



Metabolisme dels compostos de sofre volàtils produïts per *Saccharomyces cerevisiae* en fermentacions víniques

Enric Bartra Sebastian

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Universitat de Barcelona
Facultat de Biologia
Departament de Microbiologia**

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

**METABOLISME DELS COMPOSTOS DE SOFRE VOLÀTILS PRODUÏTS
PER *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EN FERMENTACIONS VÍNIQUES**

**Memòria presentada per a optar al grau
de Doctor per la Universitat de Barcelona
per Enric Bartra Sebastián**

Programa de doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia

El director de la Tesi

El doctorand

Dr. Ricard Guerrero

Enric Bartra Sebastián

Barcelona , setembre 2012

INDEX

RESUM.....	5
1. INTRODUCCIÓ.....	9
1.1 Introducció general.....	10
1.2 El vi i el seu sector.....	10
1.3 Defectes actuals i reptes de futur.....	13
1.4 Compostos de sofre volàtils.....	15
1.5 Tècniques d'anàlisi de compostos de sofre volàtil al vi.....	21
1.6 Microbiologia enològica.....	23
2. OBJECTIUS.....	29
3. RESULTATS.....	31
3.1 Anàlisi de compostos de sofre volàtils a concentracions traça en vins.....	31
3.2 Anàlisi de la formació de compostos de sofre durant la fermentació.....	41
3.3 Comparació de la producció de H ₂ S en soques de llevats vínic.....	48
3.4 Determinants genètics de la producció de H ₂ S	56
3.5 Factors vitícoles que poden afectar la formació de compostos de sofre volàtils.....	62
3.6 Tractaments de vins amb defectes de compostos de sofre.....	65
3.7 Descripció sensorial de vins.....	72
4. DISCUSSIÓ.....	77
5. CONCLUSIONS.....	85
6. MATERIALS I MÈTODES.....	87
7. BIBLIOGRAFIA.....	101
8. ANNEX: ARTICLES	

RESUM

Amb l'objectiu de veure la influència del llevat en els compostos de sofre volàtils en els vins, s'han estudiat diferents aspectes de la formació de sulfur d'hidrogen (H_2S) i altres compostos de sofre volàtils lleugers, per part de *Saccharomyces cerevisiae*, durant la fermentació vínica. Es proposen mètodes per mesurar i evitar el problema de l'olor desagradable del H_2S i els seus derivats, per anàlisi sensorial, comparació de soques de llevat, determinants genètics i aspectes vitícoles, i augmentar la qualitat dels vins i respectar les aromes pròpies de cada varietat de raïm.

1. S'han mesurat compostos de sofre volàtils fins valors traça en vins mitjançant l'anàlisi per espai de cap, cromatografia de gasos i detector fotomètric de flama. Cinquanta set vins dels setanta set, provinents de dinou cellers, tenien algun compost a una concentració per sobre del llindar de percepció. El sulfur de dimetil (DMS) va ser el més freqüent i en més concentració. L'età tiol (EtSH) i el dietil disulfur (DEDS) estaven a la majoria de Cabernets, Merlots, vins blancs fets amb Pinot noir, i en menor quantitat en Sauvignon blanc i Chardonnay. El metà tiol (MeSH) es va trobar a nou dels dinou Pinot noir. Es van trobar dotze vins amb EtSH, sis vins amb DEDS, cinc amb DMS i tres amb MeSH, per sobre del llindar de percepció, en canvi disset vins tenien concentracions de compostos de sofre volàtils per sota el llindar de percepció i en tres vins no es va detectar cap compost per estar per sota la detecció del sistema o ser un compost sense sofre.

2. En l'elaboració del cava i altres escumosos, intervenen dues fermentacions. Si en els vins en general és important l'encert en la selecció i característiques fermentatives de la soca de llevat, en els vins escumosos ho és doblement, pels dos inicis i finals de fermentació i per la llarga criança en condicions reductores a dins l'ampolla que pot potenciar els compostos de sofre volàtils. Entre les condicions per a seleccionar una soca per a la primera o segona fermentació hi ha la menor formació de H_2S possible. En un estudi sobre estabilitat genètica, es va comprovar que soques més estables mantien les característiques enològiques i realitzaven una segona fermentació amb complerta normalitat. Per a conèixer les condicions que afavoreixen la producció de H_2S , s'han realitzat fermentacions amb most i medi model amb diferents llevats i mesurat els compostos de sofre per anàlisi de l'espai de cap per cromatografia de gasos i detector selectiu. S'ha vist que sempre es forma alguna quantitat de compostos de sofre (EtSH, DMS, SO_2) i que la formació de H_2S coincideix amb el consum de nutrients i dues fases de la fermentació, en el creixement exponencial i en la fase de latència.

3. Per tal de comparar les soques de llevat víniques per la seva producció de H_2S , hem de poder diferenciar-les i agrupar-les per mètodes objectius. S'ha fet servir la tècnica de l'anàlisi de restricció del DNA mitocondrial (mtDNA) en 45 soques comercials de llevat vínic *Saccharomyces cerevisiae*. L'anàlisi amb l'enzim *Hinf* I va donar 17 perfils que es poden considerar únics. Les 28 soques restants van donar vuit perfils de restricció del mtDNA. En un estudi més ampli, es van comparar 140 soques

comercials i es va trobar que alguns perfils eren compartits per fins 22 referències. Es va avaluar la formació de H₂S en funció del perfil genètic de les 140 soques de llevat comercials en fermentacions de un litre de most de referència amb 120 mg/L de nitrogen assimilable. Es va observar que en 54 soques (40%) no es va detectar H₂S. Les soques que en van produir, van donar valors entre 0.2 i 13 mg/L. També es va mesurar la producció de sulfits (SO₂) i es va observar una correlació inversa significativa entre la producció de H₂S i SO₂. Hi ha perfils de restricció del mtDNA que han donat alta producció de H₂S. Es recomana fer proves entre soques de llevat i el most per predir la formació de H₂S.

4. Per entendre els determinants genètics de la producció de H₂S, s'han comparat els transcriptomes de dues soques víniques utilitzades en els cellers amb diferent formació de H₂S, UCD522 (productor alt) i P29 (productor baix). Es van prendre mostres a partir de fermentacions en el moment de la formació del H₂S. Els perfils de transcripció es van analitzar amb tres mètodes, un xip de cDNA, un xip basat en oligonucleòtids i una qRT PCR d'una selecció de transcrits. Menys del 10% dels gens van mostrar diferències significatives entre les dues soques. La producció alta de H₂S va correlacionar amb una sobre expressió general dels gens de la biosíntesi de la tiamina, en canvi els gens relacionats amb el catabolisme del aminoàcid no es van expressar de manera diferent. Els resultats indiquen que, en alguns llevats, el paper de la síntesi de la tiamina en la producció de H₂S pot ser més important que el metabolisme del nitrogen i defineix nous objectius per a la selecció de llevats vínic.

5. Es van realitzar experiments per veure l'efecte del reg a la vinya sobre la composició del most i possible efecte sobre la formació de compostos de sofre. També es va estudiar la composició nitrogenada de mostos de diversos anys i hi ha molts casos que el nitrogen assimilable pels llevats és limitant, convé mesurar-lo i fer una aportació si cal. S'ha vist que alguns fungicides aplicats a la vinya eren causa de formació de compostos de sofre volàtil durant la fermentació del most. Per estudiar alternatives al fungicides s'han estudiat alternatives biològiques, oli vegetal, llevat per l'oidium i altres per al podrit. Per altra banda, hi havia la possibilitat que hi hagués alguna interferència amb els llevats de la fermentació. Per veure si els tractaments tenien algun impacte sobre la fermentació, es van fer vinificacions amb lots de raïms tractats i es va seguir la fermentació i el vi resultant. Els tractaments realitzats durant dos veremes, no han afectat negativament la fermentació o la qualitat del vins.

6. En tractaments en vins amb olors de reducció amb sulfat de coure i citrat s'ha vist que el citrat pot eliminar alguns dels compostos de sofre volàtil i deixar un menor residu de coure en el vi. En casos de vins amb disulfurs s'ha vist que un tractament previ amb àcid ascòrbic podia millorar el tractament amb coure. En molts casos els vins tractats han millorat però no s'eliminen del tot els compostos de sofre volàtils i per tant és preferible evitar-los durant la fermentació amb mesures preventives.

7. Per a caracteritzar el vins de varietats tradicionals produïts a Catalunya s'ha fet una anàlisi sensorial descriptiva de diversos vins. Per al Xarel·lo es van tastar 25 vins,

entre els quals n'hi havia de les collites de 2004 a 2008. Es va trobar un grup de vins joves que es van caracteritzar pels descriptors *fruita* i *floral* i un gust *fresc*. Un altre grup el van formar els vins amb criança caracteritzats per les aromes de *torrat*, *especiat* i *compota*. No es van descriure aromes com aranja o boix típics dels compsosos tièdics positius.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Introducció general

En el món del vi hi ha una tendència a la proliferació de marques, a Catalunya n'hi ha més de 1700 i a Espanya més de 10000. Aquesta profusió fa que hi hagi una important competència entre els elaboradors que no poden permetre que hi hagi defectes en els seus vins. Un dels defectes que es manté, és el derivat dels compostos de sofre produïts pels llevats durant la fermentació. En els darrers anys hi ha hagut equips a països importadors o exportadors que hi han treballat analíticament i sensorial (Nykanen i Suomalainen 1983, Spedding et al. 1983, Goniak i Noble 1987). Aquí, pocs són els laboratoris i centres de recerca que ofereixen una anàlisi completa d'aquests compostos i la majoria de cellers no els mesuren. En aquest treball s'han analitzat els factors que influeixen als llevats, a produir aquest defecte i maneres d'evitar-ho.

