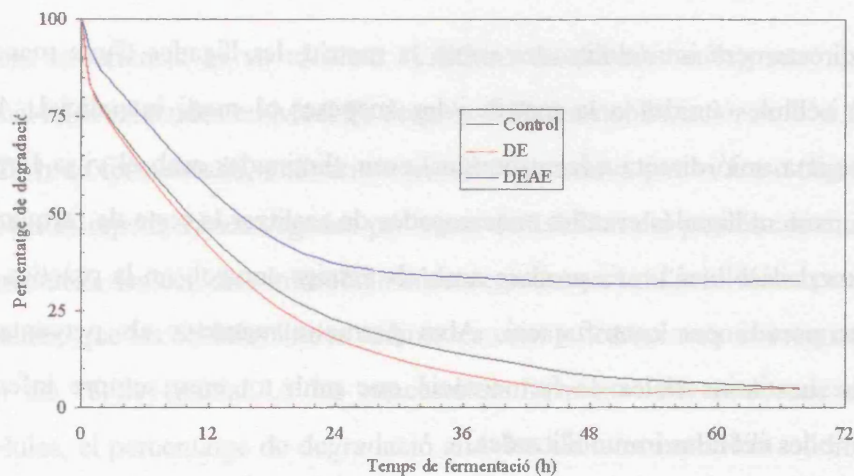


Figura 4.14. Fermentació malolàctica en MBC-M amb cèl·lules immobilitzades en esponges DE i DEAE. Experiments en columna.

2.3.4 Anàlisi global de l'apartat

Els assaigs d'immobilització efectuats al llarg d'aquesta tesi permeten deduir la possible utilització d'aquesta tècnica per induir l'FML en vi amb cèl·lules d'*O. oeni* d'una manera segura i controlada. Per arribar a aquesta conclusió fou prèviament necessari l'establiment de les condicions òptimes de funcionament del sistema experimental. Així, i en diferents fases d'assaig, es va determinar la influència del tipus de material utilitzat com a matriu de suport, triant-se les esponges de cel·lulosa, front a altres materials convencionals, pels avantatges que oferien a diferents nivells (veure introducció). Així mateix, es va analitzar la possibilitat de modificar químicament les esponges afegint radicals amb diferents càrregues. Es va comprovar la major capacitat per adsorbir cèl·lules de les esponges carregades amb grups laterals bàsics (DE i DEAE) front a aquelles sense càrrega o amb càrrega negativa (CM). Aquesta millora en la taxa efectiva d'immobilització així com en els nivells d'adsorció finals era possible per les interaccions electroquímiques establertes entre les cèl·lules (amb càrrega negativa) i les esponges de cel·lulosa amb DE (i DEAE) carregades positivament. A més, es va determinar com la influència del pH (dins d'uns límits fisiològics) no afectava notablement el procés d'immobilització però sí, la viabilitat dels cultius que disminuïa quan baixava el pH. Això ens va fer optar per treballar a un pH=4.5 que oferia una relació acceptable entre la taxa d'adsorció i la viabilitat. Així mateix, es va demostrar la interferència negativa dels medis de cultiu rics en proteïnes sobre les taxes d'immobilització i es va preferir realitzar el procés a partir de cèl·lules resuspeses en tampó. Els experiments en columna foren realitzats basant-se en les

conclusions obtingudes a partir dels assaigs en flascons. Amb les columnes s'aconseguia augmentar els nivells finals de biomassa adsorbida degut a una major compactació de les sponges i un flux dirigit que facilitava el procés. Aquest flux de treball fou també estudiat arribant-se a triar un valor òptim de 30 mL min^{-1} .

Una vegada optimitzats els valors dels paràmetres d'immobilització (taula 4.3), es van efectuar les fermentacions. Les primeres aproximacions experimentals, efectuades en flascons Erlen-Meyer, ens permetien comprovar com els nivells de degradació d'àcid màlic eren superiors amb les cèl·lules immobilitzades que amb les lliures. Així mateix, l'efectivitat del sistema s'augmentava notablement quan *O. oeni* era pre-cultivat en Medi P abans de procedir a la seva immobilització sobre les sponges. Aquests experiments efectuats en un sistema semi-continu amb flascons Erlen-Meyer foren posteriorment assajats, d'una manera preliminar amb un muntatge experimental en columna amb un circuit tancat (figura 4.2) amb resultats esperançadors.

2.4 RECAPITULACIÓ

En aquest últim capítol de resultats, s'ha analitzat diferents tipus de sistemes experimentals alternatius a la fermentació malolàctica tradicional, amb l'objectiu de determinar la seva viabilitat tecnològica. En aquest sentit, podríem anomenar "processos alternatius" a aquells que aconseguen la mateixa finalitat, la degradació de l'àcid L-màlic present al vi, però d'una manera diferent a la tradicional. La manera "tradicional" consisteix en la inoculació d'un vi amb una quantitat variable de cèl·lules d'*O. oeni*, al voltant de 10^5 ufc mL^{-1} , que es desenvolupen i, després de 2-3 setmanes, assoleixen nivells d'entre 10^7 - 10^8 ufc mL^{-1} suficients per produir una degradació d'àcid màlic acceptable. Òbviament, aquest procés té diferents inconvenients entre els que cal citar el llarg temps necessari per al desenvolupament dels bacteris en vi amb el consegüents riscos microbiològics associats.

La manera de reduir aquest llarg temps necessari pel desenvolupament tradicional de l'FML en vi, consisteix en la inducció del procés partint d'un elevat nombre de cèl·lules que realitzen la degradació tan aviat com es posen en contacte amb el vi. En l'apartat experimental d'aquesta tesi, hem realitzat un abordatge múltiple del procés posant a punt diferents sistemes per realitzar l'FMI en vi, com són la tecnologia de cèl·lules lliures no

proliferants (apartat 2.1), cèl·lules en creixement continu (apartat 2.2) i cèl·lules immobilitzades (apartat 2.3) d'aquest capítol. Cadascuna d'aquestes tecnologies presenta característiques diferencials respecte a la resta, mantenint però un tret comú consistent en eixa disponibilitat d'un elevat nombre de cèl·lules inicials. Realitzar una comparació matemàtica entre tots aquests processos no és un tasca fàcil, donat que, si bé l'objectiu final, la ràpida i efectiva degradació de l'àcid màlic present al vi és comú, la preparació de les cèl·lules és diferent. No obstant, a la taula 4.4 es presenta un resum orientatiu normalitzat dels resultats obtinguts.

Tècnica	Consum d'àcid màlic (g L ⁻¹ d ⁻¹)	ufc mL ⁻¹
Creixement tradicional ¹	0.25	≈ 10 ⁷
Continu ²	0.98	≈ 10 ⁸
Cèl·lules lliures (no proliferants) ³	2.00	10 ⁷ -10 ⁸
Cèl·lules immobilitzades (assaigs en flascó) ⁴	1.75	≈ 10 ⁹
Cèl·lules immobilitzades (assaigs en columna) ⁵	1.70	≈ 10 ¹²

¹ Inoculació d'un vi amb *O. oeni*, al voltant de 10⁵ ufc mL⁻¹, on després de 2-3 setmanes de creixement bacterià, s'assoleixen biomasses superiors i es produeix una degradació d'àcid màlic acceptable.

² Dades obtingudes a partir del moment en que es comença a operar el biorreactor en mode continu i s'estabilitza la taxa de degradació.

³ Dades òptimes estimades a partir dels resultats exposats a la taula 4.1. Taxes de degradació calculades a partir dels resultats de les primeres 24 h de reacció.

⁴ Dades obtingudes a partir del primer cicle de fermentació (24 h) amb cultius pre-cultivats en Medi P (annex 1). Esponges amb càrrega bàsica DE.

⁵ Fermentació preliminar en MBC-M. Dades obtingudes amb esponges amb càrrega bàsica DE (annex 1)

Taula 4.4. Taxes relatives de degradació d'àcid màlic amb *O. oeni* mitjançant diferents tècniques experimentals.

La normalització de les dades d'aquesta taula s'ha efectuat sense tenir en compte els possibles inconvenients de l'escalat. Òbviament, una anàlisi més exhaustiva del processos, requeriria la seva aplicació preliminar en planta pilot per veure el seu comportament real fora del laboratori. Així i tot, resulta interessant veure en aquest resum com, qualsevol dels processos que anomenem alternatius permet incrementat d'una manera acceptable els resultats obtinguts en una FML tradicional, on la mitjana de consum d'àcid màlic no sol superar els $0.25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A més, cal remarcar que es tracta d'un promedi de dades, i que un seguiment periòdic del procés tradicional permet veure com la degradació efectiva es produeix al final del procés de creixement bacterià, quan la població assoleix nivells al voltant de 10^7 - 10^8 ufc mL^{-1} . Així, l'establiment d'un procés en continu, a partir d'aquestes mateixes cèl·lules i amb eixos nivells poblacionals (10^7 - 10^8 ufc mL^{-1}) permetria quadruplicar la taxa de degradació diària d'àcid màlic (taula 4.4). Millors resultats poden obtenir-se mitjançant la inducció amb un elevat nombre de bacteris en condicions de no proliferació cel·lular. Així, tant amb cèl·lules lliures com amb immobilitzades sobre esponges de cel·lulosa amb cadenes laterals de càrrega bàsica és possible l'obtenció de taxes de degradació 7-8 vegades superiors a les detectades en una fermentació tradicional (taula 4.4).

Aquestes dades ens permeten assegurar l'eficàcia d'aquests sistemes alternatius en la ràpida degradació de l'àcid màlic i, en ocasions, sota condicions físico-químiques adverses que no suporten el creixement bacterià. Cal pensar en la realització de futurs experiments que estableixen la utilització d'aquestes tècniques, tant per separat, com en una conjunció d'algunes elles amb la finalitat de millorar el procés malolàctic. Així mateix, resultaria interessant la realització de futurs assaigs en planta pilot per implementar sistemes de fermentació a mitjana escala, on es pogueren referendar els resultats obtinguts al laboratori, i on s'adaptaren les condicions d'operació dels sistemes per a la seva aplicació pràctica.

