



Generalitat de Catalunya  
Departament d'Agricultura,  
Alimentació i Acció Rural



**INCAVI**  
Institut Català de la Vinya i el Vi

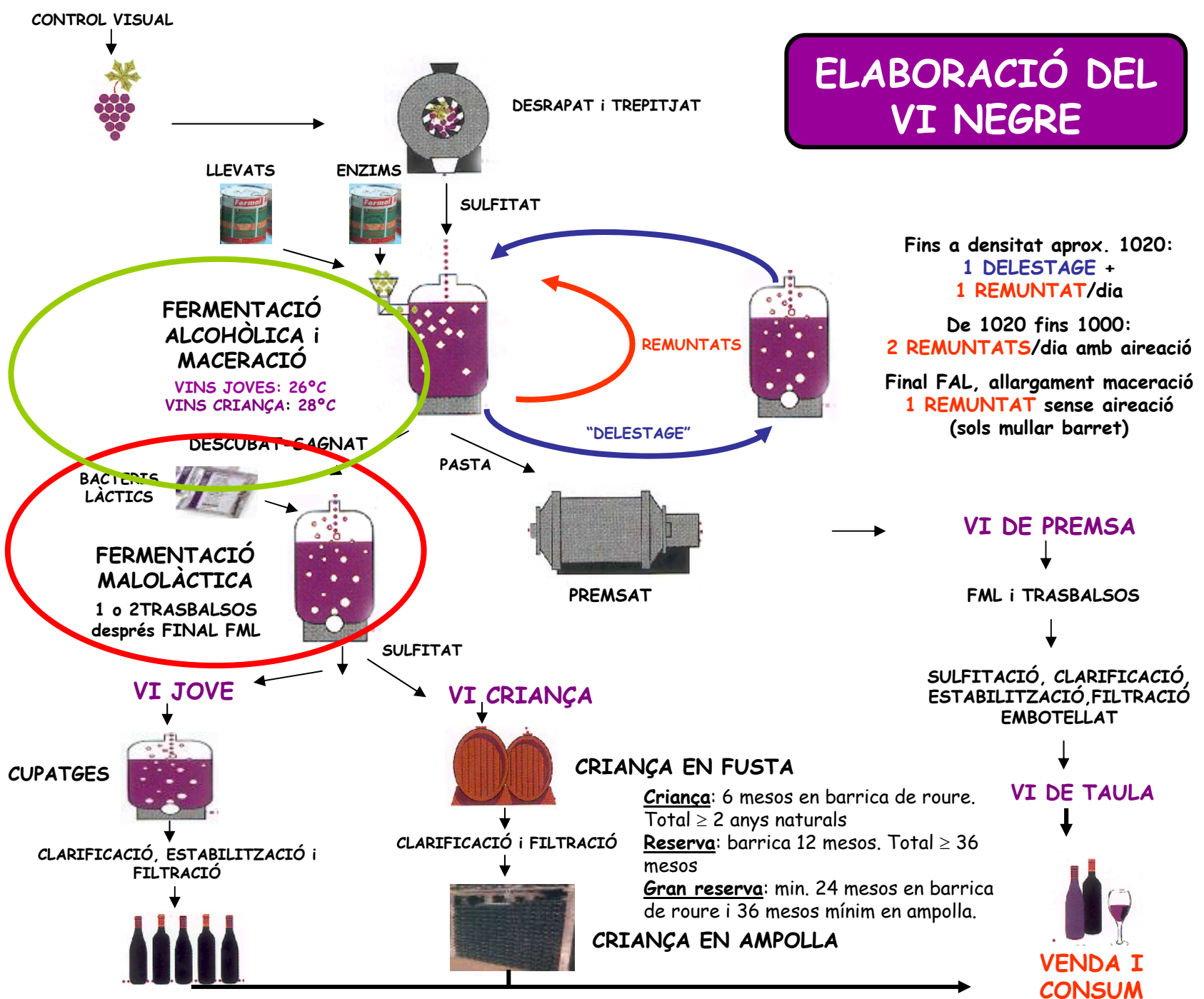
**Jornada de Difusió i Transferència de Tecnologia**

**TECNOLOGIA DE LA  
IMPLANTACIÓ i CONTROL dels  
LLEVATS i BACTERIS LÀCTICS  
EN FERMENTACIONS  
VÍNIQUES**

**Anna Puig**

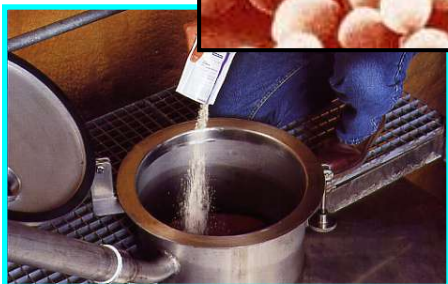
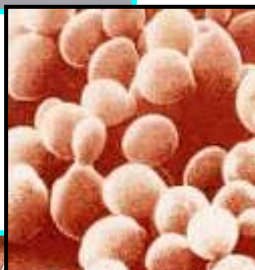
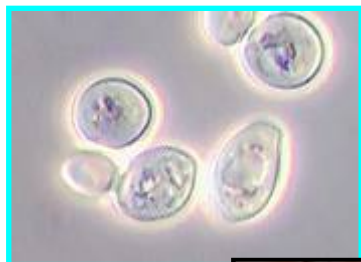
[apuigpujol@gencat.cat](mailto:apuigpujol@gencat.cat) / [anna.puig@irta.cat](mailto:anna.puig@irta.cat)

# ELABORACIÓ DEL VI NEGRE





## ESTÀ JUSTIFICAT SEMBRAR UNA SOCA DE **LLEVAT / BACTERI** SELECCIONAT ?



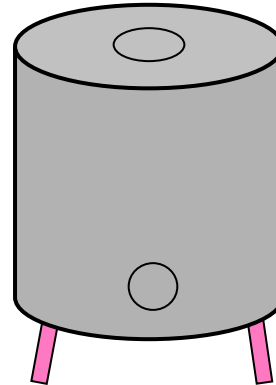
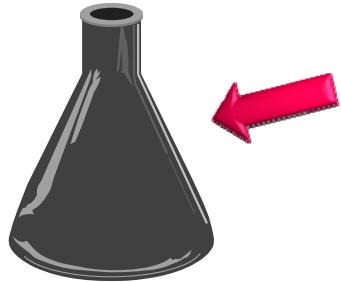
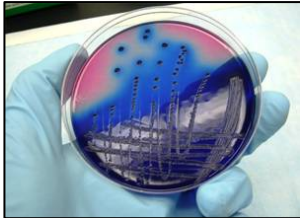
- ASSEGURAMENT D'UNA BONA CINÈTICA FERMENTATIVA
- EVITAR DESVIACIONS ORGANOLÈPTIQUES
- ASSEGURAR LA **QUALITAT** DEL PRODUCTE FINAL



PER PODER SEGUIR LA IMPLANTACIÓ DEL **LLEVAT / BACTERI** SEMBRAT ÉS NECESSARI PODER DIFERENCIAR LA SOCA DE LA RESTA DE LLEVATS / BL (AUTÒCTONS) PRESENTS AL LLARG DEL PROCÉS.



## MÈTODES TRADICIONALS



**Volums grans**

**Caràcters morfològics i fisiològics  
que depenen del medi**

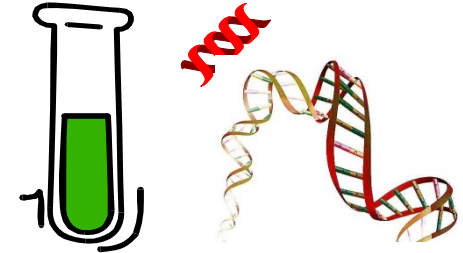
**De 50 a 100 proves per arribar  
a identificar l'espècie**

**Obtenció de resultats en setmanes**

**Resultats ambigus i variables**

**Mètodes microbiològics clàssics**

## TÈCNIQUES MOLECULARS



**A partir de poc volum de mostra**

**Caràcters genètics  
/ no depenen del medi**

**Una sola prova per  
identificar a nivell de soca**

**Obtenció de resultats en  
un o dos dies**

**Resultats precisos**

**Resultats reproduïbles**



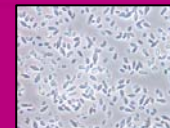
**Internationale Organisation für Rebe und Wein**  
**International Organisation of Vine and Wine**  
**Organización Internacional de la Viña y el Vino**  
**Organisation Internationale de la Vigne et du Vin**  
**Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino**

PROYECTO DE RESOLUCIÓN PROVISIONAL  
OENO-MICRO 09-408 Et5

**HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAR LA LEVADURA DE  
VINIFICACIÓN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y OTRAS LEVADURAS  
RELACIONADAS CON LA VINIFICACIÓN**