S'ha començat per identificar i quantificar els compostos responsables, s'ha continuat comparant la formació dels compostos de sofre volàtils entre soques de llevats i s'han analitzat els factors genètics entre dues soques. També es van fer proves en vinya per trobar alternatives a alguns pesticides i en celler per millorar els vins amb defectes.

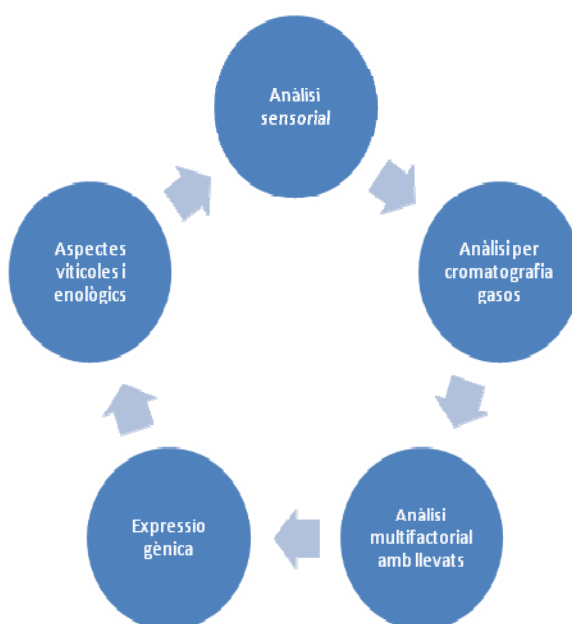


Fig.1.1 Tècniques utilitzades per a determinar els factors de formació dels compostos de sofre volàtil al vi

En les característiques d'un vi intervenen diferents factors, entre ells, la gestió de la vinya, les fermentacions i les operacions del celler. Quan es vol millorar un aspecte s'han de tenir en compte el màxim de factors i la seva influència en el vi resultant. En aquest treball es volia conèixer més a fons els factors de la formació de compostos de sofre volàtil en el vi. Per aconseguir aquesta informació s'han hagut de seguir disciplines molt diverses: l'anàlisi sensorial, l'anàlisi de compostos traça per cromatografia de gasos amb detectors específics, l'enologia, la microbiologia, les eines de biologia molecular i genòmica i aspectes més agrònomic com la gestió del reg i la protecció de la vinya. Per a poder utilitzar aquestes tècniques ha fet falta fer estades i col·laboracions amb universitats, centres de recerca i empreses de diversos indrets i comptar amb el suport de diferents equips dels que he tingut molt per aprendre. Això m'ha obligat a fer-ho en un període llarg de temps i des d'angles aparentment allunyats però tots ells relacionats amb el seguiment de la qualitat final del vi i la millora de les perspectives d'un sector molt arrelat a la nostra terra.

Per a estudiar els compostos de sofre volàtils durant la fermentació del vi i conèixer-ne les causes, s'ha seguit diversos passos: anàlisi química i sensorial de vins, elaboració del vi a escala pilot, comparació dels llevats, factors genètics en els llevats, tractaments del vi i gestió de la vinya. Com en una roda de millora constant, els problemes que sorgeixen en l'anàlisi sensorial s'han d'analitzar per successives etapes en camps complementaris, i tornats a verificar, per anàlisi sensorial.

1.2 El vi i el seu sector

El vi és un aliment que s'elabora des de l'antic Egipte i Mesopotàmia. El vi ha acompanyat celebracions com el banquet de Plató, ha viatjat en àmfores de Tarraco i Emporion cap a Roma, ha estat present a les taules de les princeses medievals i ha conservat interès fins els nostres dies. S'ha dit que el vi és la més civilitzada de les begudes. Es consumeix a molts indrets del món i algunes ampolles tenen un preu molt exclusiu (Dominé 2008, Pretorius 2000).

El vi és una constant en la història dels Països Catalans (Ciurana 1980, Giralt 2005) i actualment és un dels sectors més importants dins l'agricultura i l'alimentació. A Catalunya està organitzat en 11 denominacions d'origen més el Cava (que també es pot produir fóra de Catalunya), i abasta gran part del territori, amb més de 600 cellers que ocupen directament unes 4500 persones. És un sector que exporta a 140 països, una facturació superior als 500 milions d'euros, amb una llarga tradició i unes expectatives raonablement positives gràcies a l'exportació i que, en els darrers anys, s'està potenciant amb el turisme del vi o enoturisme (Generalitat de Catalunya, Observatori del vi i el cava 2007).

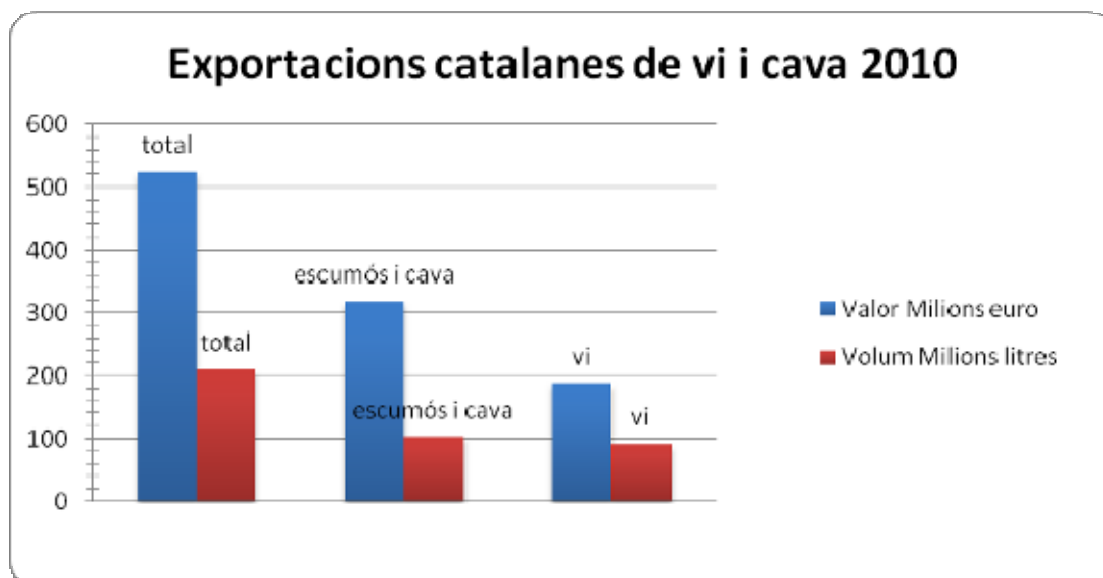


Fig. 1.2 Valor i volum de les exportacions catalanes de vi i cava. (Observatorio Español del Vino 2011)

Els vins a Europa, i per tant, a Catalunya, són un dels productes alimentaris més regulats. Les vinyes s'han de plantar amb permís de plantació, en zones establertes, amb varietats autoritzades i amb rendiments limitats. Els vins s'han d'elaborar en cellers autoritzats, amb unes normatives establertes, han de tenir uns paràmetres analítics concrets i finalment han de superar una prova de qualificació sensorial en un tast anònim que organitza la denominació d'origen on el vi estigui inscrit. Després els vins han de passar la prova del mercat, arribar en bones condicions fins el consumidor i mantenir-ne la qualitat, és a dir, han de respondre a les expectatives de qui els tasta. Aquesta acceptació final, normalment està relacionada amb el preu, una bona imatge de l'envàs, un bon aspecte del color, un bon gust i una aroma agradable.

El vi és un exemple de producte sensorial. Podem apreciar els seus colors, sentir el so del tap i del vi omplint la copa, olorar les seves aromes i tastar els seus gustos. En definitiva, gaudir amb la seva diversitat i evolució. També podem llegir la seva etiqueta i imaginar-nos el paisatge de les vinyes, els cellers i les persones que han estat el seu origen.

En els darrers decennis, el vi ha passat de ser un producte quotidià als països mediterranis, venut localment a granel a les tavernes, a ser un producte per ocasions especials a tot el món, generalment embotellat, venut a botigues especialitzades i amb preus en augment. Les perspectives de mercat, per una banda, han fet augmentar les plantacions i tenim molts més productors arreu del món, i per una altra, augmenta el nombre de consumidors formats que esperen un vi agradable, interessant, divers, una experiència plaent en conjunt: color, aroma i gust agradables, i que respongui al nom d'una regió o un lloc que aquell vi representa.