CONCLUSIONS

1. A partir de diferents mostos i vins foren aïllades catorze soques de bacteris làctics que presentaven característiques morfològiques, fisiològiques i bioquímiques concordants amb les descripcions d'individus (de l'espècie *Oenococcus oeni* (abans *Leuconostoc oenos*). Les soques que creixien millor en vi foren utilitzades per analitzar la producció de components volàtils mitjançant GC. Això ens va permetre determinar l'augment dels nivells globals d'alcohols superiors, esters i àcids orgànics, descrits com favorables per l'aroma final del vins.
2. El creixement d'*O. oeni* als medis de pre-cultiu P¹ i 10, abans d'inocular-lo en vi, permetia augmentar la taxa de supervivència així (com la implantació dels cultius en vi alhora que es disminuïa el temps necessari per realitzar l'FML).
3. La conservació de soques d'*O. oeni* per congelació o liofilització oferia taxes de supervivència variables depenent del medi de pre-cultiu utilitzat (MLO, vi o Medi P). Només les pre-cultivades en Medi P (o vi) eren capaces de realitzar l'FML (3-4 setmanes). Generalment, les taxes de supervivència per a un mateix medi de pre-cultiu i soca, amb la liofilització eren inferiors a les obtingudes amb la congelació, però el temps necessari per completar l'FML era el mateix. Això permet la seva utilització quan es vol mantenir les soques a llarg termini.
4. La clau del funcionament del metabolisme de carbohidrats a *O. oeni* es centra en la capacitat dels diferents sistemes cel·lulars per regenerar els cofactors reduïts que es generen a les etapes inicials de la via heterolàctica. En absència d'oxigen, la metabolització dels carbohidrats i la regeneració de cofactors són satisfactòries. Sota una atmosfera aeròbia, les NAD(P)H oxidases no són actives i, si no es disposa de fructosa per a reduir-la a manitol, la tasca de reoxidació recau sobre els enzims de la via de formació de l'etanol. Mentre aquests enzims funcionen activament, els nivells d'NAD(P)H es troben controlats i permeten funcionar el sistema. Quan els enzims s'inhibeixen per la presència d'oxigen, el $ratio\ NAD(P)H/NAD(P)^+$ augmenta, el metabolisme s'atura i es deté el creixement. L'addició de diferents substrats reductors (fructosa, piruvat o cisteïna) al medi permet solucionar els problemes de regeneració dels cofactors reduïts, en diferent grau.

CONCLUSIONS

5. L'anàlisi de diferents sistemes alternatius, per promoure la fermentació malolàctica realitzada de manera tradicional, ens ha permès determinar la seva aplicació tecnològica. Així, l'establiment d'un sistema de fermentació amb cèl·lules d'*O. oeni* en creixement continu, amb nivells poblacionals entre 10^7 - 10^8 ufc mL⁻¹, permet disminuir el temps necessari per realitzar l'FML en 1-2 setmanes. Això possibilitava l'assoliment de taxes de degradació fins a quatre vegades superiors a les detectades en un procés en discontinu, sense que es detectaren diferències ni en els valors finals de pH ni en els metabòlits resultants.
6. La inducció d'un procés de fermentació malolàctica utilitzant elevades quantitats de cèl·lules lliures en condicions de no proliferació cel·lular permet augmentar notablement les taxes de degradació. L'obtenció de resultats satisfactoris en la ràpida degradació de l'àcid màlic, utilitzant aquesta aproximació metodològica, depèn de diferents factors físico-químics i microbiològics, entre ells del pH, concentració inicial d'inòcul i soça malolàctica utilitzada. Les soques G6 i N172 foren les que millors resultats de degradació ens oferiren especialment a pH=3.5 i concentracions inicials d'inòcul d'entre 10^7 i 10^8 ufc mL⁻¹.
7. La immobilització de cèl·lules d'*O. oeni* M42 sobre esponges de cel·lulosa amb cadenes laterals de càrrega positiva (DEAE i DE) foren notablement superiors a les detectades amb altres esponges sense grups laterals químicament modificats, arribant-se a assolir nivells de l'ordre de 10^9 ufc (mL·g d'esponja)⁻¹. Així mateix, es van observar taxes d'adsorció similars a valors de pH que oscil·laven entre 3.5 i 5.5, triant-se un pH intermedi (4.5) que a més afavoria la supervivència cel·lular.
8. El pre-cultiu en medi P permetia augmentar la taxa de realització de l'FML amb cèl·lules immobilitzades d'*O. oeni* front als resultats obtinguts amb MLO. La immobilització de cèl·lules permetia realitzar un mínim de quatre fermentacions en un procés semi-continu, assolint taxes de degradació superiors a les obtingudes amb cèl·lules lliures i sense necessitat de recuperar els cultius. Això suposava un augment efectiu de l'FML en 7-8 vegades respecte a les taxes establertes per a un procés tradicional amb creixement previ de les soques en el vi que es vol desacidificar.

BIBLIOGRAFIA

- Agrelo, D. (1987) Estudio taxonómico de bacterias lácticas epifitas en uvas de Galicia. *Microbiologia SEM* **3**, 213-216.
- Amachi, T. (1975) Chemical structure of a growth factor (TJF) and its physiological significance for malo-lactic bacteria. *En: Lactic acid bacteria in beverages and foods*. Carr, J.G., Cutting, C.V. i Whiting, G.C. (Eds.) Academic Press, Londres. pp. 103-118
- Amachi, T. i Yoshizumi, H. (1969) Studies on the bacteria isolated from wine. Part V. Isolation and properties of the growth factor from tomato juice for a bacterium inducing malolactic fermentation. *Agr. Biol. Chem.* **3**, 139-146.
- Amachi, T., Imamoto, S i Yoshizumi, H. (1971) A growth factor for malo-lactic fermentation bacteria. II. Structure and synthesis of a novel pantothenic acid derivative isolated from tomato juice. *Agr. Biol. Chem.* **35**, 1222-1230.
- Amerine, M.A. i Kunkee, R.E. (1968) Microbiology of winemaking. *Ann. Rev. Microbiol.* **22**, 323-358.
- Amerine, M.A., Berg, H.W., Kunkee, R.E., Ough, C.S., Singleton, V.L. i Webb, A.D. (1982) *Technology of wine making*. (Ed.) The AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut.
- Anders, R.F., Hogg, D.M. i Jago, G.R. (1970) Formation of hydrogen peroxide by group N streptococci and its effect on their growth and metabolism. *Appl. Environm. Microbiol.* **19**, 608-612.
- Andrews, P. (1964) Partial purification of an aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas oleovorans*. *J. Biochem.* **91**, 222.
- Arendt, E.K., Lonvaud, A. i Hammes, W.P. (1991) Lysogeny in *Leuconostoc oenos*. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2135-2139.
- Babu, V., Mital, B.K., Garg, S.K. (1992) Effect of tomato juice addition on the growth and activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* **17**, 67-70.
- Battermann, G. i Radler, F. (1991) A comparative study of malolactic enzyme and malic enzyme of different lactic acid bacteria. *Can. J. Microbiol.* **37**, 211-217.
- Beal, C., Louvet, P. i Corrieu, G. (1989) Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Appl. Environm. Biotechnol.* **32**, 148-154.
- Beelman, R. (1982) Development and utilization of starter cultures to induce malolactic fermentation in red table wines. *En: Grape Wine Symposium. Proceedings of the University of California*. Webb, A.D. (Ed.) University of California Press. Davis. pp. 109-117.
- Beelman, R.B., Gavin, A. i Keen, R.M. (1977) A new strain of *Leuconostoc oenos* for induced malo-lactic fermentation in eastern wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **28**, 159-165.
- Beelman, R.B., Keen, R.M., Banner, M.J. i King, S.W. (1987) Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. *Develop. Ind. Microbiol.* **23**, 107-121.
- Beelman, R.B., McArdle, S. i Duke, G.R. (1980) Comparison of *Leuconostoc oenos* strains ML-34 and PSU-1 to induce malolactic fermentation in Pennsylvania red table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **31**, 269-276.
- Boizet, B., Mata, M., Mignot, O., Ritzenthaler, P. i Sozzi, T. (1992) Taxonomic characterization of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc oenos* bacteriophage. *FEMS Microbiol. Lett.* **90**, 211-216.
- Bousbouras, G.E. i Kunkee, R.E. (1971) Effect of pH on malo-lactic fermentation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **22**, 121-126.
- Britz, T.J. i Tracey, R.P. (1990) The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 23-31.
- Bruinenberg, P.G., de Roo, G. i Limsowtin, K.Y. (1997) Purification and characterization of cystathione γ -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11: Possible role in flavor compound formation during cheese maturation. *Appl. Environm. Microbiol.* **63**, 561-566.
- Buckenhuskes, H.J. (1993) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 253-272.