PROYECTO DE RESOLUCIÓN PROVISIONAL  
OENO-MICRO 09-409 Et5

**HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS EN  
LA UVA Y EL VINO**



## MÈTODES DEPENDENTS DE CULTIU

### A NIVELL D'ESPÈCIE

ITS RFLP-PCR

Seqüenciació de la regió  
D1/D2

### A NIVELL de SOCA

RFLP-mtDNA

Amplificació de  
seqüències  $\delta$

Genotipat per  
microsatèl·lits



## MÈTODES INDEPENDENTS DE CULTIU

PCR Quantitativa (QPCR)

Electroforesis en gels de gradient desnaturalitzant (DGGE)



## MÈTODES DEPENDENTS DE CULTIU

A NIVELL d'ESPÈCIE

Hibridació amb sondes d'ADN específiques d'espècie o d'una regió del genoma ("dot-blot")

Mètodes basats en PCR:

- Amplificació de les regions de consens i seqüenciació: subunitat del ARNr 16S o gen rpoB
- PCR específica de l'espècie
- RFLP (16S RNAr o rpoB)

A NIVELL de SOCA

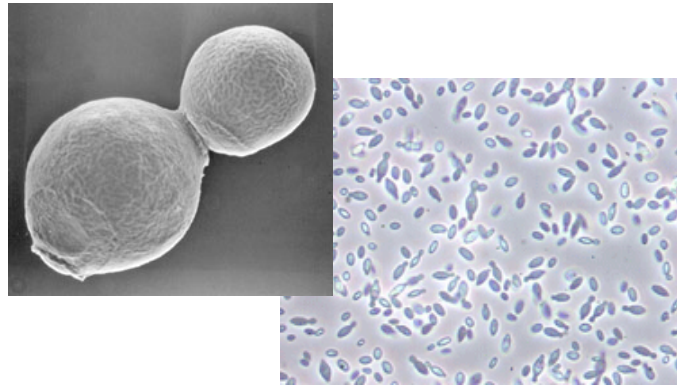
RAPD-PCR

PFGE

## MÈTODES INDEPENDENTS DE CULTIU (a nivell d'ESPÈCIE)

PCR -DGGE

Hibridació in situ amb fluorescència (FISH)



## **CONTROL DE LA IMPOSICIÓ DE SOQUES DE *Saccharomyces cerevisiae* EN LA FERMENTACIÓ ALCOHÒLICA.**

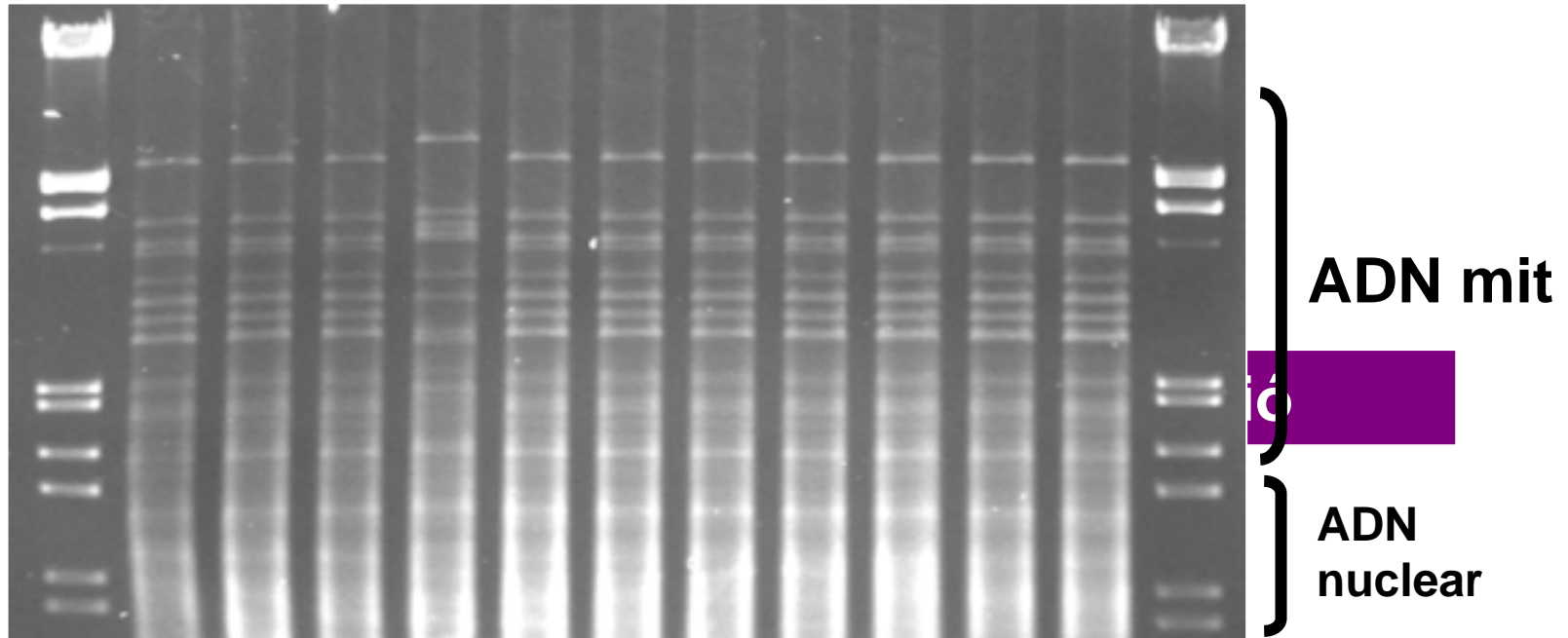
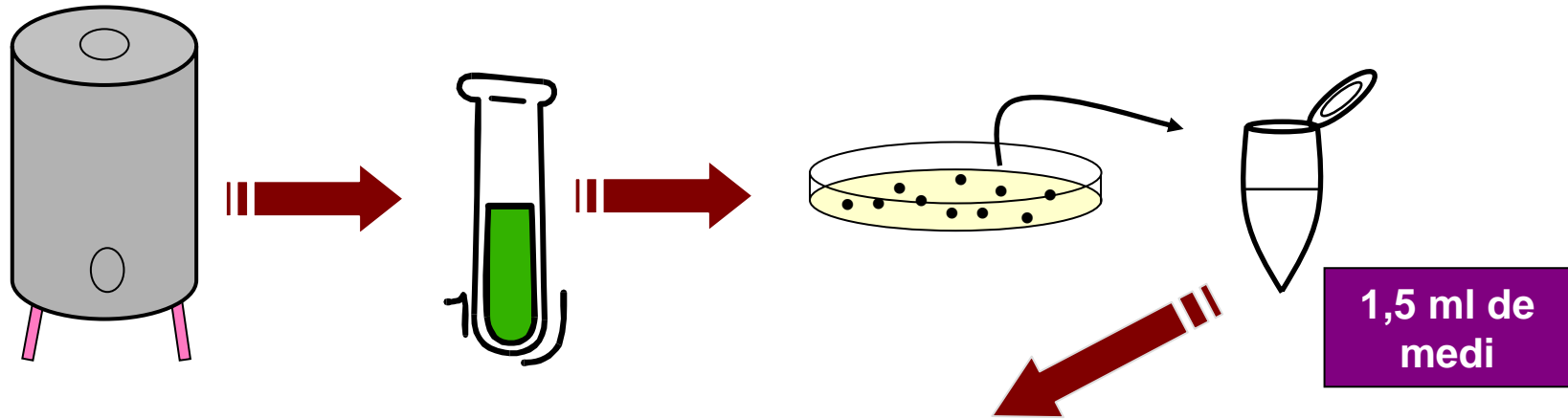