En els tractats antics sobre vins es parla de com millorar el vins “corromputs” i es proposen tècniques de clarificació o tractaments diversos (Anònim, S.XV). Pasteur va publicar el seus estudis sobre el vi al 1860 i va assentar les bases microbiològiques de l'enologia. Alguns dels canvis més importants en viticultura van ser l'arribada de l'oïdium al 1850, el míldiu 1870 i la fil·loxera al 1890; en el camp econòmic, això va suposar unes pujades i baixades en el preu del vi i en el camp tècnic, l'obligació de fer tractaments amb sofre per l'oïdi, amb coure pel míldiu i empeltar les vinyes per evitar la fil·loxera. A l'enologia els canvis s'han fet més recentment i han estat, a partir del 1970, el control de temperatura de fermentació, la utilització de l'acer inoxidable i la sembra de llevats i bacteris seleccionats. Aquests canvis vitícoles i enològics han estat una millora en molts aspectes, i cada dia es fan millors vins però, alhora, el control de l'oxidació i envasos més hermètics poden generar defectes relacionats amb els compostos de sofre (Descout 1991).

El vi, per a garantir la seva bona imatge i el seu preu, cal que respongui a certs criteris de qualitat i evitar els possibles defectes. L'aroma del vi és un dels aspectes més complexes, està format per centenars de compostos però n'hi ha alguns que tenen més importància que altres i si estan per sobre d'un límit determinat, poden donar sensacions desagradables. És llavors quan els anomenem defectes. Els defectes aromàtics més habituals en els vins, abans d'embotellar, són l'olor a vinagre produït per bacteris acètics, l'olor a estable o fenol produït pel llevat *Brettanomyces* i l'olor a reduït, produït en determinades situacions pels mateixos llevats *Saccharomyces* de la fermentació del vi.

El vi no és un producte de primera necessitat. Es consumeix per plaer, per tant ha de ser agradable a la vista, a l'olfacte i al gust. Per poder-ne apreciar la qualitat, el vi no ha de tenir defectes. L'aspecte dels vins ha de ser agradable: color adequat i absència de terbolesa. El color admet un bon marge tant entre vins blancs, com negres. Per obtenir un bon color hem de limitar la maceració en vins blancs, mentre que l'afavorim en vins negres. Durant l'elaboració hem de protegir els vins contra les oxidacions, que tornen foscos els vins blancs i fan perdre color als vins negres. La transparència i brillantor s'aconsegueixen per clarificació amb col·loides com la bentonita o la gelatina. L'estabilització tartàrica per fred i filtració. El gust del vi depèn de l'harmonia entre l'acidesa, l'alcohol i els tanins. Per simplificar, podem dir que en els vins blancs es busca la frescor i en els vins negres la calidesa. Les aromes són una part important de les qualitats que pot tenir el vi; quan hi ha una olor desagradable diem que el vi té un defecte.

Diversos treballs anteriors s'han interessat pels defectes en begudes alcohòliques, en cervesa (Brenner et al. 1953, Sinclair et al. 1969, Wainwright 1972, Leppanen et al. 1979, Nagami et al. 1980, Anness 1981, Seaton et al. 1981, Stewart i Russell 1981, Drozd et al. 1990) i en vi (Thoukis i Stern 1962, Eschenbruch 1974, de Mora et al. 1986). Es conclou que hi ha compostos de sofre en concentracions traça formats durant la fermentació que poden tenir un impacte sensorial negatiu.

1.3 Defectes actuals i reptes de futur

El vi és un producte natural perquè prové del raïm i de la fermentació per part dels llevats. Però, de la mateixa manera, si no s'hi fan els tractaments adequats, es tornarà vinagre. El vi segueix evolucionant durant el temps de cria, que aporta aromes i suavitza els vins, però actualment es valoren més els vins joves amb aromes de la fermentació i el raïm. Amb aquest objectiu, el vi s'embotella més aviat i, si hi ha aromes negatius formats durant la fermentació, sortiran en el vi (Descout 1991). Un altre factor és el tipus de tapat, quan es tapen les ampolles amb taps de rosca, que permet menys entrada d'oxigen en el vi, si hi ha compostos de sofre volàtils, hi ha més possibilitats de conservar-les que amb un tap de suro. Per tant, el repte actual és evitar, fins on sigui possible, els defectes com els compostos de sofre i els seus precursors en el vi durant la fermentació i elaboració.

Segons un recent estudi en vins presentats a concursos (Goode et al 2008), els defectes més freqüents en el vi embotellat són, els següents:

Atribuïts al suro (1.8%)

Atribuïts als llevats *Brettanomyces* (0.75%)

Atribuïts a l'oxidació (1.2%)

Atribuïts a la reducció (1.8%)

El defecte atribuït al suro està associat principalment al tricloranisol (TCA). Actualment es fan controls més rigorosos de les etapes de fabricació dels taps i estan disminuint aquests casos. També es fan servir alternatives al suro com taps sintètics i metàl·lics dels que s'estan seguint les característiques.

L'olor relacionada amb el *Brettanomyces* s'està estudiant tant en la quantificació de les contaminacions, com en la mesura dels fenols volàtils: Etil fenol i Vinil fenol. El nostre equip també ha treballat sobre la detecció i identificació d'aquest llevat contaminant (Puig, A. et al. 2007) En alguns casos els defectes tenen sinèrgies; en casos de contaminació per *Brettanomyces*, els etil fenols formats (perceptibles a partir de 450µg/L) potencien notes vegetals i de reducció. En boca també donen notes metàl·liques, aspres i àcides. Normalment es desenvolupen durant la cria.

L'oxidació és un caràcter més general que, normalment, s'evidencia per una pèrdua d'aroma fresc i un augment del color groc. Està relacionat amb una exposició del vi a l'oxigen, temperatures excessives i poca protecció amb diòxid de sofre.

L'acidesa volàtil elevada, conseqüència de l'àcid acètic, és un defecte que es pot analitzar a la majoria de cellers. Majoritàriament, prové de l'activitat dels bacteris acètics en presència d'oxigen; podríem dir que és un problema conegut i la majoria d'enòlegs saben com evitar-ho, limitant l'exposició a l'aire, una temperatura baixa i protegint el vi.

La reducció és com s'anomena, a la indústria del vi, l'efecte sensorial conjunt d'un seguit de compostos de sofre volàtils entre els quals hi ha el sulfur d'hidrogen o sulfhídric, disulfurs, tiols. És un defecte més complex per les seves diverses causes, dificultat de mesura i possible tractament. Els compostos de sofre són, majoritàriament, negatius per l'aroma del vi com els tiols, però també n'hi ha de positius i els anomenem aromes tioliques, típiques d'alguna varietat com el Sauvignon blanc. Les olors de reducció es poden donar en el vi mentre fermenta, mentre es troba sobre els sediments, i en les aigües dins o fora del celler.



Fig.1.3 Compostos de sofre volàtils descrits en vins i productes associats

La possibilitat de mesurar els defectes en els cellers és molt desigual. L'àcid acètic o acidesa volàtil, s'analitza per destil·lació; moltes empreses del sector tenen equips per fer aquesta anàlisi coneguda des de fa més de seixanta anys (Guasch, J. 2007). En canvi, l'olor a quadra o fenol, s'analitza per cromatografia de gasos dels 4 etil fenol i altres semblants i només alguns cellers i laboratoris poden fer aquesta anàlisi. L'anàlisi dels sulfurs requereix cromatografia i detectors específics com el fotomètric de flama

o quimioluminescència, que encara són menys habituals en cellers, laboratoris i només es troben en alguns centres de recerca. Això ha fet que l'estudi de la presència i causes d'aquests compostos hagi estat limitada per les dificultats que presenta.

La producció de compostos de sofre com el sulfhídric i tiols, continua sent un problema poc conegut. En aquest cas no hi ha un sistema d'anàlisi fiable en quasi cap celler, i a tot el món són pocs els laboratoris que tenen l'equip i personal necessari per analitzar-los. No té un origen únic i, per tant, podem dir que és un problema latent i els enòlegs no sempre saben com evitar-ho. Per altra banda, és un problema persistent i negatiu per molts consumidors i crítics de vi. El primer problema que tenim amb els compostos de sofre és que redueixen les aromes positives del vins, com les notes de fruita i altres aromes.

Entre els compostos de sofre volàtils també n'hi ha que són positius o característics d'alguna varietat; en el primer cas tenim el sulfur de dimetil que, en baixes concentracions, té una aroma dolça. Del segon tipus són les mercapto pentanones que estan glucosilades en el raïm Sauvignon blanc (Tominaga et al. 1998) i altres, i algunes soques de llevat els hidrolitzen i revelen l'olor de fruita tropical i vegetal.

1.4 Compostos de sofre volàtils

Com tots els organismes, els llevats necessiten sofre pel seu metabolisme i l'utilitzen durant l'etapa de multiplicació cel·lular. Segons la composició del most i el tipus de llevat es poden formar alguns compostos de sofre d'olor desagradable com H_2S , tiols i disulfurs.

S'anomenen compostos de sofre volàtils lleugers els que tenen un punt d'ebullició per sota $90^\circ C$: Sulfur d'hidrogen, metà tiol, età tiol, disulfur de dimetil, disulfur de dietil (amb olors desagradables de goma), sulfur de dimetil (té una olor dolça, de pèsol cuit, o moresc cuit o de marisc segons la concentració i sinèrgies). Els compostos de sofre volàtil pesats són els que tenen un punt d'ebullició més alt de $90^\circ C$, com el metionol. En aquest treball s'analitzen principalment els compostos de sofre volàtils lleugers.