BIBLIOGRAFIA

- Caillet, M.M. i Vayssier, Y. (1984) Utilisation des biomasses de bactéries lactiques pour le déclenchement de la fermentation malo-lactique. *Rev. Fr. Oenol.* **24**, 65-69.
- Calero, F. (1993) La fermentación maloláctica en la zona vitivinícola "Montilla-Moriles". Fisiología de las bacterias lácticas implicadas e inducción de dicha fermentación a nivell industrial. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Calo, P., Cansado, J., Velázquez, J.B., Sieiro, C., Longo, E. i Villa, T.G. (1991) Effect of different physico-chemical conditions on malolactic fermentation of four *Lactobacillus plantarum* wild strain isolated from wines of northwestern Spain. *Biotechnol. Lett.* **13**, 781-786.
- Capucho, I. i San Romao, M.V. (1994) Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Microbiol. Technol.* **42**, 391-395.
- Caspritz, G. i Radler, F. (1983) Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.* **258**, 4907-4910.
- Cavin, J.F., Drici, F.Z., Prevost, H. i Diviès, C. (1991) Prophage curing in *Leuconostoc oenos* by mitomycin C induction. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**, 163-166.
- Cavin, J.F., Saint, C. i Diviès, C. (1986) Continuous production of emmental cheese flavour and propionic starters by immobilized cells of propionic acid bacterium. *Biotechnol. Lett.* **7**, 821-826.
- Chagnaud, P., Naouri, P., Arnaud, A. i Galzy, P. (1990) Optimisation des conditions d'obtention de cellules de *Lactobacillus* sp. 89 à forte activité malolactique. *Belgian J. Food Chem. Biotechnol.* **45**, 12-20.
- Chalfan, Y., Goldberg, J. i Mateles, R.I. (1977) Isolation and characterization of malo-lactic bacteria from israeli red wines. *J. Food Sci.* **42**, 939-943.
- Chalfan, Y., Levy, R. i Mateles, R.I. (1975) Detection of mannitol formation by bacteria. *Appl. Microbiol.* **30**, 476.
- Champagne, C.P. (1996) Immobilized cell technology in food processing. *En. Immobilized cells: basics and applications*. Wiljffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C. i Tramper, J. (Eds.) Elsevier Science. pp. 633-640.
- Champagne, C.P., Gardner, N. i Doyon, G. (1989) Production of *Leuconostoc oenos* biomass under pH control. *Appl. Environm. Microbiol.* **55**, 2488-2492.
- Champagne, C.P., Gardner, N. i Dugal, F. (1994) Increasing the stability of immobilized *Lactococcus lactis* cultures stored at 4°C. *J. Ind. Microbiol.* **13**, 367-371.
- Clementi, F. (1982) Influenza di pH e SO₂ sull'attività di cellule libere e immobilizzate di fermenti malolattici. *Ann. Fac. Agr. Univ. Studi Perugia* **36**, 334-342.
- Clementi, F. i Vinti, G. (1983) Influenza di diversi parametri sull'attività in vino di starters concentrati e cellule immobilizzate di fermenti malolattici. *Ann. Fac. Agr. Univ. Studi Perugia* **37**, 300-309.
- Cofran, D.R. i Meyer, J. (1970) The effect of fumaric acid on malo-lactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **21**, 189-192.
- Cogan, T.M. (1987) Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 551-558.
- Cogan, T.M. i Jordan, K.N. (1994) Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *J. Dairy Sci.* **77**, 2704-2717.
- Cogan, T.M., O'Dowd, M. i Mellerick, D. (1981) Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1-8.
- Collins, M.D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Martínez-Murcia, A.J. i Phillips, B. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, 5-12.
- Collins, M.D., Samelis, J. i Metaxopoulos, J. (1993) Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 595.
- Condon, S. (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 269-280.
- Costello, P.J., Monk, P.R. i Lee, T.H. (1985) An evaluation of two *Leuconostoc oenos* strains for induction of malolactic fermentation under winery conditions. *Food Technol. Aust.* **37**, 21-23.

- Costello, P.J., Morrison, G.J., Lee, T.H. i Fleet, G.H. (1983) Numbers and species of lactic acid bacteria in wine during vinification. *Food Technol. Aust.* **35**, 14-18.
- Cox, D.J. i Henick-Kling, T. (1989) Chemiosmotic energy from the malolactic fermentation. *J. Bacteriol.* **171**, 5750-5752.
- Cox, D.J. i Henick-Kling, T. (1990) A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding (ATP) malolactic enzyme systems. *Am. J. Enol. Vitic.* **41**, 215-218.
- Cox, D.J. i Henick-Kling, T. (1995) Protonmotive force and ATP generation during malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**, 319-323.
- Crapisi, A., Nuti, M.P., Zamorani, A. i Spettoli, P. (1987a) Improved stability of immobilized *Lactobacillus* sp. cells for the control of malolactic fermentation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**, 310-312.
- Crapisi, A., Spettoli, P., Nuti, M.P. i Zamorani, A. (1987b) Comparative traits of *Lactobacillus brevis*, *Lact. fructivorans* and *Leuconostoc oenos* immobilized cells for the control of malo-lactic fermentation in wine. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 513-521.
- Crues, W.V. (1943) The role of microorganisms and enzymes in wine making. *Advan. Enzymol.* **3**, 349-386.
- Cuenat, P. i Villetaz, J.C. (1984) Essais de fermentation malolactique des vins par bactéries lactiques immobilisées su genre *Leuconostoc*. *Rev. Suisse Viticul. Arboric., Horti.* **16**, 145-151.
- Davis, C., Silveira, N.F.A. i Fleet, G.H. (1985a) Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 872-876.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H. i Fleet, G.H. (1985b) Practical implications of malolactic fermentation: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* **35**, 290-301.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Fleet, G.H. i Lee, T.H. (1988) Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**, 137-142.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Lee, T.H. i Fleet, G.H. (1986a) Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 539-545.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Lee, T.H. i Fleet, G.H. (1986b) Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation and conservation of some Australian wines. *Food Technol. Austr.* **38**, 35-40.
- De Man, J.C., Rogosa, M. i Sharpe, M.R. (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130-135.
- De Moss, R.D., Bard, R.C. i Gunsalus, I.C. (1951) The mechanism of the heterolactate formation: a new route of ethanol formation. *J. Bacteriol.* **62**, 499.
- Dicks, L.M.T. (1995) Relatedness of *Leuconostoc* species of the *Leuconostoc* sensu stricto line of descent, *Leuconostoc oenos* and *Weissella paramesenteroides* revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 99.
- Dicks, L.M.T., Dellaglio, F. i Collins, M.D. (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corr.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 395-397.
- Dicks, L.M.T., van Vuuren, H.J.J. i Dellaglio, F. (1990) Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cells protein patterns, DNA base compositions, and DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 83-91.
- Diviès, C. i Cavin, J.F. (1985) Propos sur l'utilisation rationnelle de *Leuconostoc oenos* pour réaliser la fermentation malolactique des vins. *Rev. Fr. Oenol.* **99**, 29-32.
- Diviès, C., Cahon, R., Cavin, J.F. i Prévost, H. (1994) Immobilized cell technology in wine production. *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**, 135-154.
- Drysdale, G.S. i Fleet, G.H. (1988) Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**, 143-154.
- Edwards, C.G. i Beelman, R.B. (1987) Inhibition of the malolactic bacterium, *Leuconostoc oenos* (PSU-1), by decanoic acid and subsequent removal of the inhibition by yeast ghosts. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**, 239-242.
- Edwards, C.G. i Beelman, R.B. (1989) Inducing malolactic fermentation in wines. *Biotech. Adv.* **7**, 333-360.

BIBLIOGRAFIA

- Edwards, C.G., Jensen, K.A., Spayd, S.E. i Seymour, B.J. (1991) Isolation and characterization of native strains of *Leuconostoc oenos* from Washington state wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**, 219-226.
- Farias, M.E., Manca de Nadra, M.C., Rollán, G.C. i Strasser de Saad, A.M. (1993) Histidine decarboxylase activity in lactic acid bacteria from wine. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **27**, 191-199.
- Fleet, G.H. (1993) *Wine microbiology and biotechnology*. Ed. Harwood Academic Publishers GmbH. Chur, Switzerland.
- Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S. i Ribèreau-Gayon, P. (1984) Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environm. Microbiol.* **48**, 1034-1036.
- Fornysin, P., Vaillant, H., Laintreibeq, F. i Bourgois, J. (1997) Development of an enzymatic reactor for initiating malolactic fermentation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**, 345-351.
- Fornachon, J.C.M. (1964) A *Leuconostoc* causing malo-lactic fermentation in australian wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **4**, 184-186.
- Fourcassie, P. i Maujean, A. (1990) Chocs thermiques opérés sur les bactéries lactiques en relation avec la dégradation de l'acide malique dans les vins. *C. R. Acad. Paris* **311**, 453-458.
- Fourcassie, P., Makaga-Kabinda-Massard, E., Belarri, A. i Maujean, A. (1992) Growth, D-glucose utilization and malolactic fermentation by *Leuconostoc oenos* strains in 18 media deficient in one aminoacid. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 489-496.
- Frayne, R.F. (1986) Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**, 281-287.
- Gao, C. i Fleet, G.H. (1994) The degradation of malic by high density cell suspensions of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 632-637.
- Gao, C. i Fleet, G.H. (1995) Cell-recycle membrane bioreactor for conducting continuous malolactic fermentation. *Austr. J. Grape Wine Res.* **1**, 32-38.
- Garbay, S. i Lonvaud-Funel, A. (1996) Response of *Leuconostoc oenos* to environmental changes. *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 619-625.
- García, M.J. i Pardo, I. (1988) Microbiología de la fermentación maloláctica. Generalidades. *SEVI* **2166**, 553-557.
- García, M.J., Zúñiga, M. i Kobayashi, H. (1992a) Energy production from L-malic acid degradation and protection against acidic external pH in *Lactobacillus plantarum* CECT 220. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2519-2524.
- García, M.J., Zúñiga, M. i Uruburu, F. (1992b) Revisión: El metabolismo y el control de las bacterias lácticas en el vino. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* **32**, 233-268.
- Garvie, E.I. (1960) The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Res.* **27**, 283-292.
- Garvie, E.I. (1967a) *Leuconostoc oenos* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* **48**, 431-438.
- Garvie, E.I. (1967b) The growth factor and aminoacid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. *J. Gen. Microbiol.* **48**, 439-447.
- Garvie, E.I. (1975) Some properties of gas-forming lactic acid bacteria and their significance in classification. *En: Lactic acid bacteria in beverages and foods*. Carr, J.G., Cutting, C.V. i Whiting, G.C. (Eds.) Academic Press, Londres. pp. 339-349.
- Garvie, E.I. (1976) Hybridization between the deoxyribonucleic acids of some strains of heterofermentative lactic acid bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 116-122.
- Garvie, E.I. (1980) Bacterial dehydrogenases. *Microbiol. Rev.* **44**, 106-139.
- Garvie, E.I. (1984) Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *Meth. Microbiol.* **16**, 148-178.
- Gerhardt, P. (1994) *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Gil, J.V. (1997) Influencia de variables enológicas de interés biotecnológico en la elaboración y fracción volátil del vino. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Gil, J.V., Mateo, J.J., Jiménez, M., Pastor, A. i Huerta, T. (1996) Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. *J. Food Sci.* **61**, 1247-1266.