**ANÀLISI DEL PERFIL DE RESTRICCIÓ DE L'ADN  
MITOCONDRIAL (RFLP - mtDNA)**



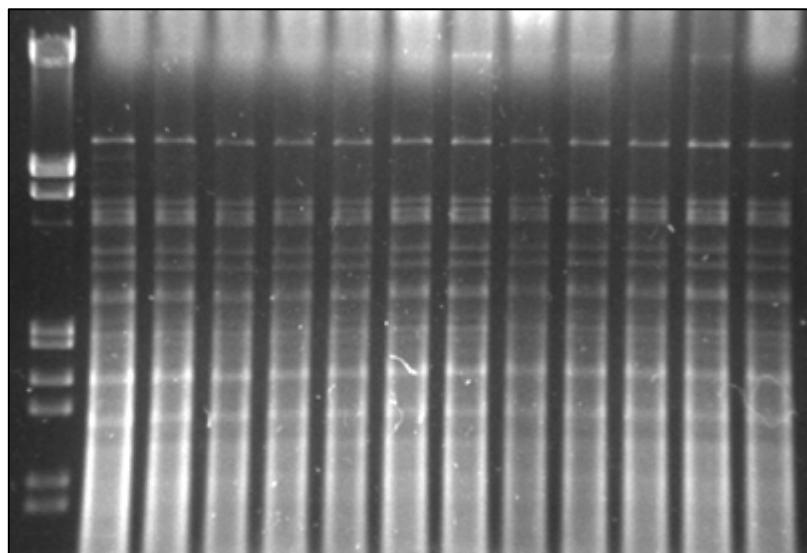


# METODOLOGIA

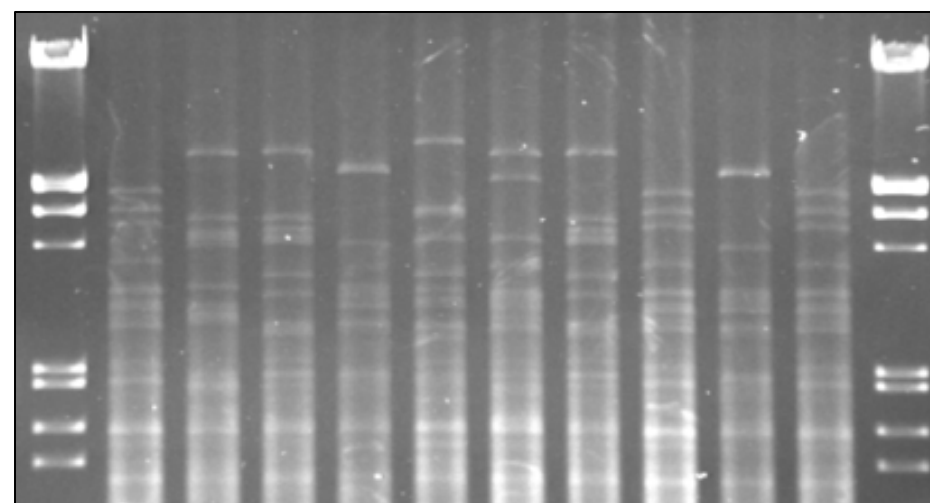




**ESTUDI de la IMPOSICIÓ DE SOQUES DE *Saccharomyces cerevisiae*  
MITJANÇANT L'ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL**



**FERMENTACIÓ SEMBRADA  
amb LLEVAT SELECCIONAT**

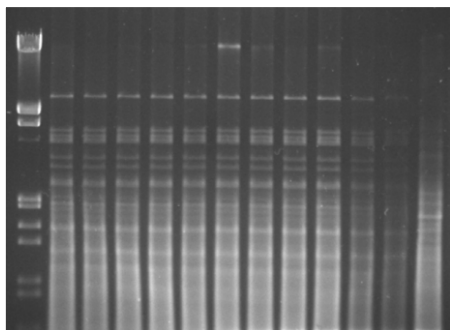


a b c d e f c a g h

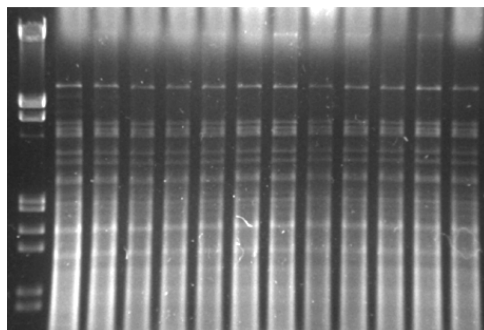
**FERMENTACIÓ ESPONTÀNIA**



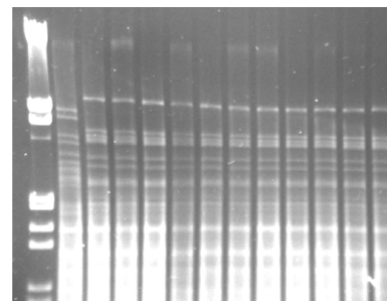
# Expressió dels resultats



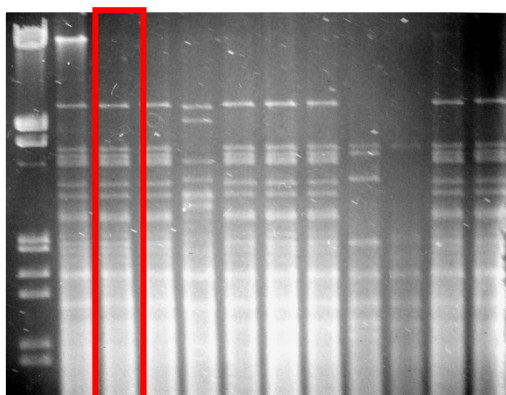
**Dia 1** (92% PC + 8% altres)



**Dia 2** (100% PC)



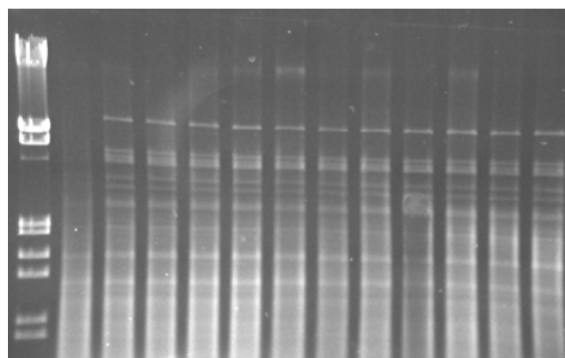
**Dia 3** (92% PC + 8% altres)



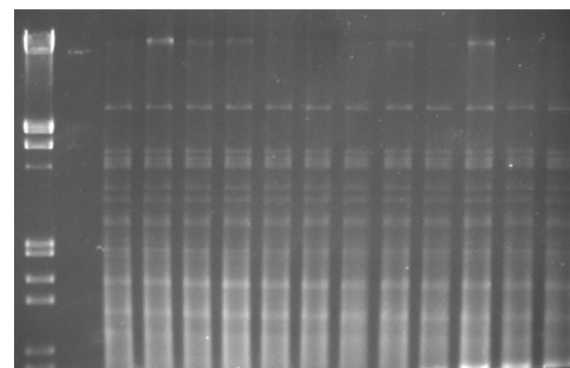
**Dia 4** (78% PC + 22% altres)



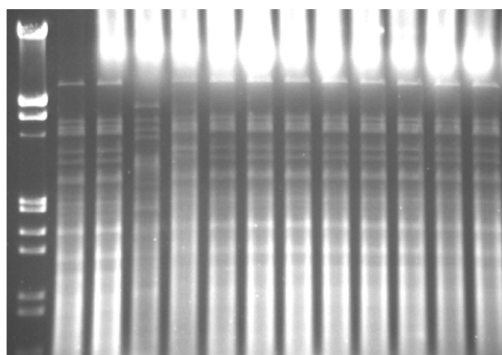
**Peu de cup**



**Dia 5** (100% PC)



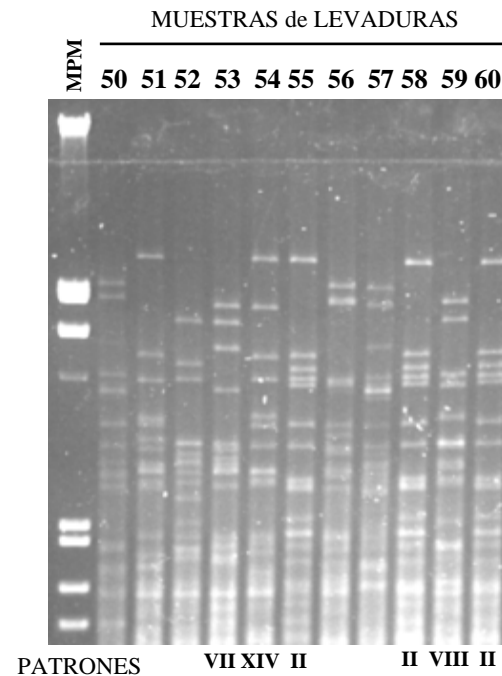
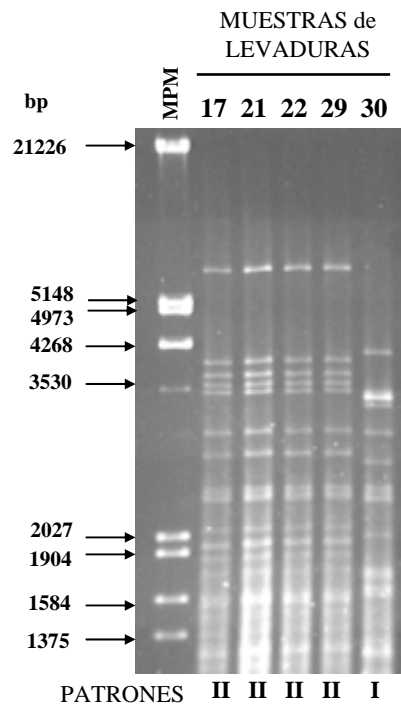
**Dia 6** (100% PC)



**Dia 9** (92% PC + 8% altres)



## CARACTERITZACIÓ DE 140 MARQUES COMERCIALS



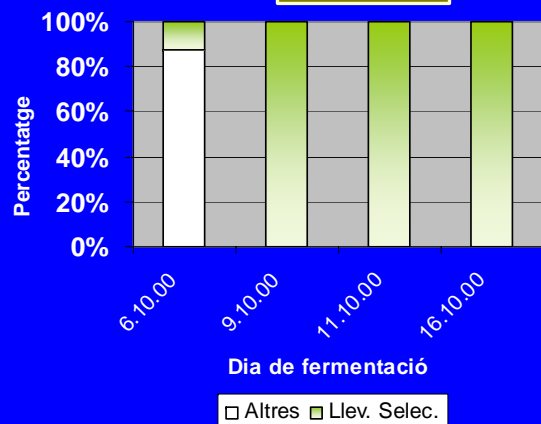
### 22 PATRONS DIFERENTS

- 5 PATRONS INCLOIEN 57 MARQUES:
- Patró I (11 marques)
- Patró II (23 marques)
- Patró III (6 marques)
- Patró IV (7 marques)
- Patró V (10 marques)