Els compostos de sofre volàtils han estat un problema en el vi al llarg del temps. El vi, quan acaba de fermentar, ve d'unes condicions amb poc oxigen. Si no es protegeix de l'aire, s'oxidarà i els bacteris acètics el convertiran en vinagre. Si el mantenim tancat amb els sediments, es formaran compostos de sofre durant la degradació dels sediments. L'equilibri és delicat i les pràctiques enològiques recomanen separar el vi dels sediments per evitar males olors i afegir diòxid de sofre per evitar oxidacions. La química del sofre és complexa perquè és un element molt reactiu, el trobem amb diverses valències i equilibris en el most i en el vi. Els factors vitícoles i enològics creen moltes interaccions. Si tenim un vi amb compostos de sofre, les accions correctives són limitades. La tendència cap a vins més afruitats, joves, elaborats en condicions més reductores i amb tap de rosca poden afavorir que al consumidor li arribi un vi amb compostos de sofre indesitjats.

Del centenar de compostos de sofre identificats en el vi, una desena són els que s'han associat amb defectes quan estan per sobre el seu llindar de detecció. Són molècules curtes, de pes molecular lleuger, formades per un sofre i un hidrogen i anomenats tiols, sulfhidril o mercaptà, que vol dir *mercurius captans* perquè reaccionen amb el mercuri i altres metalls. Els tiols són més volàtils que els alcohols corresponents, més àcids i menys miscibles en aigua. Molts tiols tenen olors desagradables i persistents. Els tiols, en concret l'età tiol i similars, es fan servir per donar olor al gas per a facilitar les deteccions de les fugues per l'olfacte. Altres tiols poden ser agradables com el que dona olor a l'aranja, un tiol mono terpenoide. Els tiols per oxidació donen disulfurs que poden ser més difícils d'eliminar (Bovet et al. 1990).

El grup tiol és important en biologia perquè és la part funcional de la cisteïna. Quan en una proteïna hi ha dues cisteïnes, es poden acostar i, en condicions oxidants, unir-se i formar cistina que té el pont disulfur i pot contribuir a l'estructura terciària si és dins la mateixa proteïna o a l'estructura quaternària si són dues proteïnes diferents. El grup tiol participa en molts mecanismes bioquímics i, en l'aspecte sensorial, el pont disulfur es proposa com un dels mecanismes del reconeixement de les olors (Turin, L. 1996).

El sulfur d'hidrogen es produeix en els llevats durant el metabolisme, *Saccharomyces* pot utilitzar els sulfats, sulfits, tiosulfats, cisteïna, metionina, homocisteïna i S-adenosil metionina (Hartnell i Spedding 1979, Startford i Rose 1985, Yoshimoto i Sato 1968, Del Cupolo i Zambonelli 1973). La reducció del sulfat es fa mitjançant cinc enzims. Després d'entrar a la cèl·lula a través d'una sulfat permeasa. El segon pas, amb ATP sulfurilasa es forma adenosin 5' fosfosulfat (APS). En un tercer pas APS kinasa catalitza la formació de 3'fosfoadenosin 5'fosfosulfat (PAPS). En quart lloc PAPS reductasa forma sulfit. En cinquè lloc els enzims sulfit reductasa catalitzen la reducció de sis electrons fins a sulfur (Boulton et al.1996). El sulfur es transfereix a O-acetil homo serina per fer homo cisteïna. La teoria més acceptada per a la formació de H₂S per part dels llevats és un excés entre la reducció de sulfat o sulfit i la disponibilitat de O-acetil homo serina per formar homo cisteïna (Bidan i Collon 1985).

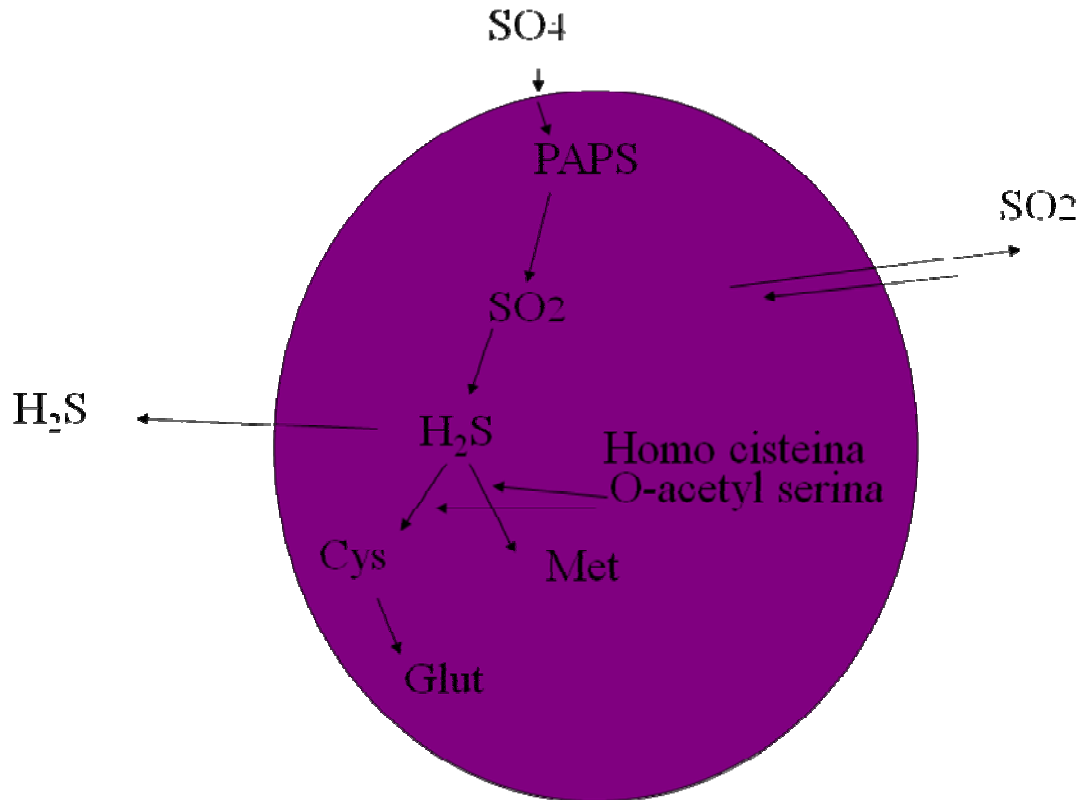


Fig.1. 4 Reducció del sofre des de sulfat a sulfur

La utilització d'una o altra font de sofre depèn de la composició del most. La metionina reprimeix la síntesi de sulfat permeasa i enzims de reducció del sulfat. Si hi ha sulfid, habitualment addicionat al most, entra a la cèl·lula per simple difusió. Si hi ha un excés de sulfur que no és utilitzat pel llevat, es difon en el medi i queda en el vi. En les fases finals de la fermentació els llevats van morint i al degradar-se, també es forma sulfur d'hidrogen a partir dels aminoàcids que contenen sofre. El sulfur d'hidrogen és un dels compostos de sofre volàtils més habituals durant la fermentació, però la majoria es dissipa amb el diòxid de carboni. Si en queda en el vi, pot ser un problema en si mateix i pels altres compostos que es poden formar.

Alguns tiols volàtils també es troben amb certa freqüència en el vi, tenen unes olors entre al·liàcia i de claveguera. Poden formar-se alhora que el sulfur d'hidrogen o al cap d'un temps. El metà tiol o metil mercaptà és més freqüent en vins amb defectes. L'età tiol o etil mercaptà és menys freqüent. Si només es fa un tractament amb aire, es poden formar disulfurs i reduir temporalment el defecte; però si el vi torna a estar en condicions reductores, poden formar-se una altra vegada els tiols.

Els disulfurs es troben en vins però, habitualment, per sota els llindars. Poden ser un problema si el vi torna a les condicions reductores. Els tractaments amb coure no acostumen a reduir el problema del disulfurs.

El sulfur de dimetil es troba a la majoria dels vins i potser derivat dels aminoàcids del raïm o del llevat. No té perquè estar relacionat amb la formació de sulfur d'hidrogen.

És un exemple de compost que, a baixes concentracions, dóna olors agradables afruitades i de complexitat positiva. A més concentració, que es pot desenvolupar amb el temps, apareixen notes de verdura cuita o espàrrecs. Per sobre de 30 o 50 µg/L pot donar notes de col bullida.