- Gunsalus, I.C. i Gibbs, M. (1952) The heterolactate formation. 2. Position of ^{14}C in the products of glucose dissimilation by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biol. Chem.* **194**, 871.
- Guzzo, J., Cavin, J.F. i Diviès, C. (1994) Induction of stress proteins in *Leuconostoc oenos* to perform direct inoculation of wine. *Biotechnol. Lett.* **16**, 1189-1194.
- Guzzo, J., Delmas, F., Pierre, F., Jobin, M.P., Samyn, B., van Beeumen, J., Cavin, J.F. i Diviès, C. (1997) A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 393-396.
- Hayman, D.C. i Monk, P.. (1982) Starter culture preparation for the induction of malolactic fermentation in wine. *Food Technol. Aust.* **34**, 16-18.
- Henick-Kling, T. (1986a) Control of malolactic fermentation. *Austr. Wine Res. Inst.*, **41**, 1-6.
- Henick-Kling, T. (1986b) Growth and metabolism of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus plantarum* in wine. Tesi doctoral. University of Adelaide.
- Henick-Kling, T. (1988) Improving malolactic fermentation. Proceedings Second International Cool Climate Viticulture and Oenology Symposium. Auckland. University of Auckland (Ed.) pp. 238-242.
- Henick-Kling, T. (1990) pH and regulation of malolactic activity in *Leuconostoc oenos*. *En: Actualités Oenologiques 89. Comptes rendus du 4^e Symposium International d'Oenologie, Bordeaux 1989.* pp. 320-325. Institut d'Oenologie Université de Bordeaux II. Paris: Dunod.
- Henick-Kling, T. (1991) Use of malolactic starter cultures in the winery. *Proc. Focus East. U.S. Chardonnay Symp.*, Front Royal, Virginia, USA. pp. 112-117.
- Henick-Kling, T. (1995) Control of malolactic fermentation in wine: energetics, flavour modification and methods of starter culture preparation. *J. Appl. Bacteriol. Supplement* **79**, 29S-37S.
- Henick-Kling, T., Cox, D.J. i Olsen, E.B. (1992) Energy from malolactic fermentation. *Biol. Oggi* **6**, 9-14.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. i Williams, S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (novena edició) (Ed.) Williams i Wilkins. Baltimore, Maryland.
- Hontebeyrie, M. i Gasser, F. (1975) Comparative immunological relationships of two distinct sets of isofunctional dehydrogenases in the genus *Leuconostoc*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **225**, 1-6.
- Hontebeyrie, M. i Gasser, F. (1977) Deoxyribonucleic acid homologies on the genus *Leuconostoc*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**, 9-14.
- Hughenoltz, J. (1993) Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **12**, 165-178.
- Huggins, A.R. (1984) Progress in dairy starter culture technology. *Food Technol.* **38**, 41-50.
- Iñigo, B., Bravo, F. i Plasencia, A.M. (1969) Estudio de bacterias lácticas aisladas del vino. Aplicación práctica en bodega de la fermentación maloláctica. *Agr. Tecnol. Alimen.* **9**, 428-436.
- Ito, S., Hashiba, H. i Eguchi, Y. (1974) Adaptive control of the ethanol-forming system in heterolactic acid bacteria. *J. Biochem.* **75**, 577-581.
- Ito, S., Kobayashi, T., Ohta, Y.I. i Akiyama, Y. (1983) Inhibition of glucose catabolism by aeration in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Ferment. Technol.* **61**, 353-358.
- Janssen, D.E., Maddox, I.A. i Mawson, A.J. (1993) An immobilized cell bioreactor for the malolactic fermentation of wine. *Wine Ind. J.* **8**, 161-165.
- Jensen, A. K. i Edwards, C.G. (1991) Modification of the API rapid CH system for characterization of *Leuconostoc oenos*. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**, 274-277.
- Jobin, M.P., Delmas, F., Samyn, D., Diviès, C. i Guzzo, J. (1997) Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environm. Microbiol.* **63**, 609-614.
- Joyeux, A. i Lonvaud-Funel, A. (1985) Comparaison de diverses préparations industrielles de bacteries lactiques reactives pour stimuler la fermentation malolactique. *Conn. Vigne Vin* **19**, 149-159.

BIBLIOGRAFIA

- Kägi, J.H.R. i Vallee, B.L. (1960) Alcohol dehydrogenase enzymatic determination <<http://www.sigma.sial.com/sigma/enzymes/spetoh01.htm>> a partir de *J. Biol. Chem.* **235**, 3188-3192.
- Kandler, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 209-224.
- Kearney, L., Upton, M. i MacLoughlin, A. (1990) Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* by immobilizing the cells in Ca-alginate beads incorporating cryoprotectants. *Appl. Environm. Microbiol.* **56**, 3112-3116.
- Kelly, A.F. i Patchett, R.A. (1996) Lactate and acetate production in *Listeria innocua*. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, 125-128.
- Kelly, W.J., Asmundson, R.V. i Hopcroft, D.H. (1989) Growth of *Leuconostoc oenos* under anaerobic conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* **40**, 277-282.
- Klingenberg (1985) Methods of enzymatic analysis. 3rd Edition Vol. VII.
- Koch, A. (1898) Über die säureverzehrenden organismen des weines. *Weinbau weinhandel* **16**, 243-245.
- Korkes, S. i Ochoa, S. (1948) Adaptive conversion of malate and carbon dioxide by *Lactobacillus arabinosus*. *J. Biol. Chem.* **176**, 463-464.
- Krieger, S.A., Hammes, W.P. i Henick-Kling, T. (1992) Effect of medium composition on growth rate, growth yield and malolactic activity of *Leuconostoc oenos* LoZH₁-t₇-1. *Food Microbiol.* **9**, 1-11.
- Kunkee, R.E. (1967) Malo-lactic fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* **9**, 235-279.
- Kunkee, R.E. (1974) Malolactic fermentation and winemaking. *Adv. Chem. Series* **137**, 151-170.
- Kunkee, R.E. (1991) Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiol. Lett.* **88**, 55-72.
- Kunkee, R.E., Carr, J.G. i Cutting, C.V. (1975) Lactic acid bacteria in beverages and foods. Academic Press. London.
- Kunkee, R.E., Ough, C.S., Maynard, A. i Amenne, A. (1964) Induction of malo-lactic fermentation by inoculation of must and wine with bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.* **4**, 178-183.
- Lafon-Lafourcade, S. (1970) Etude de la degradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques non proliférantes isolées des vins. *Ann. Technol. Agric.* **19**, 141-154.
- Lafon-Lafourcade, S. (1975) Factors of the malo-lactic fermentation of wines. *En: Lactic acid bacteria in beverages and foods*. Carr, J.G., Cutting, C.V. i Whiting, G.C. (Eds.) Academic Press, Londres. pp. 43-53
- Lafon-Lafourcade, S. (1983) Wine and brandy. *En: Biotechnology Vol. 5*. Rehm, H.J. i Reed, G. (Eds.) pp. 81-63. Verlag-Chemie. Weinheim.
- Lafon-Lafourcade, S. (1985) Rôle des microorganismes dans la formation de substances combinant le SO₂. *Bull. O.I.V.* **58**, 590-604.
- Lafon-Lafourcade, S. (1986) Applied microbiology. *Experientia* **42**, 904-914.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E. i Ribéreau-Gayon, P. (1983) Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environm. Microbiol.* **46**, 874-880.
- Lamikanra, O. (1987) Aroma constituents of Muscardine wines. *J. Food Quality* **10**, 57-66.
- Lautensach, A. i Subden, R.E. (1984) Cloning of malic acid assimilating activity from *Leuconostoc oenos*. *Microbios* **39**, 29-39.
- Lautensach, A. i Subden, R.E. (1987) Isolation and characterization of *Leuconostoc oenos* mutants with defective malo-lactic enzyme. *Microbios* **52**, 115-127.
- Lejeune, C. i Lonvaud-Funel, A. (1997) Sequence of DNA 16S/23S spacer region of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*): Application to strain differentiation. *Res. Microbiol.* **148**, 79-86.
- Leonardo, M.R., Dailly, Y. i Clark, D. P. (1996) Role of NAD in regulating the adhE gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 6013-6018.
- Liu, J.R. i Gallander, J.F. (1983) Effect of pH and sulfur dioxide on the rate of malolactic fermentation in red table wins. *Am. J. Enol. Vitic.* **34**, 44-46.