**EXISTEIX TANTA VARIABILITAT EN EL MERCAT ?? ...**



## PARELLADA



## VINS BLANCS

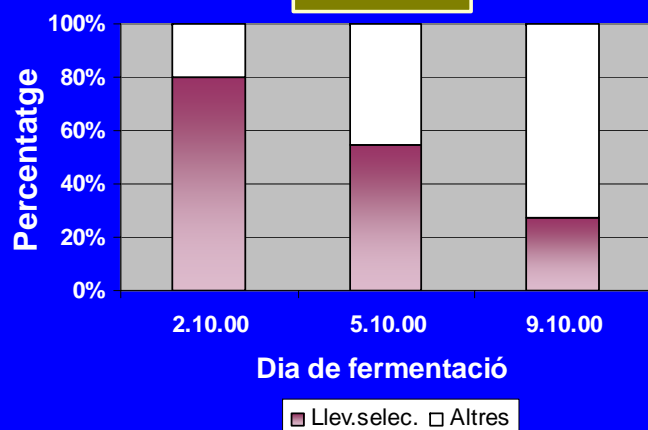
Primer dia d'anàlisi: presència majoritària d'altres llevats (87,5 %)

Sembra del peu de cup dos dies després de l'inici de FA

La població del llevat sembrat baixa al llarg del temps.

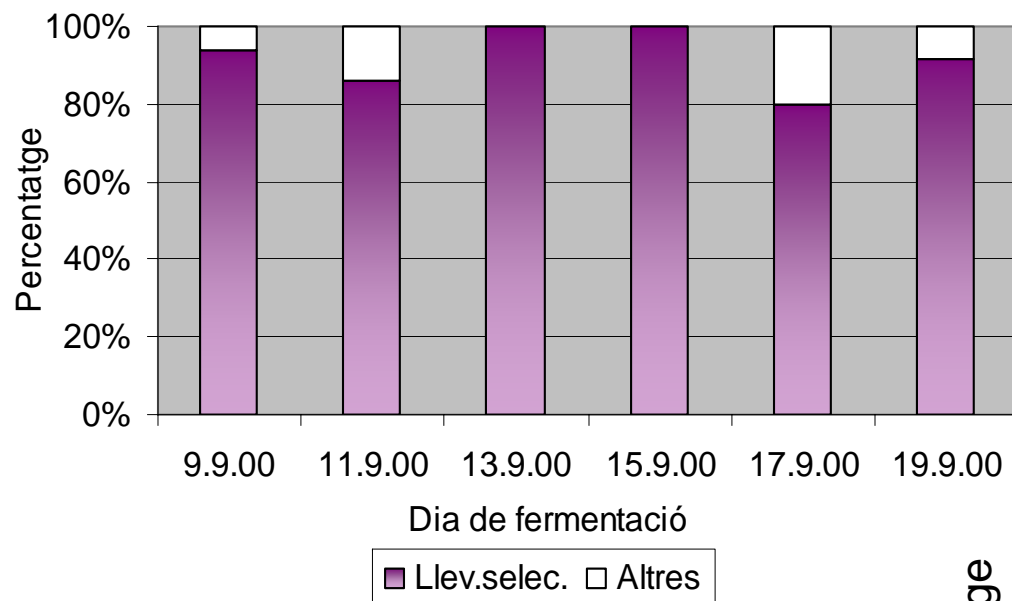
Emplenats successius amb altres lots de most: introducció de soques autòctones. Implantació del PC no efectiva.

## XAREL.LO





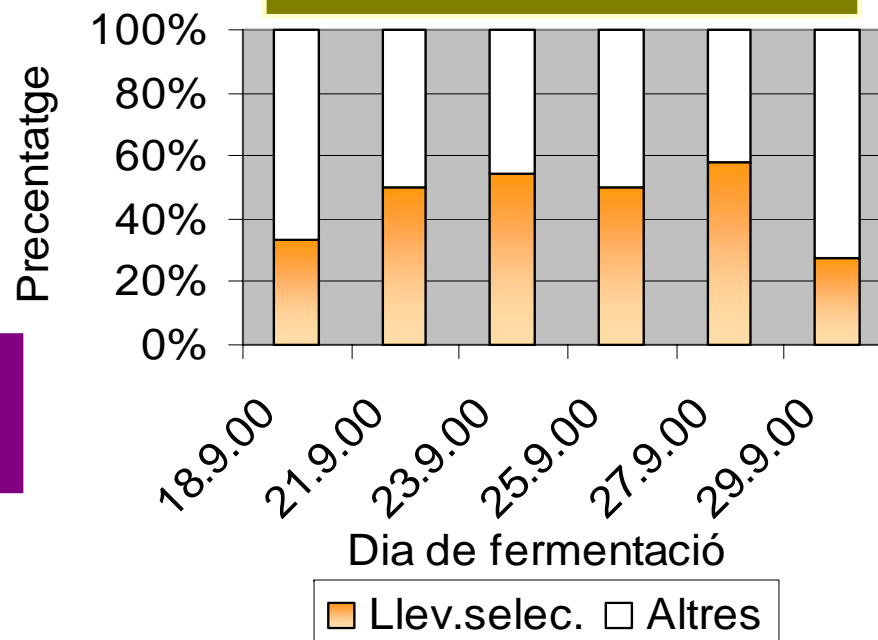
## MERLOT (A)

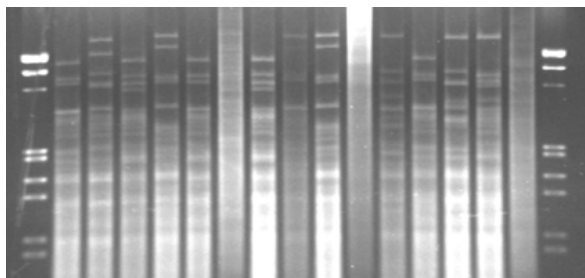


**Fermentacions sembrades  
directament amb peu de cup**

## VINS NEGRES

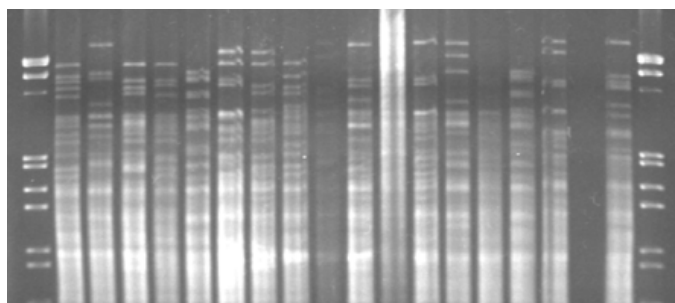
## CABERNET SAUVIGNON A





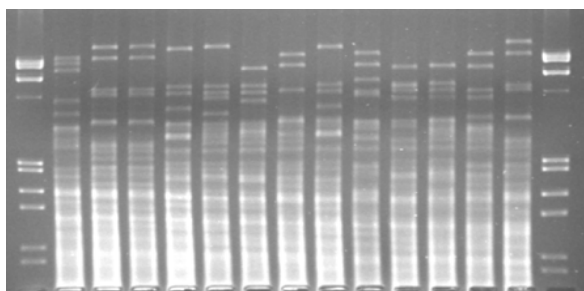
Merlot B (9.9.00)

0% PC + 100 % altres (8 soques diferents)



Merlot B (11.9.00)

0% PC + 100 % altres (13 soques diferents)



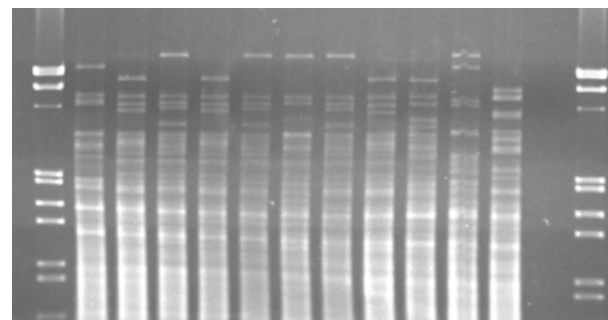
Merlot B (13.9.00)

0% PC + 100 % altres (8 soques diferents)