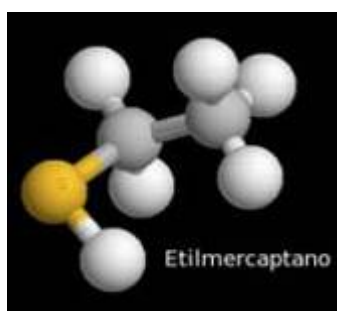


Fig. 1.5 Model del età tiol

Taula 1.1 Compostos amb sofre, aromes associades i llindars de percepció

2-Metil-3-tiofanona	molla de pa	0,1-1,0 µg/L
Sulfur d'etil	All	15-18 µg/L
Sulfur de dimetil	Oliva, verdura en llauna	1,4-8,5 µg/L
Disulfur de dimetil	Goma	30 µg/L
Disulfur de dietil	ceba, cautxú	40 µg/L
Metà tiol	podrit	0,3 µg/L
Età tiol	ceba, gas, all	1.1 µg/L
Mercapto etanol	corral, galliner	1-10 µg/L

4Mercapto Metil pentanona	boix	5 ng/L
Mercapto Hexanol	aranja	0.08 ng/L
Acetat Mercapto Hexil	fruita de la passió	4 ng/L
3-Metil-Sulfanil-propà	patata crua, tubercle	1 mg/L
2-Metil-sulfanil-etanol	mongeta verda	1-10 mg/L
Metionol	coliflor, col cuita	3,2-4,5 mg/L
Acetat de tio-metil	vegetals podrits, formatge	10-40 µg/L
Acetat de tio-etil	cremat, sulfurat	10-30 µg/L
Acetat de metil-sulfanol-propil	all, xampinyó	100-115 µg/L

(adaptat de Goniak 1987, Descout 1991 i A. Palacios, Lab. Excell Ibérica).

Taula 1.2 Compostos volàtils lleugers estudiats en aquest treball

Compost	Fórmula	Descripció	Llindar de percepció
Sulfur d'hidrogen	H ₂ S	Ou dur, ou podrit	100µg/L
Sulfur de dimetil (DMS)	(CH ₃) ₂ S	Espàrrecs en llauna	5-25 µg/L
Metà tiol (Me SH)	CH ₃ -SH	Podrit	0.3-2 µg/L
Età tiol(Et SH)	CH ₃ -CH-SH	Gas, ceba	1.1 µg/L
Disulfur de dimetil (DMDS)	CH ₃ -S-S-CH ₃	Goma cremada	30 µg/L
Disulfur de dietil (DEDS)	CH ₃ -CH-S-S-CH-CH ₃	Ceba, sofre cremat	40 µg/L

El sulfur d'hidrogen és el més volàtil i fàcil d'eliminar del vi, però pot reaccionar i formar diversos tiols, com el metà tiol o l'età tiol, més persistents. Aquests, per oxidació, donen disulfurs com el dimetil disulfur o el dietil disulfur, persistents i més difícils d'eliminar però amb llindars de detecció més baixos. El diòxid de sofre i les condicions reductores dins l'ampolla, poden tornar el disulfurs en tiols creant un defecte on aparentment no n'hi havia. Els tioacetats també poden formar tiols. Eliminar aquests compostos del vi és complicat i la millor cura és la prevenció.

En una revisió de moltes soques víniques (Linderholm 2008), en varen trobar una que no produïa sulfur d'hidrogen en la majoria de condicions. Després d'estudiar el seu genoma, es va veure que tenien una mutació de la base 1985(C-A) al gen MET10, aquest porta al canvi d'una treonina per una lisina en l'aminoàcid 662 que estaria en l'enzim sulfur reductasa i el deixaria inactiu. (Linderholm, A.L. et al 2008)

Factors de formació

Els factors que s'han descrit per a la formació de compostos de sofre volàtils en els vins són la soca de llevat (Rankine 1964, Acree et al. 1972, Thomas et al.1993, Zambonelli et al. 1984), la manca de nutrients en el most (Vos i Gray 1979, Jiranek et al. 1995), restes de pesticides (Schutz i Kunkee 1977, Rauhut 1993), deficiència d'àcid pantotènic (Tokuyama 1973) o piridoxina (Wainwright 1971), excés de cations metàl·lics com coure (Boulton et al. 1996) i excés de sulfit (Muller-Spath 1978, O'Connor 1986). La diversitat de factors fa que encara quedin molts aspectes per a preveure o evitar la formació de compostos de sofre volàtils durant la fermentació vínica.

Degradació de pesticides: Els productes amb sofre utilitzats a la vinya són: el sofre elemental en diferents formulacions (pols, micronitzat, mullable) utilitzat contra l'oïdi, dosis aplicades fins 240 kg/ ha. Es recomana no tractar amb sofre les darreres sis setmanes de maduració o a partir del verol (Boulton et al. 1996). Altres fungicides utilitzats són: el metomil (carbamat) que es pot degradar en H₂S, metà tiol, età tiol, sulfur de dietil i disulfur de metil i Tiram (ditiocarbamat) que es pot degradar en CS, H₂S, disulfur de metil, acefat (organo tiofosforat) (Rauhut 1993, Marais i Kruger 1976). Per evitar aquest origen, es proposa evitar els pesticides sintètics i cercar alternatives al sofre en la fase de maduració del raïm.

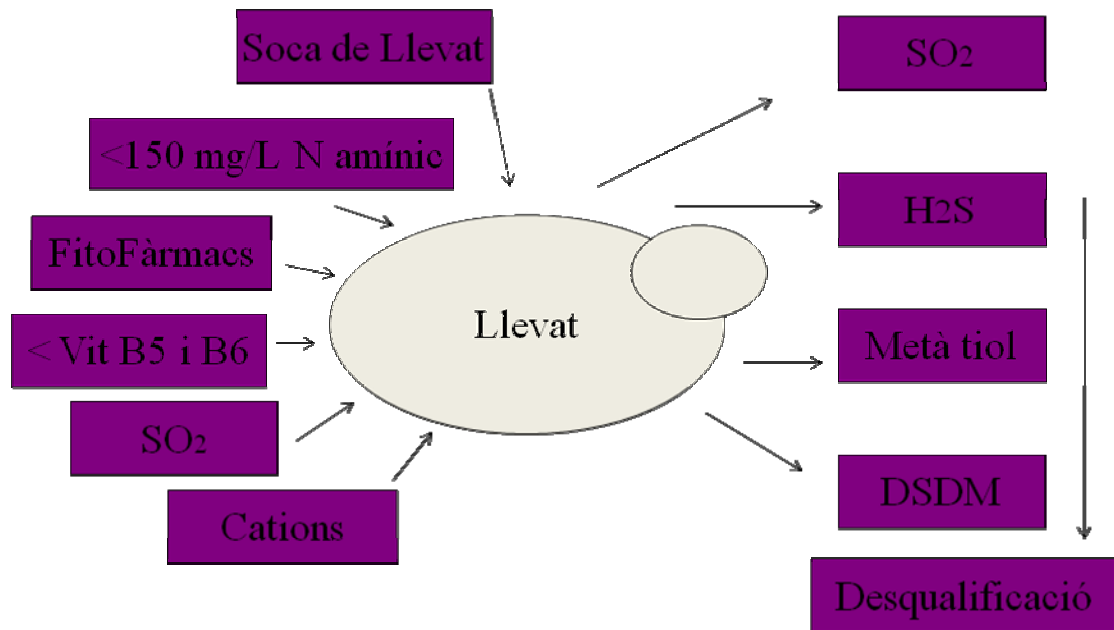


Fig. 1.6 Factors de formació de compostos de sofre volàtils en els llevats

1.5 Anàlisi dels compostos de sofre en el vi

Els mètodes analítics per als compostos de sofre volàtil es poden classificar en colorimètrics, cromatogràfics, i sensorials. Cada un d'ells té els seus avantatges i inconvenients, que es resumeixen a continuació.

1.5.1 Mètodes instrumentals.

- Mètodes colorimètrics. S'utilitza l'enfosquiment de metalls pesats com ara paper o columnes d'acetat de plom per a H_2S , formació de blau de metilè i ús de sals de mercuri per a tiols (Rankine 1963, Ruiz-Hernández, Kumar 2010). El punt més feble d'aquest mètode és la falta d'especificitat i de precisió, els metalls reaccionen a una família de compostos amb diferents propietats sensorials i, a més a més, l'evolució del color també depèn de les condicions a la matriu com ara el pH. Altres mètodes colorimètrics tenen poca sensibilitat i especificitat. Utilitzen la formació de blau de metilè a partir de la p-Aminodimetil anilina i de H_2S (Brenner i Owades 1953), els tiols els obtenien per destil·lació i reducció a H_2S . Un altre mètode provat va ser l'elèctrode d'ions de sofre selectius però va resultar difícil d'estandarditzar a les condicions del vi (Schutz i Kunkel 1977, Viñegra 1992).

- Mètodes cromatogràfics. Les tècniques cromatogràfiques, en un principi, utilitzaven els detectors d'ionització de flama (FID), però hi havia problemes de detecció a causa de la manca d'especificitat del detector. La disponibilitat del detector fotomètric de flama (FPD) va suposar un pas molt important envers estudis molt més precisos sobre els compostos de sofre volàtil, gràcies a la seva gran especificitat de sofre al seu mode

de sofre amb filtre de 395 nm (Hall 1974, Schiller i Bronsky 1977, Feeney et al. 1983, Vanderstraeten et al. 1988).