- Liu, S.Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J. i Pilone, G.J. (1994) Citruline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *Am. J. Enol. Vitic.* **45**, 235-242.
- Liu, S.Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J. i Pilone, G.J. (1995) Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 310-316.
- Lonvaud-Funel, A. (1991) Métabolisme des bactéries lactiques dans le vin. La fermentation malolactique. *En: Actes du Colloque Lactic 91*. Adria Normandie. Université de Caen. pp. 00-00.
- Lonvaud-Funel, A. (1994) Désacidification des vins par bactéries lactiques. *En: Bactéries lactiques II*. Loriga. Grenoble. França. 323-331.
- Lonvaud-Funel, A. i Joyeux, A. (1994) Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 401-407.
- Lonvaud-Funel, A. i Strasser de Saad, A.N. (1982) Purification and properties of a malolactic enzyme from a strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from grapes. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 357-361.
- Loubiere, P., Salou, P., Leroy, M.J., Lindley, N.D. i Pareilleux, A. (1992) Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *J. Bacteriol.* **174**, 5302-5308.
- Lucey, C.A. i Codon, S. (1986) Active role of oxygen and NADH oxidase in growth and energy metabolism of *Leuconostoc*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1789-1796.
- Marquis, R.E., Bender, G.R., Murray, D.R. i Wong, A. (1987) Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 198-200.
- Martineau, B. i Henick-Kling, T. (1995) Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 526-536.
- Martínez-Murcia, A.J. i Collins, M.D. (1990) A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**, 73-84.
- Martínez-Murcia, A.J., Harland, N.M. i Collins, M.D. (1993) Phylogenetic analysis of some leuconostocs and related organisms as determined from large subunit rRNA gene sequences - assessment of congruence of small subunit and large subunit rRNA derived trees. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 532-541.
- Mateo, J.J., Gil, J.V., Campos, E., Jiménez, M., Huerta, T. i Pastor, A. (1990) Análisis de la fracción volátil en vinos de la variedad Monastrell. Puesta a punto del método. *SEVI* **2313/14**, 5713-5721.
- McCord, J.D. i Ryu, D.D.Y. (1985) Development of malolactic fermentation process using immobilized whole cells and enzymes. *Am. J. Enol. Vitic.* **36**, 214-218.
- Milisaulevic, A. (1964) Methodes d'isolement, de culture et de classification des bacteries malolactiques. *Bull. O.I.V.* **389**, 374-398.
- Ming, F. i Howell, J.A. (1994) Operational properties of an inverted matrix cellulose CM ion-exchanger. *Bioseparation* **4**, 63-70.
- Miranda-López, R., Libbey, L.M., Watson, B.T. i McDaniel, M.R. (1992) Identification of additional odor-active compounds in Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 90-92.
- Morin, N., Benier-Cardou, M. i Champagne, C.P. (1992) Production of *Lactococcus lactis* biomass by immobilized cell technology. *J. Ind. Microbiol.* **9**, 131-135.
- Möslinger, D. (1901) *Z. Unters. Nahr.* **673**, 1121.
- Müller-Thurgau, H. i Osterwalder, A. (1913) Die bakterien in wein und obstwein und die dadurch verursachten veränderungen. *Zentral. Bakteriol. Parasitenk. Abs. II* **36**, 129-338.
- Murphy, M.G. i Condon, S. (1984) Comparison of aerobic and anaerobic growth of *Lactobacillus plantarum* in a glucose medium. *Arch. Microbiol.* **138**, 49-53.
- Naouri, P., Chagnaud, P., Arnaud, A., Galzy, P. i Mathieu, J. (1989) Optimization of the conditions for preparing bacterial cultures for malolactic conservation. *J. Biotechnol.* **10**, 135-150.

BIBLIOGRAFIA

- Naouri, P., Chagnaud, P., Arnaud, A., Galzy, P. i Mathieu, J. (1990) Essais de bioconversion malolactique des vins au moyen d'un réacteur à lit fluidisé et à cellules immobilisées. *Rev. Suisse Vitic. Hortic.* **22**, 207-213.
- Naouri, P., Bernet, N., Chagnaud, P., Arnaud, A., Galzy, P. i Rios, G. (1991) Bioconversion of L-malic acid into L-lactic acid using a high compacting multiphasic reactor (HCMR). *J. Chem. Technol. Biotech.* **51**, 81-95.
- Nuraida, L., Grigolava, I., Owens, J.D. i Campbell-Platt, G. (1992) Oxygen and pyruvate as external electron acceptors for *Leuconostoc* spp. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 517-522.
- Olsen, E.B., Russell, J.B. i Henick-Kling, T. (1991) Electrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum*: a basis for energy derivation from malolactic fermentation. *J. Bacteriol.* **173**, 6199-6206.
- O'Reilly, A.M. i Scott, J.A. (1993) Use of an ion-exchange sponge to immobilise yeast in high gravity apple based (cider) alcoholic fermentations. *Biotechnol. Lett.* **15**, 1061-1066.
- O'Reilly, A.M. i Scott, J.A. (1995) Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. *Enz. Microbiol. Technol.* **117**, 636-646.
- Pardo, I. (1987) Estudio de la microflora presente en mostos y vinos de la D.O. Utiel-Requena. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Pardo, I. i Ferrer, S. (1998) Optimization of preculture media to obtain well-adapted biomass of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Let. Appl. Microbiol.* Enviat.
- Pardo, I. i Zúñiga, M. (1992) Lactic acid bacteria in spanish red rosé and white musts and wines under cellar conditions. *J. Food. Sci.* **57**, 392-405.
- Pardo, I., Garcia, M.J., Zúñiga, M. i Uruburu, F. (1988) Evaluation of de API 50 CHL system for identification of *Leuconostoc oenos*. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**, 347-350.
- Pardo, I., Zúñiga, M., Ferrer, S. i Uruburu, F. (1992) Malolactic fermentation: genetics and control. *En. Profiles on Biotechnology*. Villa, T.G. i Abalde, J. (Eds.) Universidade de Santiago. Santiago de Compostela. pp. 627-638.
- Pasteur, L. (1873) Études sur le vin. 2^a Ed. Savy. Paris.
- Peynaud, E. (1968) Mecanisme biochimique de la fermentation malolactique. *R.C. Acad. Sici.* **257**, 121-122.
- Pilone, G.J. i Kunkee, R.E. (1970) Carbonic acid from decarboxylation by "malic" enzyme in lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* **103**, 404-409.
- Pilone, G.J. i Kunkee, R.E. (1972) Characterization and energetics of *Leuconostoc oenos* ML34. *Am. J. Enol. Vitic.* **23**, 61-70.
- Pilone, G.J. i Kunkee, R.E. (1976) Stimulatory effect of the malolactic fermentation on the growth rate of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environm. Microbiol.* **32**, 405-408.
- Pilone, G.J., Clayton, M.G. i van Duivenboden, R.J. (1991) Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose, and ammonia from arginine. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**, 153-157.
- Pimentel, M.S., Silva, M.H., Cortês, I. i Mendes, A. (1994) Growth and metabolism of sugar and acids of *Leuconostoc oenos* under different conditions of temperature and pH. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 42-48.
- Poolman, B., Molenaar, D., Smid, E.J., Ubbink, T., Abee, T., Renault, P.P. i Konings, W.N. (1991) Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J. Bacteriol.* **173**, 6030-6037.
- Radler, F. (1975) The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. *En. Lactic acid bacteria in beverages and foods*. Carr, J.G., Cutting, C.V. i Whiting, G.J. (Eds.) Academic Press. London. pp. 17-27.
- Radler, F. i Bröhl, K. (1984) The metabolism of several carboxylic acids by lactic acid bacteria. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **179**, 228-231.
- Revel, G. de, Bertrand, A. i Lonvaud-Funel, A. (1989) Synthèse des substances acétoïniques par *Leuconostoc oenos*. Réduction du diacétyle. *Conn. Vigne Vin* **23**, 39-45.
- Ribereau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribereau-Gayon, P. i Sudraud, P. (1978) Traité d'oenologie. Sciences et techniques du vin. Tome II. Dunod, Paris.

- Richter, K., Rühlemann, I i Berger, R. (1991) High-performance fermentation with lactic acid bacteria entrapped in pectate gel. Immobilizates with enhanced lactate formation activity. *Acta Biotechnol.* **3**, 229-341.
- Roissart, de H. i Luquet F.M. (1994) Bactéries lactiques. Loriga. Grenoble. França.
- Rossi, J. i Clementi, F. (1984) L-malic acid catabolism by polyacrylamide gel entrapped *Leuconostoc oenos*. *Am. J. Enol. Vitic.* **36**, 100-102.
- Sakamoto, M. i Komagata, K. (1996) Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 210-216.
- Salema, M., Poolman, B., Lolkema, J.S., Loureiro, M.C. i Konings, W.N. (1994) Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. *Eur. J. Biochem.* **225**, 289-295.
- Salotra, P., Kumar, D., Kamakhya, S., Krishna, N., Jaffe, H. i Bhatnagar, R. (1995) Expression of *DnaK* and *GroEL* homologs in *Leuconostoc mesenteroides* in response to heat shock, cold shock or chemical stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**, 57-62.
- Salou, P., Leroy, M.J., Goma, G. i Pareilleux, A. (1991) Influence of pH and malate-glucose ratio on the growth kinetics of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 87-91.
- Salou, P., Loubiere, P. i Pareilleux, A. (1994) Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. *Appl. Environm. Microbiol.* **60**, 1459-1466.
- Sauvageot, F. i Vivier, P. (1997) Effects of malolactic fermentation on sensory properties of four Burgundy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**, 187-192.
- Schleiffer, K.H. i Ludwig, W. (1996) Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 461-467.
- Scott, J.A. i O'Reilly, A.M. (1995) Use of a flexible sponge matrix to immobilize yeast for beer fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53**, 67-71.
- Scott, J.A. i O'Reilly, A.M. (1996) Co-immobilization of selected yeast and bacteria for controlled flavour development in an alcoholic cider beverage. *Process Biochem.* **31**, 111-117.
- Scott, J.A., O'Reilly, A. i Kirkhope, S. (1995) An fibrous sponge matrix to immobilise yeast for beverage fermentations. *Biotechnol. Lett.* **9**, 305-310.
- Shimazu, Y., Uehara, M. i Watanabe, M. (1985) Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2147-2157.
- Sieiro, C., Cansado, J., Agrelo, D., Velázquez, J.B. i Villa, T.G. (1990) Isolation and enological characterization of malolactic bacteria from the vineyards of northwestern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2936-2938.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B. i Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **250**, 76-85.
- Sozzi, T. i Mignot, O. (1988) Bacteriophage in oenology. *Wine Microbiol.*, 705-716.
- Sozzi, T., Gnaegi, F., D'Amico, N. i Hose, H. (1982) Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bactériophages de *Leuconostoc oenos*. *Rev. Sui. Vitic. Arboric. Hortic.* **14**, 1-8.
- Spettoli, P., Nuti, M.P. i Zamorani, A. (1984) Properties of malolactic activity purified from *Leuconostoc oenos* ML34 by affinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 900-901.
- Spettoli, P., Nuti, M.P., Crapisi, A. i Zamorani, A. (1987) Technological improvement of malolactic fermentation in wine by immobilized microbial cells in a continuous flow reactor. *Ann. New York Acad. Sci.* **501**, 386-389.
- Sponholtz, W.R. (1992) The breakdown of arginine by lactic acid bacteria and it's relation to ethylcarbamate production. *Biol. Oggi* **6**, 15-24.
- Stiles, M.E. i Holzapfel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**, 1-29.
- Suárez, J.A. i Íñigo, B. (1990) Microbiología Enológica. Fundamentos de vinificación. Madrid. Mundi-Prensa.
- Tracey, R.P. i Britz, T.J. (1989) Cellular fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 445-456.