**Inòcul  
provinent  
d'un dipòsit  
en  
fermentació**

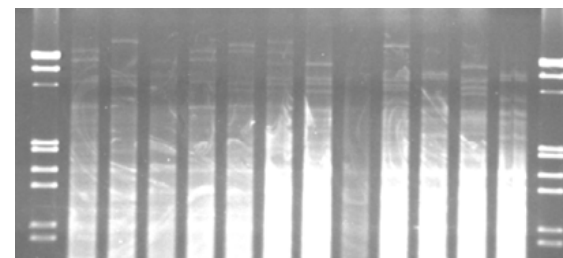


**NO  
IMPLANTACIÓ  
del LLEVAT  
SELECCIONAT**



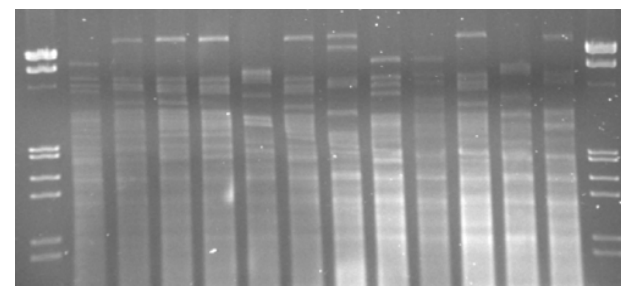
Merlot B (15.9.00)

0% PC + 100 % altres (7 soques diferents)



Merlot B5 (17.9.00)

0% PC + 100 % altres (7 soques diferents)



Merlot B6 (19.9.00)

0% PC + 100 % altres (7 soques diferents)



# AÏLLAMENT DE LLEVATS AUTÒCTONS EN FERMENTACIONS ESPONTÀNIES

## OBJECTIUS

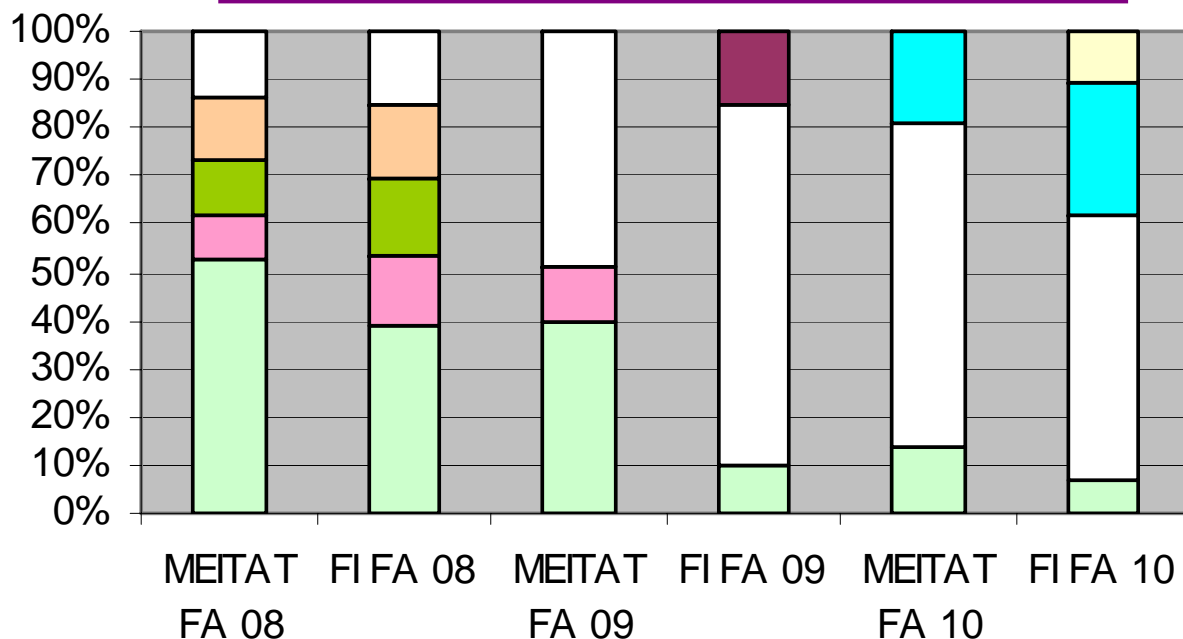
Aïllar i identificar en varis anys consecutius els llevats autòctons procedents de fermentacions alcohòliques espontànies de raïms cultivats en una determinada zona.

Crear un banc de soques de llevat per a un posterior estudi del seu potencial enològic en aquest tipus de vinificacions, caracteritzades per l'origen de la seva matèria primera.





## MACABEU 2008 - 2009 - 2010



	MEITAT FA 08	FI FA 08	MEITAT FA 09	FI FA 09	MEITAT FA 10	FI FA 10
<b>a</b>	53	39	40	10	14	7
<b>b</b>	9	15	11			
<b>c</b>	11	16				
<b>d</b>	13	16				
<b>altres</b>	14	15	49	75	67	55
<b>f</b>				15		
<b>g</b>					19	27
<b>m</b>						11

**n = 70 (12)    n = 69 (12)    n = 72 (24)    n = 72 (35)    n = 73 (39)    n = 74 (35)**

**n (nº soques totals analitzades)    ( ) (nº perfils diferents trobats)**



## MACABEU 2008 - 2009 - 2010

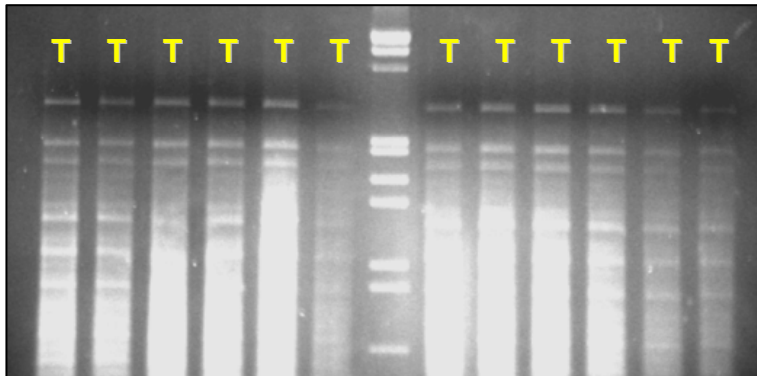
### SOQUES MAJORITÀRIES EN ELS 3 ANYS d'ESTUDI

	MEITAT FA 08	FI FA 08	MEITAT FA 09	FI FA 09	MEITAT FA 10	FI FA 10
<b>a</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>b</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>			
<b>c</b>	<b>X</b>	<b>X</b>				
<b>d</b>	<b>X</b>	<b>X</b>				
<b>f</b>				<b>X</b>		
<b>g</b>					<b>X</b>	<b>X</b>
<b>m</b>						<b>X</b>



# COINOCULACIÓ no Sc- Sc

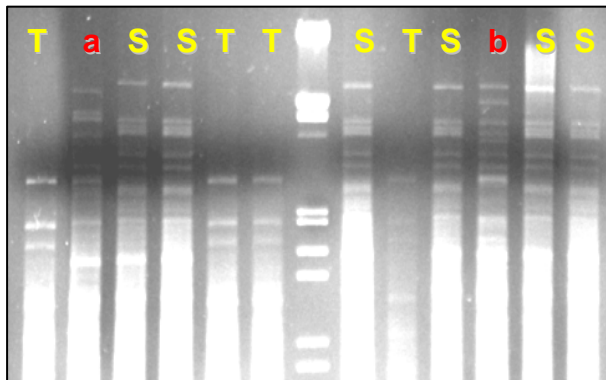
## INOCULACIÓ SEQÜENCIAL en FA de *Torulaspura delbrueckii* – *Saccharomyces cerevisiae*



(d inicial most = 1091)

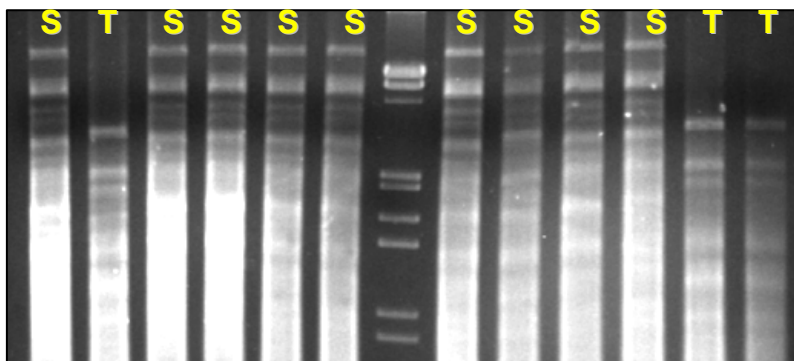
INICI FA (d=1080)  
(abans d'inocular Sc)

100 % T



MEITAT FA (d=1057)

50 % Sc  
33,3 % T  
16,6 % altres Sc



FI FA (d=990)