La preparació de mostres i la selecció de columnes també són molt importants. S'han fet estudis anteriors amb columnes empaquetades de metall amb uns artefactes deguts a l'absorció i reaccions entre metalls i compostos de sofre. En aquest sentit, el contacte del metall amb la mostra ha de ser el més reduït possible durant tot el procés d'anàlisi: preparació de mostres, injector, columna, detector i ajustament. Les columnes de vidre i de tefló solucionen el contacte del metall a les columnes empaquetades. Més recentment s'han fet servir columnes capil·lars amb i sense cryofocusing. Les tècniques de preparació de mostres inclouen recollida de compostos volàtils amb nitrogen, separació en columnes fredes, absorció en polímers porosos i anàlisi directe de l'espai de cap. La mostra en si mateixa, es pot modificar mitjançant canvis de temperatura, del pH, etc. El detector de quimioluminescència de sofre (SCD) mostra gran sensibilitat, resposta lineal, no necessita refredament ràpid i té resposta quasi equimolar a diferents tipus de compostos de sofre (Shearer et al.1990). Una revisió de la Universitat Rovira i Virgili (Mestres et al. 2000), explica els avantatges i defectes dels detectors més usats. Un dels mètodes més adequats per a l'anàlisi dels compostos de sofre volàtil és la cromatografia de gasos amb detector selectiu (GC-FPD) d'espai de cap, però per a la separació de compostos altament volàtils, com ara l'H₂S i l'SO₂ s'ha d'optimitzar el conjunt de columna i temperatures.

1.5.2 Anàlisi sensorial

En l'estudi de l'aroma del sofre volàtil (Goniak 1987, Peppard 1985), cal tenir especialment en compte els mètodes sensorials. Tot seguit se'n descriuen les característiques principals:

Avantatges:

És la millor estimació de la percepció humana o acceptabilitat.

Pot ser molt sensible a alguns compostos amb llindars baixos

Si el realitzen jutges amb formació, és un mètode relativament ràpid.

Desavantatges :

No és específic, pot ser que inclogui compostos que no són de sofre

No és específic entre els compostos de sofre, molts compostos poden tenir descriptors molt semblants

Requereix jutges amb formació i hi pot haver diferències entre els jutges (cansament, etc.)

Només es mesuren quantitats per sobre del valor llindar

Els compostos ocults poden evolucionar i poden donar compostos amb mala olor amb el temps.

Per a l'anàlisi sensorial del compostos de sofre volàtils es necessita un panell de tast de 8 o més persones entrenades, un entorn adequat, una sala de tast amb cabines individuals, copes normalitzades amb tapa. Per fer una primera aproximació als possibles compostos s'ha fet servir la Roda d'aromes publicada per Ann Noble i traduïda per l'Associació Catalana d'Enòlegs i la Roda d'aromes del vi escumós.

A la roda d'aromes hi ha tres nivells:

El primer nivell amb uns termes genèrics: fruita, vegetals i entre ells hi ha les olors químiques.

En el segon nivell podem triar el grup d'aromes relacionades amb el sofre.

En els tercer nivell podem identificar, en alguns casos les olor de sulfur d'hidrogen, llumí cremat, col, all, goma, llana mullada, mofeta, guineu i mercaptà (gas).

Per un entrenament i millor identificació els compostos necessitem patrons. Els patrons s'han de diluir per arribar a les concentracions que permetin identificar el compost, però que no siguin molt més altes que les que trobem en el vi i que no produeixin fatiga o toxicitat en els tastadors. També es poden encarregar els patrons diluïts per evitar la manipulació perillosa i molesta dels compostos concentrats que són particularment nauseabunds i persistents.

1.6 Microbiologia enològica

Al 1876, Louis Pasteur va demostrar que els llevats eren responsables de la fermentació alcohòlica i també va apuntar "El gust i propietats del vi poden dependre de l'especial natura del llevats que es desenvolupen durant la fermentació". De les 500 espècies de llevats que es coneixen, unes 15 tenen importància en enologia. L'objectiu de la fermentació alcohòlica, normalment, és el d'arribar a transformar més del 98% del sucre en etanol, diòxid de carboni i els altres productes minoritaris però fonamentals per a la qualitat del vi. Habitualment, la fermentació s'ha de regular amb control de la temperatura per evitar que sigui massa ràpida o massa lenta. Quan en condicions normals no hi ha fermentació a un ritme normal, parlem de fermentació lenta o aturada de fermentació. S'anomenen fermentacions lentes les que duren més de 25-55 dies amb un sucre inicial de 150-240 g/L respectivament, i fermentacions aturades les que duren més de 55-85 dies o bé si queda més de 5-20 g/L de sucre.

Taula 1.3 Grups de microorganismes importants en enologia

Grup	Importància en enologia
Llevats	fermentació alcohòlica (FA) inestabilitat microbiològica autòlisi
Llevats killer	avantatge per a la implantació control de llevats sensibles causa d'aturada de fermentació
Bacteris làctics	fermentació màlic làctia (ML) inestabilitat microbiològica
Bacteris acètics	inestabilitat microbiològica aturada de fermentacions
Fongs filamentosos	vins amb <i>Botrytis</i> inestabilitat microbiològica defectes del suro TCA
Altres bacteris: <i>Bacillus</i>	inestabilitat microbiològica
<i>Actinomyces</i>	defectes d'aroma
Virus: Bacteriòfags	aturades de ML

Les implicacions comercials dels problemes durant la fermentació comencen per la poca eficiència en l'ús de les tines, però sobretot, per la situació de risc que es troba un vi amb sucre residual sense una població activa de llevats i risc de contaminacions que poden alterar el vi en poques hores.

La previsió de la fermentació depèn de les característiques dels llevats en aquell most. L'estabilitat genètica i fisiològica del cultiu inicial tenen una gran importància en el comportament i qualitat de vi. L'estabilitat fisiològica permet una ràpida colonització: viabilitat (%) i vitalitat (activitat metabòlica), adaptació (resistència a l'estrès) i començament ràpid de la fermentació alcohòlica (FA).

Factors favorables per a la fermentació alcohòlica:

Disponibilitat de nutrients: sucres, nitrogen, oxigen, vitamines, minerals, ergosterol, àcids grassos insaturats (Carrau et al. 2008, Ferrari 2002, Ugliano et al. 2009, Vilanova et al. 2007)

Resistència a inhibidors: etanol, àcid acètic, àcids grassos, diòxid de sofre, fitoalexines, micotoxines, toxines bacterianes, pesticides, fungicides, Cu.

Condicions: temperatura, pH, agitació, pressió osmòtica. Els sensors de la cèl·lula estan a la superfície, després els senyals són transmesos als centres d'adaptació que generen una resposta amb l'expressió d'uns gens o altres.

L'objectiu és aconseguir una fermentació regular i eficient, l'absència de males olors o gustos, i evitar fermentacions difícils o lentes.

Fermentació del cava

L'elaboració del cava és un procés microbiològic i industrial que es desenvolupa en dues fases fermentatives. A la primera fase, els llevats transformen el most en vi base en tancs amb temperatura controlada al voltant dels 16°C. Després de finalitzar la fermentació s'ha de clarificar el vi, estabilitzar-lo per fred i filtrar, per obtenir un vi base. La segona fase comença amb l'ompliment d'ampolles o tiratge del vi base, al que s'hi afegeixen uns 25 g/L de sacarosa i una sembra d'un milió de llevats actius per mil·lilitre de vi; s'hi afegeix un clarificant com ara la bentonita. Aquesta fase es realitza a la mateixa ampolla que arribarà al consumidor; una ampolla que ha de resistir fins 10 bar de pressió interior, ja que durant la segona fermentació tot el diòxid de carboni produït pels llevats al fermentar els 25 g/L de sucre, van incrementant la pressió fins un 7 o 8 bar. Després de la segona fermentació, que dura entre una setmana i un mes, el vi ha de fer una criança mínima de nou mesos entre ompliment i desgorjament, de quinze mesos en els reserva i de trenta mesos en els gran reserva. Abans del desgorjament, s'ha de fer el remogut, fent moviments giratoris a les ampolles i augmentant el seu pendent cap al tap fins arribar a tenir les ampolles en punta amb tot el sediment recollit al costat del tap. El desgorjament consisteix en destapar l'ampolla en posició invertida, deixar que surti el sediment i tornar a posar l'ampolla dreta evitant la pèrdua del vi. Per a facilitar aquesta operació, normalment es fa una congelació d'una petita part de vi que està a prop del sediment. A continuació es reomple per aconseguir un volum uniforme a totes les ampolles i s'afegeix el licor d'expedició que té una mica de diòxid de sofre com antioxidant i sucre si volem que el cava sigui sec, semisec o dolç.

Els factors de selecció dels llevats per a cava són: resistència a l'etanol, bona floculació o formació de grumolls i producció d'aromes agradables. Quan un enòleg ha decidit quina soca farà servir en una segona fermentació, espera que les característiques del llevat es conservin. Tenint en compte que en un peu de cup hi pot

haver moltes generacions, un tret important de les soques utilitzades és que siguin estables. (Bartra, 1985, Carro et al. 2003) Veure annexos Bartra i Carro et al.

Soques de llevat víniques

El protagonista de les fermentacions víniques és el llevat *Saccharomyces cerevisiae*. El most no és un medi estèril i en fermentacions víniques s'ha descrit la presència d'altres llevats dels gèneres *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Candida*, *Metschnikovia*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, i *Brettanomyces*. A mesura que avança la fermentació i augmenta la concentració d'etanol, les soques víniques de *Saccharomyces cerevisiae* es van imposant. De tota manera, el fet que altres llevats o soques es desenvolupin en el most inicialment, fa que alguns nutrients es puguin haver consumit.