BIBLIOGRAFIA

- Tracey, R.P. i van Rooyen, T.J. (1988) Utilization of glucose, fructose and malic acid by malolactic bacteria: effect of ethanol and formation of mannitol and volatile acids. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, 113-118.
- Valade, M. i Laurent, M. (1992) La maîtrise de la fermentation malolactique en champagne. *Biol. Oggi* **6**, 35-41.
- Valdez, G.F., Giori, G.S., Ruiz, A.P. i Oliver, G. (1985) Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* **49**, 413-415.
- van Vuuren, H.J.J. i Dicks, L.M.T. (1993) *Leuconostoc oenos*: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**, 99-112.
- Veiga-da-Cunha, M., Firme, P., San Romao, V. i Santos, H. (1992) Application of ¹³C nuclear magnetic resonance to elucidate the unexpected biosynthesis of erythritol by *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environm. Microbiol.* **58**, 2271-2279.
- Veiga-da-Cunha, M., Santos, H. i van Schaftingen, E. (1993) Pathway and regulation of erythritol formation in *Leuconostoc oenos*. *J. Bacteriol.* **157**, 3941-3948.
- Vidal-Carou, M.C., Ambatlle-Espunyes, A., Ulla-Ulla, M.C. i Mariné-Font, A. (1990a) Histamine and tyramine in spanish wines: their formation during the winemaking process. *Am. J. Enol. Vitic.* **41**, 160-167.
- Vidal-Carou, M.C., Codony-Salcedo, R. i Mariné-Font, A. (1990b) Histamine and tyramine in spanish wines: relationships with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malo-lactic fermentation intensity. *Food Chem.* **35**, 217-227.
- Viti, C., Giovannetti, L., Granchi, L. i Ventura, S. (1996) Species attribution and strain typing of *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) with restriction endonuclease fingerprints. *Res. Microbiol.* **147**, 651-660.
- Wallbanks, S., Martínez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A. i Collins, M.D. (1990) 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **40**, 224-230.
- Warriner, K.S.R. i Morris, J.G. (1995) The effects of aeration on the bioreductive abilities of some heterofermentative lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**, 323-327.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H. i Lee, T.H. (1985) Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* **36**, 302-313.
- Wibowo, D., Fleet, G.H., Lee, T.H. i Eschenbruch, R. (1988) Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* **64**, 421-428.
- Zavaleta, A. I., Martínez-Murcia, A. J. i Rodríguez-Valera, F. (1997) Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1261.
- Zeeman, W., Snyman, J.P. i van Wyk, C.J. (1982) The influence of yeast strain and malo-lactic fermentation on some volatile bouquet substances and on quality of table wines. *Proc. Univ. Calif. Davis. Grape Wine Cent. Symp.* (University of California) Davis. pp. 79-90.
- Zúñiga, M. (1994) Desarrollo de métodos de manipulación genética de *Leuconostoc oenos*. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Zúñiga, M., Pardo, I. i Ferrer, S. (1993) An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **18**, 37-42.

ANNEXOS

ANNEX 1. MEDIS DE CULTIU, SOLUCIONS I REACTIUS

MEDIS DE CULTIU

L'esterilització dels medis de cultiu es va realitzar en autoclau a 121°C 20 min excepte quan s'indica una filtració esterilitzant amb membranes de 0.45 µm. Als assaigs realitzats en biorreactors, el temps d'esterilització es va augmentar fins a 30 minuts. L'ajustament del pH als medis que ho requerien es va realitzar amb les dilucions apropiades d'HCl 10 M o KOH 10 M.

ATB (MEDI SUC DE TOMÀQUET ÀCID). Garvie (1967a) amb modificacions.

Formació de dextrà a partir de sacarosa.

Glucosa	10.00	g
Extracte de llevat	5.00	g
Peptona bacteriològica	10.00	g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.20	g
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	0.05	g
Suc de tomàquet ¹	250.00	mL
Clorhidrat de cisteïna	0.50	g
Sacarosa ²	100.00	mL
Agar bacteriològic	20.00	g
H ₂ O fins	1000.00	mL

pH= 4.8

¹ Es preparava a partir de suc de tomàquet comercial de la següent manera: 250 mL de suc es mesclaven amb 500 mL d'aigua destil·lada i es deixaven macerar durant 24 h a 4 °C. Aleshores, per eliminar les partícules sòlides, es centrifugava a 22000 x g 4°C 30 min. El sobrenadant es passava per paper de filtre, s'enrasava el volum a 300 mL i es congelava fins la seva utilització. Per a la preparació de medi de cultiu líquid s'efectuava una filtració addicional a través d'una membrana de nitrat de cel·lulosa de 0.45 µm de mida de porus per eliminar restes sòlides més menudes.

² La sacarosa es preparava a part esterilitzant per filtració una solució del disacàrid al 50% (p/v) en aigua i afegint-la a la resta de components després d'autoclavar.

BB (MEDI BASAL PER LA PRODUCCIÓ D'ÀCID LÀCTIC). Pilone i Kunkee (1972) amb modificacions.

Determinació de l'isòmer d'àcid làctic produït a partir de la glucosa.

Glucosa	0.20	g
Extracte de llevat	5.00	g
Peptona bacteriològica	5.00	g
Triptona	20.00	g
Clorhidrat de cisteïna	0.50	g
Tween-80	0.05	mL
H ₂ O fins	1000.00	mL

pH= 5.5

FC (MEDI BASAL DE FERMENTACIÓ DE CARBOHIDRATS). Garvie (1967a)

Fermentació de carbohidrats.

NaCl	5.00	g
Extracte de llevat	6.00	g
Peptona bacteriològica	15.00	g
Verd de bromocresol ¹	12.00	mL
Agar	5.00	g
H ₂ O fins	1000.00	mL

pH= 5.2

¹ La dissolució de verd de bromocresol es preparà mesclant 0.10 g del producte (en pols) amb 30 mL d'NaOH 0.01 N.

El medi es va repartir en volums de 4.5 mL en tubs de vidre i es va autoclavar. Aleshores, els tubs es van temperar a 45 °C i se'ls va afegir 0.5 mL de solucions estàndard de cadascuna de les fonts de carboni que es volia assajar. Els carbohidrats es van preparar al 2% (p/v), excepte l'L-arabinosa que es va preparar al 5% (p/v), i es van esterilitzar per filtració.

MBC (MEDI BASAL DE CARBOHIDRATS). Caspritz i Radler (1983) amb modificacions.
Estudi del metabolisme de carbohidrats en *Oenococcus oeni*.

Extracte de llevat	5.00	g
Triptona	10.00	g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.20	g
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	0.05	g
Tween-80	1.00	mL
Pantotenat càlcic ¹	0.01	g
H ₂ O fins	1000.00	mL

¹ El pantotenat càlcic es preparà fent una dissolució prèvia a l'1% (p/v), esterilitzant-la per filtració i afegint 1 mL a la resta de components del medi després d'autoclavar.

Als experiments on així s'indica, aquest medi fou addicionat de quantitats variables de carbohidrats, àcids orgànics o aminoàcids. Aquests suplementes foren esterilitzats per filtració i afegits al medi després d'autoclavar.

MEDI 5. Zúñiga *et al.* (1993)

Diferenciació entre bacteris homolàctics i heterolàctics.

Triptona	10.00	g
Extracte de llevat	5.00	g
KH ₂ PO ₄	2.50	g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.20	g
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	0.05	g
Fructosa	2.50	g
Clorhidrat de cisteïna	0.50	g
Tween-80	1.00	mL
Verd de bromocresol ¹	20.00	mL
Pantotenat càlcic	0.01	g
Agar bacteriològic ²	20.00	g
H ₂ O fins	1000.00	mL
pH= 6.5		

ANNEXOS

¹ La dissolució de verd de bromocresol es preparà com es descriu per l'FC.

² El pantotenat càlcic es preparà fent una dissolució prèvia en aigua a l'1%, esterilitzant-la per filtració i afegint 1 mL a la resta de components del medi després d'autoclavar-los.

MEDI C. Chalfan *et al.* (1977)

Medi basal d'utilització d'àcids (cítric, màlic o tartàric).

Glucosa	10.00	g
Extracte de llevat	5.00	g
Peptona bacteriològica	10.00	g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.20	g
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	0.05	g
Suc de tomàquet ¹	200.00	mL
Clorhidrat de cisteïna	5.00	mg
Àcid orgànic ²	10.00	g
H ₂ O fins	1000.00	mL

pH= 4.8

¹ El suc de tomàquet es va preparar de la manera descrita per a l'ATB.

² Es va afegir l'àcid orgànic desitjat (cítric, màlic o tartàric) per determinar la seva utilització.

MEDI TJ. Chalfan *et al.* (1977)

Utilització d'àcid fumàric.

Glucosa	3.00	g
Extracte de llevat	5.00	g
Peptona bacteriològica	5.00	g
Triptona	20.00	g
Lactosa	2.00	g
Cicloheximida	0.10	g
Suc de tomàquet ¹	200.00	mL
Àcid fumàric	0.50	g
H ₂ O fins	1000.00	mL

pH= 5.5

¹ El suc de tomàquet es va preparar de la manera descrita per a l'ATB.

MEDI DE PRE-CULTIU "A". Aquesta tesi.Medi de pre-cultiu per l'adaptació d'*Oenococcus oeni* al creixement en vi.

Extracte de llevat	5.00	g
Tween-80	1.00	mL
Most	500.00	mL
H ₂ O fins	1000.00	mL
pH=4.5		

Es mesclaren els components, s'ajustà el pH i s'esterilitzà el medi per filtració. Durant 24-48 h es comprovà l'estabilitat del pH. Si es produïen precipitacions al medi, es centrifugava a 18.000 x g 30 min, es recollia el sobrenadant i es rectificava de nou el pH.