75 % Sc  
25 % T



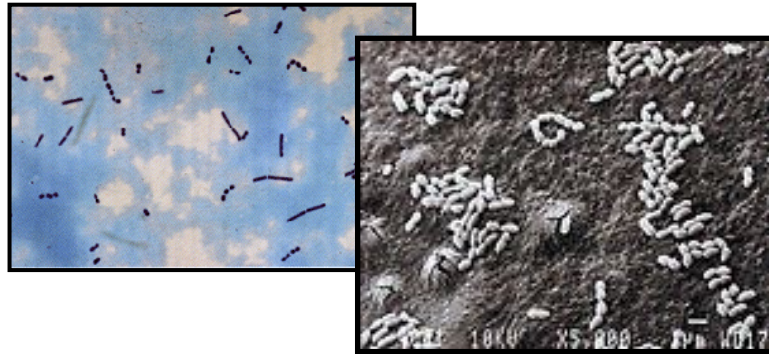
**L'anàlisi dels perfils de restricció de l'ADN mitocondrial permet efectuar un seguiment ràpid i fiable de l'evolució de les diferents poblacions de llevats (comercials o autòctons) durant la fermentació alcohòlica**



**El mètode permet analitzar incidents, com aturades o implantació d'altres soques, que poden aparèixer al llarg del procés fermentatiu**



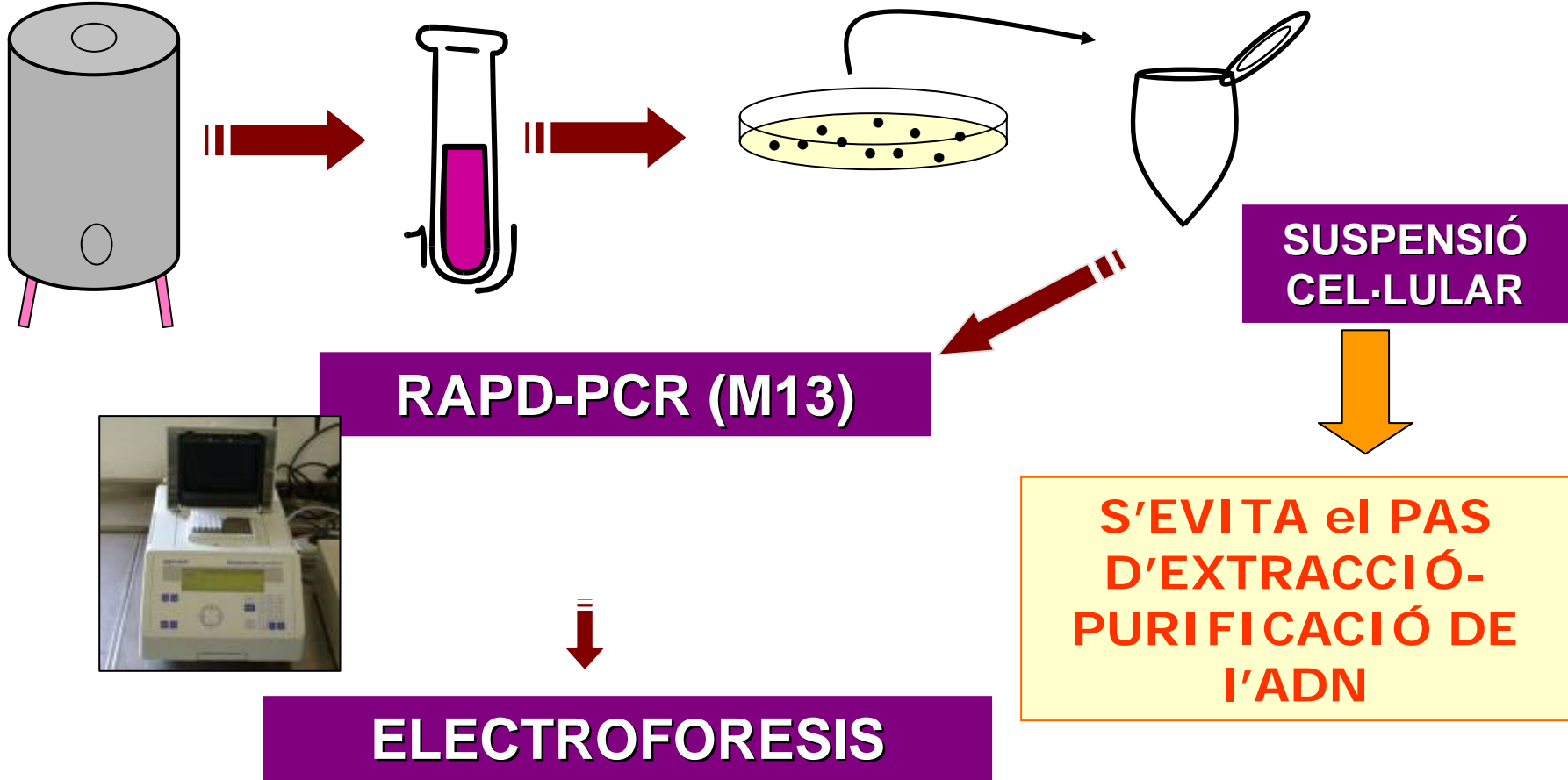
**Aquesta tècnica pot fer-se servir com a control de qualitat per llevats de primera o segona fermentació i processos de selecció de soques pròpies**