Des de la dècada de 1970, es comercialitzen soques de llevat *Saccharomyces cerevisiae* per als cellers en forma de llevat sec actiu (LSA) i actualment la majoria d'enòlegs les inoculen als mostos per motius econòmics i de tipus pràctic. Hi ha una minoria de cellers que deixen les fermentacions sense inocular i alguns fan la seva pròpia selecció. A la indústria dels llevats enològics hi participen poques empreses fabricants que tenen desenes de referències. A vegades l'enòleg té dificultats en la tria de la soca, es basa en la pròpia experiència i en la informació tècnica o comercial que li arribi. Un altre tema és la estabilitat que tenen les soques utilitzades.

Saccharomyces és un gènere de llevats ascomicet, família *Saccharomycetaceae*.

Aquesta família inclou el grup *Saccharomyces sensu stricto* (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus* i *S. pasteurianus*), *Saccharomyces bailii*, *S. rosei*, *S. diastaticus* i d'altres que, entre ells tenen de 50 a 70% d'homologia de seqüència. Les cèl·lules vegetatives de *Saccharomyces* són ovalades, no formen filaments i molt rarament pseudohifes, predominantment diploides o poliploides i es reproduïxen per gemmació multilateral. Típicament donen lloc a espores amb forma de tetraedre amb quatre ascis al seu interior. La majoria de soques d'aquest gènere poden utilitzar D-glucosa, D-fructosa i D-mannosa, i D-galactosa com a font de carboni però no lactosa. No poden utilitzar pentoses o polisacàrids (excepte *S. diastaticus*), ni utilitzar nitrats, ni urea, com a font de nitrogen. En el sistema de transport d'electrons utilitzen el coenzim ubiquinona Q6 (Barnett, J.A. et al 1992).

En condicions òptimes, una cèl·lula de *S. cerevisiae* es pot dividir en 90 minuts. La gemma es pot formar a qualsevol lloc de la superfície de la cèl·lula mare excepte en els llocs on s'han format altres gemmes prèviament, on hi deixen una cicatriu. En condicions de falta de nitrogen, les cèl·lules diploides entren en meïosi i formen espores. Al germinar cada una de les quatre espores donen cèl·lules haploides, de dos tipus de conjugació diferents dues a, i dues x, que es poden reproduir de forma vegetativa. Cèl·lules haploides de diferent tipus de conjugació es poden fusionar per donar lloc a una nova cèl·lula diploide, tancant així el cicle. Existeixen dos grans grups de soques de *Saccharomyces cerevisiae* segons la seva capacitat de diploidització. A les soques heterotàliques, les cèl·lules a o x es mantenen així indefinidament, creixent

vegetativament i donant colònies amb totes les cèl·lules haploides i d'un mateix tipus de conjugació. En canvi les cèl·lules de soques homotàliques donen cèl·lules filles d'ambdós tipus de conjugació; com a conseqüència les cèl·lules d'un mateix clon es conjuguen entre si, donant lloc a cèl·lules diploides que desplacen a les haploides degut al seu creixement més ràpid.

La dotació haploide de *Saccharomyces cerevisiae* conté entre 13 i 14 Mb de DNA nuclear repartit entre 16 cromosomes que tenen entre 230 i 2200 Kb. El més gran és el cromosoma XII, que conté un nombre variable (entre 1 i 20) de còpies de DNA ribosòmic de 9 Kb cada una. El genoma de *S. cerevisiae* està totalment seqüenciat i anotat, amb més de 6000 ORF www.yeastgenome.org i és, de llarg, l'eucariota del que es tenen més dades genòmiques i funcionals, encara que es desconeix la funció de entre un terç i un quart dels seus gens. És un genoma compacte per tenir poques seqüències de DNA repetitiu i pocs introns. Les soques de laboratori són generalment haploides heterotàliques, però les industrials poden ser diploides, aneuploides o poliploides. La presència de cromosomes extres a les soques industrials s'ha correlacionat amb una millor capacitat fermentativa; de la mateixa manera que l'heterozigosi, molt comú a aquestes soques, també hi contribueix. (Pretorius, I. 2000). Ambdues característiques fan que les soques industrials siguin en general difícils d'esporejar i que donin, amb freqüència, espores no viables.

A part de DNA nuclear, les cèl·lules de *S. cerevisiae* presenten diverses còpies (de desenes a centenars) de DNA mitocondrial (mtDNA), una molècula circular de 75 kb que codifica pels sistemes de transcripció i traducció propis dels mitocondris, a més d'alguns elements de la cadena de transport electrònic. *S. cerevisiae* és un anaerobi facultatiu que pot viure sense mtDNA, encara que les cèl·lules amb el DNA no funcional o absent (ρ o ρ^0 respectivament) globalment conegudes com a *petite*, creixen molt lentament i no tenen interès industrial ni vinater. El mtDNA mostra un elevat grau de polimorfisme entre diverses soques que s'utilitza per a la seva identificació molecular. *S. cerevisiae* també presenta dos elements genètics no mendelians, el plasmidi 2 μ m, una molècula de DNA circular amb 50 o 100 còpies per cèl·lula i de la qual no es coneix cap funcionalitat, i els factors killer, codificats per un pseudovirus no infectiu de dsRNA. Les soques que tenen aquest factor secreten una proteïna, el factor *killer*, que és tòxic per aquelles que no el tenen; per tant es parla de soques immunes o neutres, o bé soques killer. Les que no el tenen es denominen soques sensibles. Hi ha uns cinc tipus de plasmidis killer, entre les soques víniques els més freqüents són els K2 i K28. (Watson, T. G. 1969)

Per a la identificació de soques de *Saccharomyces* es poden fer servir mètodes metabòlics però resulten llargs i, a vegades, dubtosos. Actualment, un dels mètodes més utilitzat per a distingir soques de *S. cerevisiae* és el RFLP del mtDNA (Querol, A. et al 1992), en el qual el DNA total es digereix amb nucleases que reconeixen quatre bases i que incloguin C/G a la seva seqüència de reconeixement (*HinfI*, *RsaI*, *TaqI*, *DdeI*). D'aquesta manera, el mtDNA queda en bandes discretes mentre que el DNA nuclear és digerit en fragments molt menors al ser més ric en bases C/G. Altres formes

de diferenciar soques de *S. cerevisiae* és el cariotipat per electroforesi en camp polsant (encara que és relativament lent i requereix molta mà d'obra), i l'anàlisi del DNA ribosomal, concretament les seqüències anomenades ITS (*internal transcribed spacers*) o NTS (*nontranscribed spacers*) (Esteve-Zarzoso, B. Et al 1999). Els mètodes d'ampliació de seqüències a l'atzar per PCR (RAPDs) o la de seqüències delta són considerades difícils de reproduir entre diferents laboratoris (Fernández-Espinar, M.T. et al 2001). *Saccharomyces cerevisiae* ha estat el primer eucariota seqüenciat (Goniak, O.J. et al 1987) i ha permès el desenvolupament de matrius, arrays o xips de DNA amb tots els més de 6000 ORF del genoma. Això permet estudiar les característiques d'una soca en plena activitat. Encara hi ha mancances en el coneixement del genoma i el metabolisme associat, però l'avantatge és que *S.cerevisiae* és un organisme que s'estudia com a model a més de les seves aplicacions industrials. Comparant soques de laboratori i una soca vínica s'han vist canvis cromosòmics, en particular en el cromosoma VIII (Pérez-Ortín, J.E. et al 2002). Les soques de laboratori no estan adaptades a les condicions industrials i per tant és preferible fer estudis amb soques víniques en condicions que reproduïxen la situació real. La utilització de sulfits en el most, la manca de nitrogen, les temperatures de fermentació al voltant de 16°C, els sucres inicials elevats, són condicionants que s'han de tenir en compte per explicar el comportament d'una soca vínica.

2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball ha estat conèixer i evitar els defectes derivats dels compostos de sofre volàtils produïts pels llevats, i millorar les aromes dels vins.

En concret, els objectius més detallats han estat:

1. Anàlisi dels compostos de sofre volàtils a concentracions traça en vins
2. Anàlisi dels compostos de sofre volàtils durant la fermentació
3. Comparació de la producció de H_2S en soques de llevat víniques
4. Identificar els determinants genètics de la producció de H_2S
5. Revisió d'aspectes vitícoles que puguin afectar als compostos de sofre volàtil
6. Tractaments de vins amb defectes de compostos de sofre
7. Descripció sensorial de vins i aromes tiòliques

3.RESULTATS

3.1 ANÀLISI DE COMPOSTOS DE SOFRE VOLÀTILS EN VINS

Alguns compostos de sofre volàtils poden ser l'origen d'aromes negatius per als vins. Per tal de identificar-los i quantificar-los, s'han descrit sensorialment i s'han analitzat, per cromatografia de gasos i detector específic de sofre, 77 vins que tenien defectes en l'aroma. Els vins eren mostres reals de cellers que havien detectat aquest problema i van participar en aquest estudi.