MEDI DE PRE-CULTIU "B". Aquesta tesi.Medi de pre-cultiu per l'adaptació d'*Oenococcus oeni* al creixement en vi.

Extracte de llevat	5.00	g
Peptona bacteriològica	5.00	g
Tween-80	1.00	mL
Most	500.00	mL
H ₂ O fins	1000.00	mL
pH=4.5		

El medi es preparà segons es descriu per al medi "A".

MEDI DE PRE-CULTIU "C". Aquesta tesi.Medi de pre-cultiu per l'adaptació d'*Oenococcus oeni* al creixement en vi.

Extracte de llevat	5.00	g
Suc de tomàquet	100.00	mL
Tween-80	1.00	mL
Most	500.00	mL
H ₂ O fins	1000.00	mL
pH=4.5		

El medi es preparà segons es descriu per al medi "A".

ANNEXOS

MEDI DE PRE-CULTIU "D". Aquesta tesi.

Medi de pre-cultiu per l'adaptació d'*Oenococcus oeni* al creixement en vi.

Extracte de llevat	5.00	g
Peptona bacteriològica	5.00	g
Suc de tomàquet	100.00	mL
Tween-80	1.00	mL
Most	500.00	mL
H ₂ O fins	1000.00	mL
pH=4.5		

El medi es preparà segons es descriu per al medi "A".

MEDI DE PRE-CULTIU "P". Pardo i Ferrer (1998)

Medi de pre-cultiu per l'adaptació d'*Oenococcus oeni* al creixement en vi.

Solució A

Àcid màlic	3.00	g
Piridoxina	0.10	mg
Pantotenat càlcic	0.10	mg
Vitamina C	0.10	mg
Clorhidrat de tiamina	0.10	mg
Riboflavina	0.10	mg
Cianocobalamina (Vit. B12)	0.01	mg
Biotina	0.01	mg
Most (fins a)	500.00	mL
pH=4.5		

Solució B

Extracte de llevat	5.00	g
Tween-80	1.00	mL
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.20	g
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	0.05	g
H ₂ O destil·lada (fins a)	500.00	mL
pH=4.5		

Una vegada esterilitzades les solucions, A per filtració i B autoclavada, es mesclaven a parts iguals.

MEDI DE PRE-CULTIU "10". Pardo *et al.* (1992)Medi de pre-cultiu per l'adaptació d'*Oenococcus oeni* al creixement en vi.

Extracte de llevat	5.00	g
Suc de tomàquet	100.00	mL
Glucosa	5.00	g
Àcid màlic	3.50	g
Tween-80	1.00	mL
Vi (fins a)	1000.00	mL

pH=4.0

MLO (MEDI PER *Leuconostoc oenos*). Caspritz i Radler (1983)Creixement d'*Oenococcus oeni* (abans *Leuconostoc oenos*).

Glucosa	10.00	g
Fructosa	5.00	g
Extracte de llevat	5.00	g
Triptona	10.00	g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.20	g
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	0.05	g
Clorhidrat de cisteïna	0.50	g
Suc de tomàquet ¹	100.00	mL
Citrat diamònic	3.50	g
Tween-80	1.00	mL
H ₂ O fins	1000.00	mL

pH= 4.8

¹ El suc de tomàquet es va preparar de la manera descrita per a l'ATB.

L'MLO amb agar es preparava esterilitzant per separat a doble concentració l'agar bacteriològic (20 g L⁻¹ finals) i la resta de components per l'altra. Una vegada autoclavats, es mesclaven a volums iguals l'agar i la resta de components.

MRS-ARG (MEDI MAN-ROGOSA-SHARPE (Oxoid) ADDICIONAT D'ARGININA). De Man *et al.* (1960) amb modificacions.

Comprovació de l'activitat arginina desaminasa.

El medi MRS es va preparar d'acord amb les instruccions del fabricant afegint-li 3 g L⁻¹ d'L-Arginina.

PM (MEDI de PRODUCCIÓ de MANNITOL). Chalfan *et al.* (1975)

Diferenciació entre bacteris homolàctics i heterolàctics.

Triptona	20.00	g
Extracte de llevat	5.00	g
Peptona bacteriològica	5.00	g
Fructosa ¹	5.00	g
Tween-80	1.00	mL
H ₂ O fins	1000.00	mL

pH= 5.5

¹ La fructosa es preparà a part esterilitzant-la per filtració i afegint-la a la resta de components del medi després d'autoclavar-los.

VI 1. Aquesta tesi.

Experiments amb cèl·lules no proliferants.

El vi utilitzat pertanyia a la varietat Monastrell (any 1992) i presentava la següent composició (g L⁻¹) en carbohidrats, àcids orgànics i alcohols.

Àcid cítric	0.78
Àcid tartàric	2.45
Àcid màlic ¹	0.16
Àcid acètic	0.24
Àcid succínic	1.66
Àcid làctic	1.45
Glucosa	0.08
Fructosa	0.34
Glicerol	7.72
Etanol ²	12.41

¹ Es va addicionar àcid L-màlic fins arribar a la concentració final desitjada. El pH es va ajustar al valor desitjat amb KOH 10 M.

² La quantitat d'etanol està expressada en graus alcohòlics (% (v/v) d'etanol en vi).
Esterilització per filtració.

VI 2. Aquesta tesi.

Resta d'experiments d'aquesta tesi.

El vi utilitzat pertanyia a la varietat Monastrell (any 1996) i presentava la següent composició (g L⁻¹) en carbohidrats, àcids orgànics i alcohols.

Àcid cítric	0.00
Àcid tartàric	2.18
Àcid màlic ¹	0.11
Àcid acètic	0.60
Àcid succínic	1.76
Àcid làctic	1.57
Glucosa	0.06
Fructosa	0.15
Glicerol	8.22
Etanol ²	11.13

¹ Es va addicionar àcid L-màlic fins arribar a la concentració final desitjada. El pH es va ajustar al valor desitjat amb KOH 10 M.

² La quantitat d'etanol està expressada en graus alcohòlics (% (v/v) d'etanol en vi).
Esterilització per filtració.

VI SINTÈTIC. Aquesta tesi.

Assaig de degradació d'àcid màlic per cèl·lules immobilitzades.

Glucosa	1.00	g
Fructosa	1.00	g
Tartàric	2.00	g
Àcid acètic	0.50	g
Glicerol	9.00	g
Àcid làctic	1.50	g
Etanol	110.00	mL
Àcid màlic	3.00	g
H ₂ O fins	1000.00	mL
pH= 3.5		

Esterilització per filtració.

SOLUCIONS I REACTIUS

CRIOPROTECTOR DE CONGELACIÓ. Gerhardt (1994)

Glicerina 40% (v/v)

CRIOPROTECTOR DE LIOFILITZACIÓ. Gerhardt (1994)

Es prepara una solució d'àcid glutàmic 0.067 M i s'afegí NaOH 10 M per dissoldre'l en aigua destil·lada sense passar de pH 4.5.

REACTIU DE NESSLER. Gerhardt (1994)

Desaminació de l'arginina.

Iodur potàssic	70.00	g
Iodur mercuric	100.00	g
Hidròxid potàssic	100.00	g
H ₂ O fins	1000.00	mL

Es dissolen el iodur potàssic i el iodur mercuric en 400.00 mL d'aigua destil·lada. Es dissol l'hidròxid potàssic en 500.00 mL d'aigua destil·lada i es deixa refredar. Es mesclen les dues solucions i s'afegeix aigua destil·lada fins completar 1 L. Es deixa que sedimente el precipitat, es decanta el líquid sobrenadant clar i es conserva en un flascó eliminat el precipitat.

TF (TAMPÓ TARTRAT-FOSFAT). Henick-Kling (1986b)

Àcid D(+)-tartàric	20.00	mM
K ₂ HPO ₄	40.00	mM
MgSO ₄	0.50	mM
MnSO ₄	0.20	mM

El tampó es va preparar a partir d'una solució concentrada d'àcid D(+)-tartàric (40.0 mM), MgSO₄ 1.0 mM, MnSO₄ 0.4 mM a la que s'anava afegint K₂HPO₄ 80.0 mM fins arribar al pH desitjat. Aleshores, es completava amb aigua Milli-Q fins arribar a una concentració final de tartrat de 20.0 mM.

ANNEX 2. MÈTODES CROMATOGRÀFICS

CROMATOGRAFIA DE GASOS (GLC) I ESPECTROMETRIA DE MASSES (GLC-MS)

Els assaigs cromatogràfics i de espectromètria de masses es van realitzar segons el mètode descrit per Mateo *et al.* (1990).

L'extracció dels compostos volàtils es va realitzar utilitzant un extractor líquid-líquid continu. La mescla extractora utilitzada fou diclorometà:pentà (2:3). A un volum de 500 mL de vi se li va afegir NaCl fins a una concentració final del 8% (p/v) per facilitar l'extracció de substàncies volàtils (Lamikanra, 1987). Després de realitzar una extracció durant 24 h, l'extret obtingut es va dessecar amb Na₂(SO₄) anhidre, es va filtrar i condensar per evaporació amb l'ajut d'una columna Vigreux fins obtenir un volum final màxim d'1 mL. El tub es va conservar hermèticament tancat a -20 °C fins al moment d'injectar la mostra.