## IMPOSICIÓ DE BACTÈRIES LÀCTIQUES en la FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA.

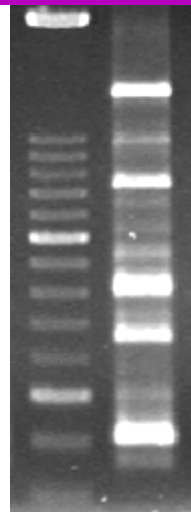


**RAPD-PCR: *Random Amplified Polymorphism  
Detection (primer M13)***

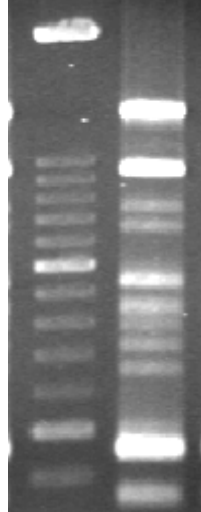




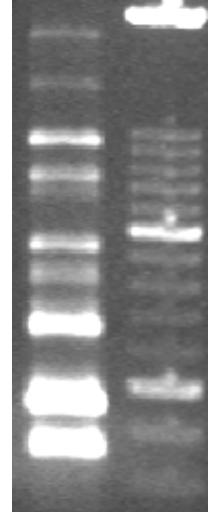
**VP41**



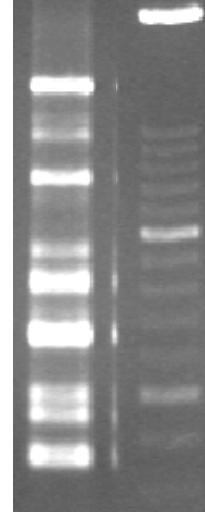
**ELIOS 1**



**ALPHA**

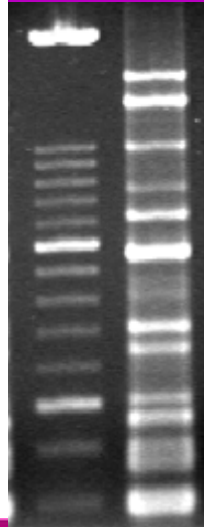


**PN4**

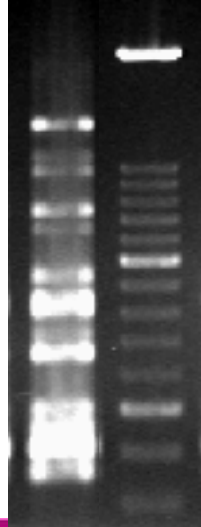


**PATRONS de  
SOQUES  
COMERCIALES**

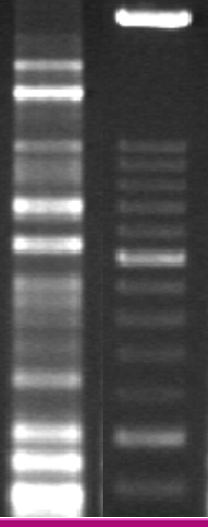
**EQ54**



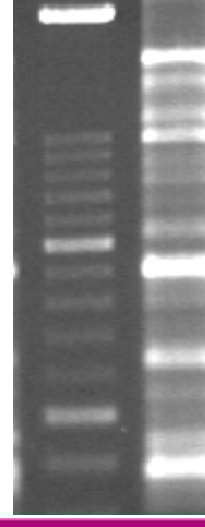
**BETA**



**C11 (Lp)**

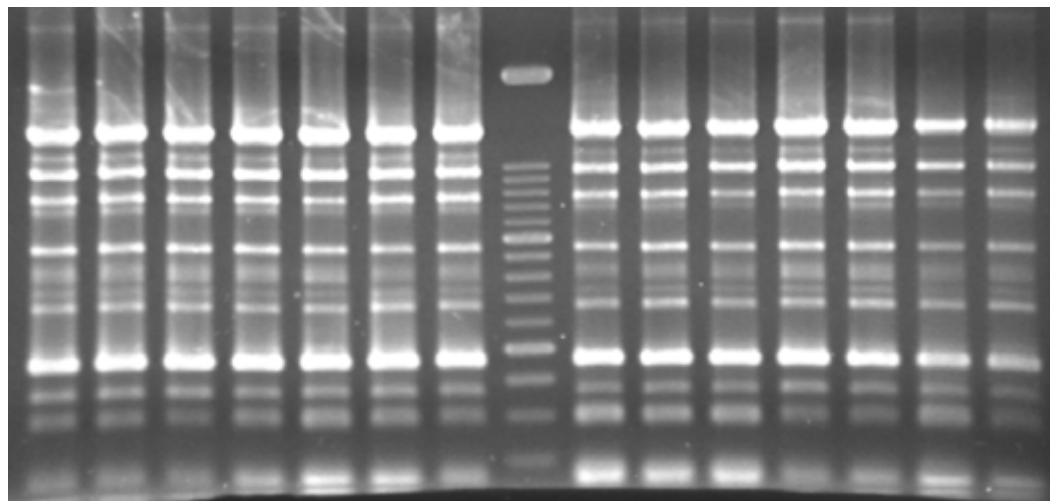


**V22 (Lp)**



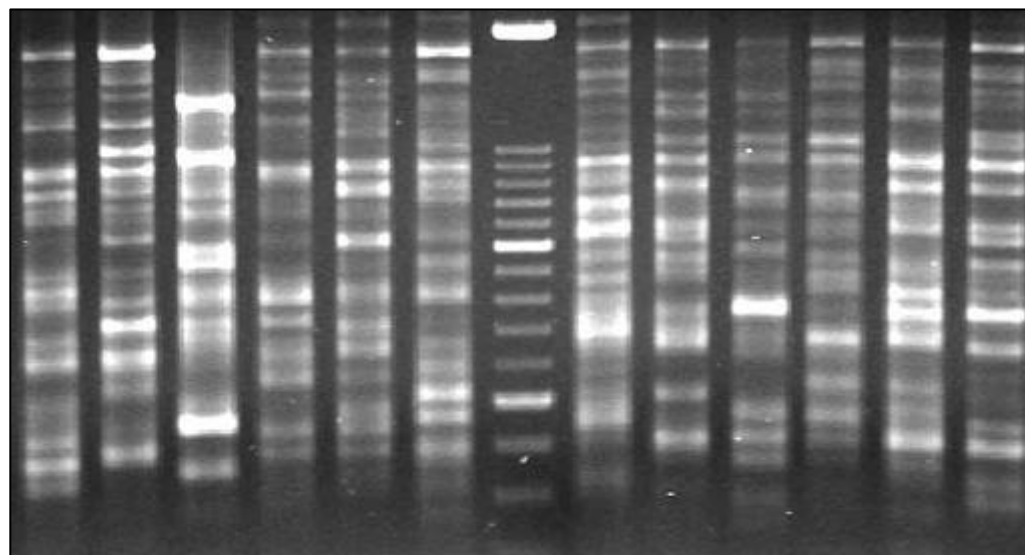


## EXEMPLES D'IMPLANTACIÓ / NO IMPLANTACIÓ



**100 % IMPLANTACIÓ**

**NO IMPLANTACIÓ  
(soques autòctones)**



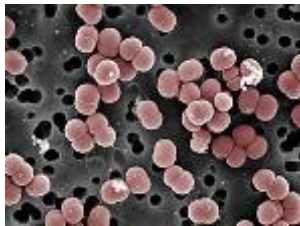




## FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA

- Població natural de bacteries làctiques:

*Pediococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp* i  
*Oenococcus oeni* ⇒ **capacitat aminogènica**



Fermentacions espontànies

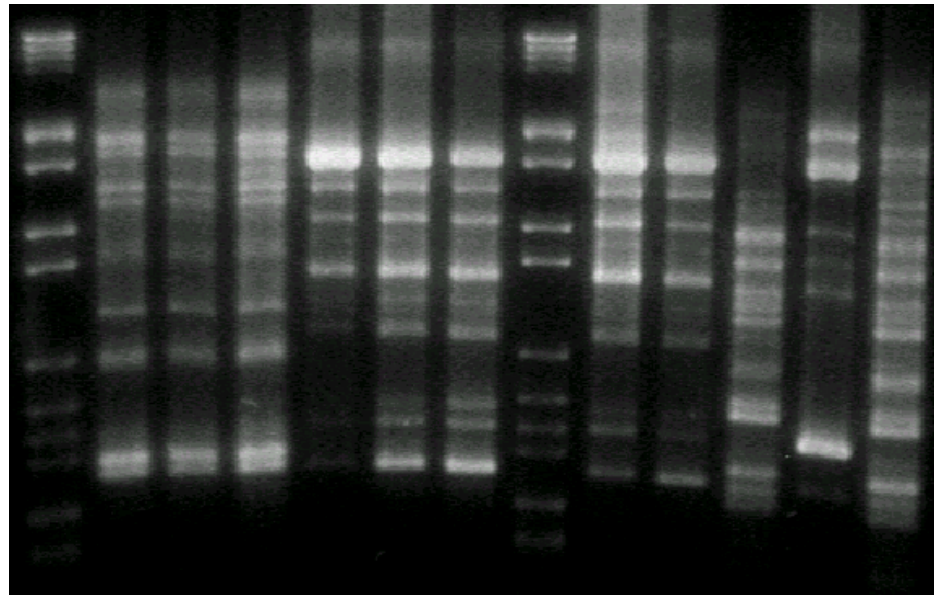


- Fermentacions conduïdes: estàrters de *Oenococcus oeni*.

- Garantir l'inici de la fermentació
- Atorgar al vi les característiques organolèptiques desitjades
- Menor producció d'amines biògenes
- **Problemes d'imposició de la soca estàrter ????**



# **El percentatge d'imposició de l'estàrter té influència sobre la producció d'amines biògenes durant la fermentació malolàctica ???**

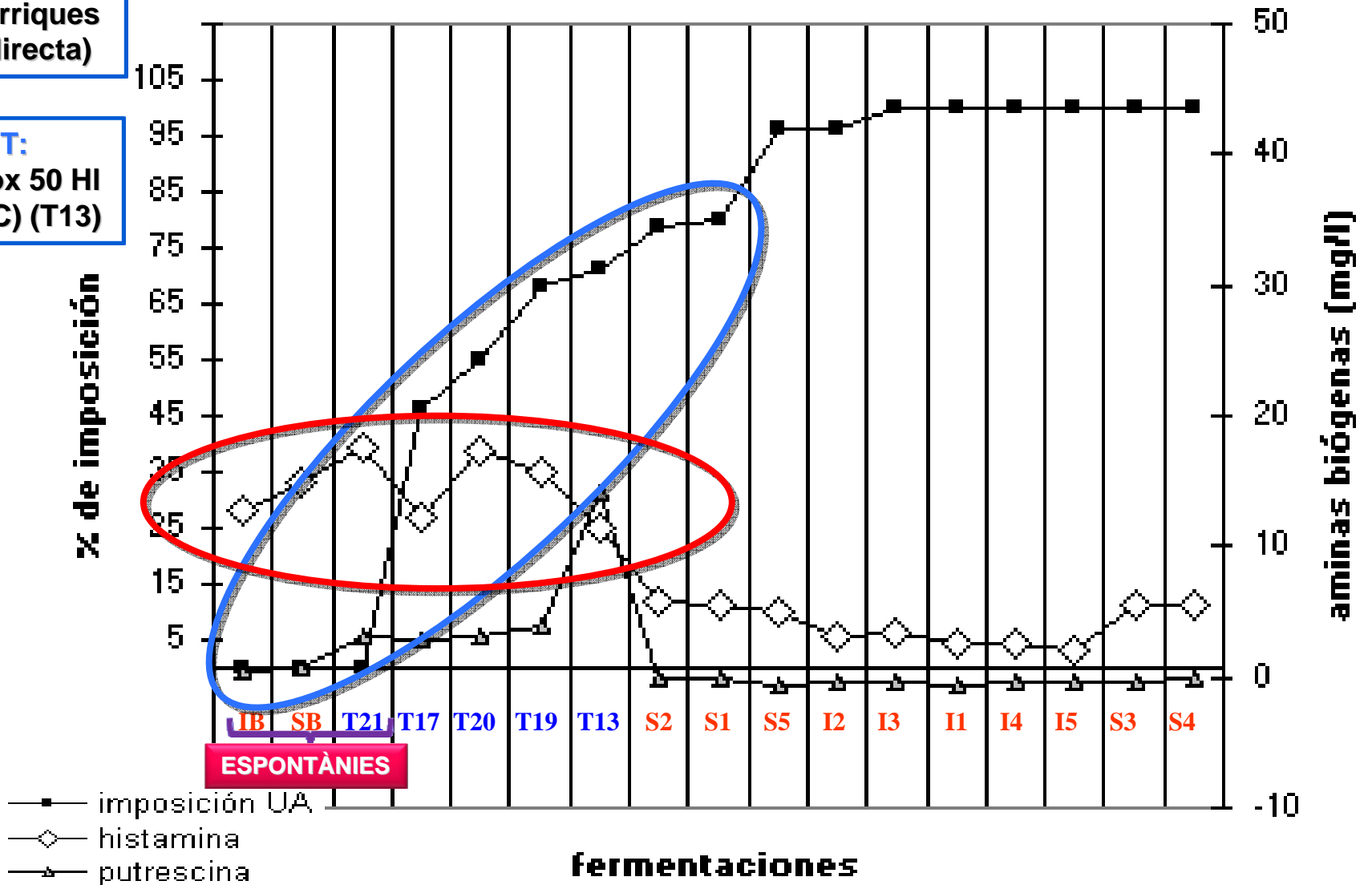




# IMPOSICIÓ BL – CONCENTRACIÓ AB

**Sèrie I i Sèrie S:**  
FML en barriques  
(sembra directa)

**Sèrie T:**  
FML en inox 50 HI  
(sembra PC) (T13)



- imposició UA
- ◇ histamina
- △ putrescina

**fermentaciones**

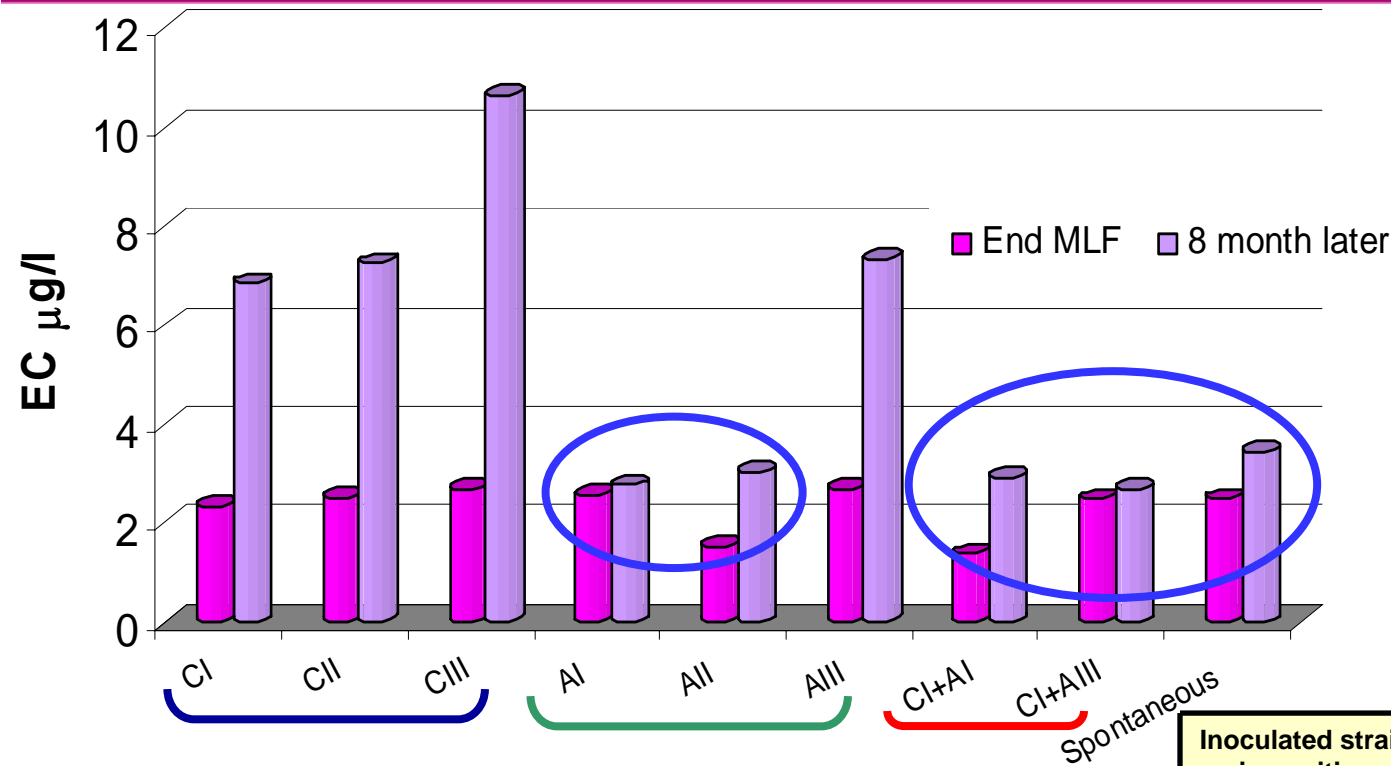


Les fermentacions **malolàctiques espontànies** van mostrar **concentracions d'amines biògenes superiors** a les fermentacions malolàctiques inoculades amb soques comercials.

La **producció** de histamina, tiramina, putrescina i cadaverina tendeix a **disminuir** a mesura que **augmenta el percentatge d'imposició** de la soca estàrter.



# IMPOSICIÓ BL – CONCENTRACIÓ CE



**TEMPRANILLO**

**FML induïda en  
diferents moments  
de l'elaboració del vi**

**CARBAMAT  
d'ETIL**

**C: Lp C11  
A: Oo alpha**

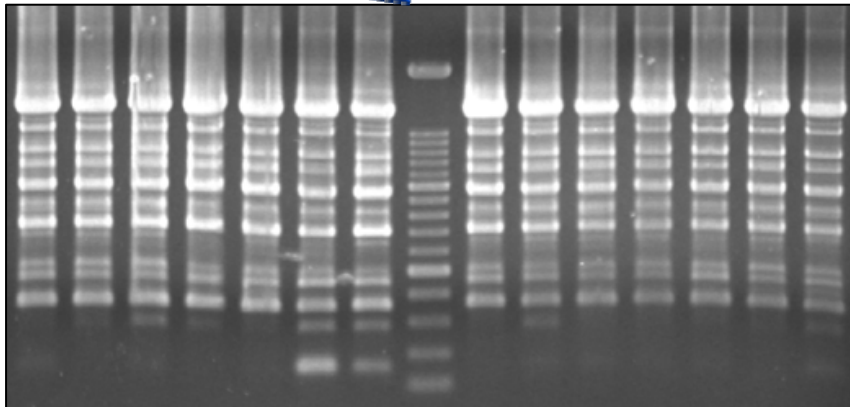
**I: 12-24 h inici FA  
II: a 10g/l sucre al final de FA  
III: post FA**

	Inoculated strain imposition	Other strains
C1	0%	37% a +63% b *
CII	0%	18% a+ 32% b+ 50% c *
CIII	4%	96% alpha *
AI	100%	0%
AII	96%	4% a *
AIII	4%	33% D + 4% B + 58% C
CI+AIII	88% alpha +4% C11	4% a+ 4%b *
CI+AIII	100% alpha+0% C11	0%
Spontaneous		100% (alpha+A) *

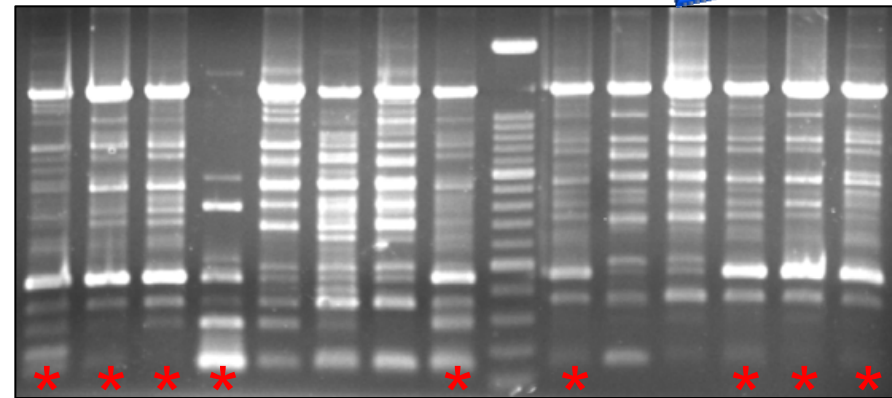


# FML i NUTRICIÓ DURANT FA

Vinificació	103/10	104/10	105/10	106/10	107/10
TRACTAMENT	Coinoculació BL a les 24 h de FA. Nutrició complexa	Inoculació BL post FA. Nutrició complexa	Inoculació BL post FA. Nutrició sals amoniacals	Coinoculació BL a les 24 h de FA. Sense afegir nutrients	Inoculació BL post FA. Sense afegir nutrients
IMPLANTACIÓ	<b>100% VP41</b>	<b>92,8% VP41</b> + 7,2% otras (1 perfil)	63,6% VP41 + 36,4% otras (3 perfils con 18,2% + 9,1% + 9,1%)	<b>92,8% VP41</b> + 7,2% otras (1 perfil)	38,5% VP41 + 61,5% otras (2 perfils con 53,8% + 7,7%)



Vinif 103: 100% IMPOSICIÓ



Vinif 107: 38,5 % IMPOSICIÓ

La coinoculació i la nutrició complexa semblen afavorir la implantació de les BL sembrades per realitzar la FML



**GRÀCIES PER LA  
VOSTRA ATENCIÓ!**

[apuigpujol@gencat.cat](mailto:apuigpujol@gencat.cat)

[anna.puig@irta.cat](mailto:anna.puig@irta.cat)