Les mostres es van analitzar amb un cromatògraf de gasos Hewlett Packard 5890 Series II equipat amb un detector d'ionització de flama (FID) i utilitzant heli (puresa 99.998 %) com a portador. Per a la detecció es van utilitzar hidrogen i aire sintètic de la mateixa puresa. La columna utilitzada fou una HP20M (Carbowax 20M) de 50 m de longitud, 0.2 mm de diàmetre intern, 0.2 µm de gruix de fase. El senyal cromatogràfic es va enregistrar i integrar amb l'equip HP Vectra QS/16S assistit pel programa informàtic HP 3365 Chemstation. Les condicions cromatogràfiques foren les següents:

Temperatura inicial	60 °C
Temps isoterma inicial	5 min
Gradient de temperatura	2.5 °C min ⁻¹
Temperatura final	190 °C
Temps isoterma final	22 min
Discriminació de flux	1:50
Pressió en cap de columna	20 psi
Flux del gas portador	0.5 mL min ⁻¹
Flux d'aire	400 mL min ⁻¹
Flux d'hidrogen	30 mL min ⁻¹
Temperatura injector i detector	250 °C
Flux gas auxiliar (He)	30 mL min ⁻¹
Volum de mostra injectada	0.5 µL

Les mostres processades per espectromètria de masses es van injectar en un model Trio 1000 de Fisons Instruments, acoblat a un cromatògraf de gasos Fisons Instruments model GC 8000 Series. Les dades foren enregistrades i analitzades mitjançant el programa Lab-Base. Les condicions cromatogràfiques per a les anàlisis de espectromètria de masses foren les descrites abans exceptuant la pressió a l'inici de columna (8 psi) i el temps d'isoterma final (28 min). El temps de retràs per al dissolvent fou de 9 minuts. L'energia dels electrons fou de 70 eV.

La identificació dels compostos volàtils es va realitzar per comparació amb els temps de retenció relatius del patrons coneguts, utilitzant el 2-nonanol com a patró intern. Les identificacions es van comprovar mitjançant espectromètria de masses (GLC-MS) i comparació amb els espectres de les llibreries NBS o Willey o per comparació amb els espectres obtinguts per als patrons purs (Gil, 1997).

La quantificació dels components obtinguts a la fracció volàtil es va realitzar calculant els factors de resposta segons l'expressió obtinguda per Gil (1997).

$$Fr_i = (C_i/A_i)/(C_{p_i}/A_{p_i})$$

Fr_i =factor de resposta

C_i =concentració de compost problema

A_i =àrea del pic corresponent al compost problema

C_{p_i} =concentració de patró intern

A_{p_i} =àrea del pic corresponent al patró intern

Amb els factors de resposta determinats respecte al 2-nonanol obtinguts per Gil (1997), es van calcular les concentracions de cada component a les mostres problema mitjançant la següent fórmula:

$$C_i = (Fr_i \cdot C_{p_i} \cdot A_i) / A_{p_i}$$

Com no es disposava de patrons purs de tots els components identificats, alguns d'ells no van ser quantificats. En aquests casos, els resultats s'expressen com a variació relativa del compost. Els valors dels resultats mostrats són una mitjana aritmètica de tres determinacions amb la mateixa mostra.

CROMATOGRAFIA EN PAPER D'ÀCIDS ORGÀNICS.

La cromatografia en paper permet determinar la presència dels principals àcids orgànics tant en vi com en medis sintètics. Nosaltres l'hem utilitzat per detectar el dos àcids que intervenen a l'FML, màlic i làctic. Mesurant la superfície de les taques es pot observar el desenvolupament de la fermentació d'una manera ràpida (15 mostres en 6-7 h) i barata.

Es dipositen dues tandes de 10 µL de la mostra sobre un rectangle de paper Whatman 3MM (23 cm d'alt) i es deixa córrer en solvent-revelador durant 5-6 h. Aleshores es deixa evaporar a l'aire i s'observa l'aparició de taques grogues sobre un fons blau. Per comparació visual amb la superfície de les taques de les solucions patró, es pot determinar semiquantitativament la concentració d'aquests dos àcids, perquè la relació entre superfície i concentració és directa (Ribéreau-Gayon, 1978; Pardo i Zúñiga, 1992).

Solvent-revelador de cromatografia en paper

Solució A

n-Butanol	100.00	mL
Blau de bromofenol	0.10	g

Solució B

Àcid acètic glacial	16.00	mL
Àcid fòrmic	4.00	mL
H ₂ O destil·lada	20.00	mL

Una vegada preparades, les solucions es mesclen (volum total 140 mL) i s'afegeixen a la cambra de cromatografia.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC)

Les determinacions de metabòlits per HPLC es van realitzar d'acord amb el mètode descrit per Frayne (1986) amb algunes modificacions.

Una vegada recollides les mostres que anaven a ser analitzades per HPLC, es congelaven a -20°C fins a la seva preparació. Aleshores, es descongelaven i centrifugaven a $18.000 \times g$ i es descartava el sediment. Les mostres de procedència vínica o tampons eren directament filtrades a través d'una membrana de $0.22 \mu\text{m}$ de porus (Whatman; Clifton, New Jersey). Les mostres provinents de medis de cultiu sintètics eren passades a més a través d'un cartutx (C-18 SepPak; Waters Associates, Milford, Mass.) abans de ser filtrades.

Les mostres eren injectades en un equip d'HPLC (Merck-Hitachi) format per un detector d'UV-Visible (L-4250) a 210 nm , un detector d'índex de refracció (RI-71) i un injector automàtic (AS-2000A).

Per a la determinació conjunta d'àcids orgànics, carbohidrats i alcohols, les columnes utilitzades foren dues HPX-87H Aminex (Bio-Rad Chemical Division, Richmond Califòrnia) connectades en sèrie després d'una pre-columna Cation H^+ (Bio-Rad). El senyal cromatogràfic es va enregistrar i integrar amb el programa D-6000 de Merck. Les condicions cromatogràfiques foren les següents:

Volum d'injecció	$10 \mu\text{L}$
Temperatura de treball	60°C
Fase mòbil	$0.75 \text{ mL L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ del 85% (v/v) en aigua Milli-Q
Flux de treball	0.7 mL min^{-1}

La identificació es va realitzar per comparació dels temps de retenció relatius del components amb els obtinguts en les solucions patró d'estàndards externs. La quantificació es va realitzar per interpolació amb una recta de calibrat obtinguda a partir de tres dilucions decimals de patrons externs injectats en les mateixes condicions de treball. Els àcids orgànics, a excepció del làctic i el succínic, van ser detectats amb el detector d'ultraviolat mentre que aquests dos àcids, els sucres i els alcohols ho van ser amb el d'índex de refracció.

ANNEXOS

Per a la determinació exclusiva d'àcids orgànics es va utilitzar una columna C-18 LiChroCART, 125-4 (Merck, Richmond Califòrnia) amb una pre-columna Cation H⁺ (Merck). Les condicions cromatogràfiques foren les següents:

Volum d'injecció	10 µL
Temperatura de treball	30 °C
Fase mòbil	0.75 mL L ⁻¹ H ₃ PO ₄ al 85% (v/v) en aigua Milli-Q
Flux de treball	0.35 mL min ⁻¹

La identificació i quantificació es va realitzar de la manera descrita per a les determinacions amb les columnes Aminex però amb solucions patró específiques contenint només els àcids que es volien analitzar.

ANNEX 3. SOQUES MICROBIANES

Nom del bacteri	Soca	Procedència
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	912	Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus (CECT)
<i>Oenococcus oeni</i>	ML34 (218)	Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus (CECT)
<i>Oenococcus oeni</i>	M42	Pardo (1987)
<i>Oenococcus oeni</i>	M41	Pardo (1987)
<i>Oenococcus oeni</i>	G6	Pardo (1987)
<i>Oenococcus oeni</i>	N172	Pardo (1987)
<i>Oenococcus oeni</i>	T46	Pardo (1987)
<i>Oenococcus oeni</i>	MA4	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	VV4	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	VV5	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	BM2	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	BM3	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	RM2	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	RM3	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	TV3	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	TV4	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	TE3	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	BE5	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	CS2	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	BO3A	Aquesta tesi
<i>Oenococcus oeni</i>	BO3B	Aquesta tesi
<i>Lactobacillus</i> sp.	CH3	Aquesta tesi
<i>Lactobacillus</i> sp.	CH4	Aquesta tesi
<i>Lactobacillus</i> sp.	GE3	Aquesta tesi
<i>Lactobacillus</i> sp.	GE5	Aquesta tesi

ANNEX 4. BIORREACTORS: INSTRUMENTACIÓ I OPERACIÓ

BIOSTAT-B. B. Braun Biotech (Melsungen, Alemanya)

Volum del tanc de reacció:	2 L
Volum de treball ¹ :	1 L
Condicions d'esterilització:	121 °C 30 min
Control de pH ² :	HCl 5 M i KOH 5 M
Temperatura de treball:	28 ± 0.2 °C
Agitació:	250 rpm
Aireig ³ :	Flux continu d'aire o N ₂ estèrils

BIOSTAT-Q. B. Braun Biotech (Melsungen, Alemanya)

Volum del tanc de reacció:	330 mL
Volum de treball ¹ :	200 mL
Condicions d'esterilització:	121 °C 30 min
Temperatura de treball:	28 ± 0.2 °C
Agitació:	200 rpm
Aireig ³ :	Flux continu d'aire o N ₂ estèrils

¹ Per a realització de càlculs matemàtics es van tenir en compte tant els volums d'evaporació com els de les mostres extretes durant les fermentacions.

² Només als experiments on així s'indica, el pH es va controlar a 4.8 ± 0.1.

³ Només als experiments on així s'indica.

El control dels processos de fermentació es va realitzar amb la unitat central de control via connexió RS-422 utilitzant el *software* MFCS 1.0 B-Braun. El control o evolució del pH, pressió parcial d'oxigen, agitació i temperatura de fermentació es van enregistrar de manera contínua a tots els experiments.

Per a la realització de l'FML en continu es va utilitzar un biorreactor B. Braun Biostat Q, amb les següents modificacions:

Temperatura de treball:	$20^{\circ}\text{C} \pm 0.2$
Volum de reacció:	200 mL
Agitació:	50-100 rpm
Taxa de dilució:	0.0155 h^{-1}
Flux d'entrada i eixida:	3 mL h^{-1}

El pH es va seguir durant tot el procés. Els fluxos d'entrada i l'eixida de vi es van regular amb l'ajuda de dues bombes peristàltiques. Al conducte d'entrada es va instal·lar un sistema de goteig per evitar retrocontaminacions.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. Sergi Maicas i Prieto

la calificación de apto "cum laude" por unanimidad

Valencia, a 22 de Junio de 19198

El Secretario,

El Presidente



[Handwritten signature]