En un primer grup hi havia vins blancs de sis cellers sense identificar la varietat. Un tenia una aroma que recordava la goma cremada, un altra un llumí cremat i els altres tenien notes de reduït. En un s'observa que l'età tiol està per sobre del llindar (1.1 µg/L). En altres es van detectar altres compostos de sofre volàtil però estaven per sota el llindar de percepció. En un vi no es van detectar els compstos estudiats.

Taula 3.1 Concentració de compostos de sofre volàtil en vins blancs (µg/L) (en negreta, els que estan per sobre el llindar de percepció)

Varietat	Celler	Descriptors	MeSH	EtSH	DMS	DMDS	DEDS	Altres	> Llindar
Blanc	a	Reduït	0	0	0	0	0	0	0
Blanc	o	Reduït	0	3,5	1,5	0	0	0	1
Blanc	p	Reduït	0	0	0	0	9,4	0	0
Blanc	s	Goma cremada	0	0	0,5	0	0	0	0
Blanc	t	Llumí cremat	0	0	0,2	0	0	0	0
Blanc	v	Reduït	0	0,4	0,7	0	0	0	0

En una altra sèrie de vins blancs, n'hi havia de quatre varietats i provenien de sis cellers; a part del descriptor reduït, hi havia vins amb notes de sulfur, goma cremada i gos mullat. Es van trobar per sobre el llindar l'età tiol en cinc vins i el sulfur de dimetil en dos vins. Un vi tenia un compost no identificat i en un altre no es va trobar cap dels compostos estudiats. Cinc dels dotze vins tenien un o més compostos de sofre per sobre el llindar.

Taula 3.2 Concentració de compostos de sofre volàtil en vins blancs ($\mu\text{g/L}$) (en negreta els que estan per sobre el llindar de percepció)

Varietat	Celler	Descriptors	MeSH	EtSH	DMS	DMDS	DEDS	Altres	> Llindar
Chardonnay	c	Reduït	0	0	6,1	0	7,4	0,4	0
Chardonnay	k	Brut	0	0	6,2	0	0	0	0
Chardonnay	m	Sulfur	0	20,9	166	0	0	0	2
Chenin	s	Reduït	0	1,9	86,7	0	0	0	2
Sauvignon	f	sulfur /goma	0	0,2	0,1	0	0	0	0
Sauvignon	f	goma cremada	0	4,6	0	0	0	0	1
Sauvignon	f	goma cremada	0	0,3	0	0	0,8	0	0
Sauvignon	f	gos mullat	0	0	0	0	0	0	0
Sauvignon	f	gos mullat	0	6,1	0	0	0	0	1
Sauvignon	f	gos mullat	0	7,6	0	0	0	0	1
Sauvignon	k	sulfur	0	0	3,7	0	0	0	0
Tokay	j	sulfur	0	0,1	0	0	0	0	0

La següent sèrie eren vins blancs, per a vi base d'escumós, fets amb raïm negre, Pinot noir, d'un sol celler. En tots els vins analitzats es trobava una nota reduïda. En sis vins la concentració de metà tiol era superior al llindar ($0.3 \mu\text{g/L}$), en nou vins el età tiol estava per sobre dels llindars i en dos vins els sulfur de dimetil estava per sobre del llindar. Deu dels tretze vins tenien un o més compostos per sobre el llindar de percepció. Un vi tenia el metà tiol just al llindar però també es van mesurar età tiol i sulfur de dimetil, però tot i estar per sota del llindar, podien tenir un efecte additiu.

Taula 3.3 Concentració de compostos de sofre volàtil en vins blancs ($\mu\text{g/L}$) en negreta els que estan per sobre el llindar de percepció.

Varietat	Celler	Descriptors	MeSH	EtSH	DMS	DMDS	DEDS	Altres	> Llindar
Pinot noir	x	Reduït	0	0	2,9	0	0	0	0
Pinot noir	x	Reduït	0,4	0,7	2,3	0	3,3	0	1
Pinot noir	x	Reduït	0	1,9	1,5	0	14	0	2
Pinot noir	x	Reduït	3,9	1,7	10,9	0	0	0	2
Pinot noir	x	Reduït	0,8	3,4	29,5	0	0	0	2
Pinot noir	x	Reduït	0	1,9	3,6	0	0	0	1
Pinot noir	x	Reduït	0	0,2	0,4	0	0	0	0
Pinot noir	x	Reduït	0	7	2,2	0	0	0	1
Pinot noir	x	Reduït	0	2,2	27,1	0	0	0	2
Pinot noir	x	Reduït	0,8	4,5	1,9	0	0	0	2
Pinot noir	x	Reduït	4,8	2,9	10,2	0	19	41	3
Pinot noir	x	Reduït	1,1	3,7	2,6	0	1	0	2
Pinot noir	x	Reduït	0,3	0,2	5,4	0	0	0	0

La primera sèrie de vins negres eren d'un celler i d'una varietat, Cabernet sauvignon. Quatre vins estaven elaborats amb el llevat French Red, vuit amb el llevat Pasteur Champagne, dos amb Fermivin i en dos no hi havia constància del llevat utilitzat. Quatre vins estaven tractats amb sulfat de coure a 0.2 mg/L i dos amb dosis de 0.4 mg/L. Dotze vins tenien un aroma de reduït, dos d'ou podrit, un ou podrit i goma, i un d'espàrrecs. Dels 16 vins, 15 tenien età tiol per sobre del llindar de percepció. Un vi estava per sobre el llindar de percepció del sulfur de metil i tres vins tenien el DEDS per sobre del llindar. La majoria de vins tenien dos compostos de sofre per sobre el llindar. En tots els llevats es formen aquests compostos i el tractament amb sulfat de coure no resol el problema.

Taula 3.4 Concentració de compostos de sofre volàtil en vins negres de Cabernet sauvignon ($\mu\text{g/L}$), en negreta els que estan per sobre el llindar de percepció.

Llevat	Descriptors	Tractament	MeSH	EtSH	DMS	DMDS	DEDS	Altres	> Llindar
F Red	Reduït	0	0	7,2	13,5	0	32	0	2
P Champagne	Reduït	0	0	1,7	3,5	0	2,8	0	2
P Champagne	Ou podrit	0	0	1,8	3,1	0	86,6	9,1	2
P Champagne	Ou podrit	0	0	11,5	15,9	0	0	0	1
P Champagne	Reduït	0	0	5,4	4,3	0	10,9	0	2
F Red	Reduït	0,2	0	1,3	5,4	0	10,2	0	2
P Champagne	Ou podrit i goma	0,4	0	6,3	13	0	51,9	0	2
Fermivin	Reduït	0	0	3,3	4,9	0	13,3	0	2
Fermivin	Reduït	0,4	0	3,2	8,1	0	0	0	1
F Red	Reduït	0,2	0	5,2	11,4	0	14,2	0	2
P Champagne	Espàrrecs	0	0	1,7	12,9	0	0	0	1
P Champagne	Reduït	0,2	0	2,5	3,2	0	5	0	2
F Red	Reduït	0	0	2,3	7,2	0	0	0	1
P Champagne	Reduït	0	0	1	2,8	0	4,3	0	2
	Reduït	0	0	1,9	4,2	0	4,1	0	2
	Reduït	0,2	0	2	29,9	0	34	20	2

Una altra sèrie de vins negres eren de la varietat Cabernet sauvignon però de diferents cellers. Un dels vins estava tractat amb sulfat de coure a 0.6 mg/L. Les descripcions més freqüents van ser reduït i sulfur, en tres vins es van descriure l'olor a tiol. En dos vins es va trobar el metà tiol per sobre del llindar. En vuit vins es va trobar l'età tiol per sobre del llindar. En sis vins hi havia sulfur de metil per sobre del llindar. En un vi hi havia disulfur de dietil per sobre el llindar. Onze sobre dinou vins van donar concentracions de compostos de sofre volàtil per sobre el llindar.

Taula 3.5 Concentració de compostos de sofre volàtil en vins negres ($\mu\text{g/L}$) (en negreta els que estan per sobre el llindar de percepció)

Varietat	celler	llevat	descriptors	tractament	MeSH	EtSH	DMS	DMDS	DEDS	altres
Cabernet	e		età tiol	0	0,5	2,3	0	0	0	2
Cabernet	e		età tiol	0	0	0,2	0,1	0	0	0
Cabernet	h		sulfur	0	0	1,7	86,9	0	0	2
Cabernet	i		sulfur	0	0	4	34,3	0	0	2
Cabernet	i		sulfur	0	0	0	42,3	0	0	1
Cabernet	i		sulfur / tiol	0	0	0,1	0	0	0	0
Cabernet	n		sulfur	0,6	0	0	0	0	0	0
Cabernet	u		reduït	0	0	0,4	0,7	0	0	0
Cabernet	v		reduït	0	0	0	8	0	84	1
Cabernet	x		reduït	0	0	0	2,9	0	0	0
Cabernet	x		reduït	0	0	0,9	0	0	0	0
Cabernet	x		reduït	0	0	0	35,5	0	0	0
Cabernet	x		reduït	0	0	1,9	3,6	0	0	1
Cabernet	y		reduït	0	0	2,8	63,8	0	0	2
Cabernet	w		reduït	0	0	3	24,4	0	0	2
Cabernet	n		reduït	0	0	3,3	6,7	0	0	1
Cabernet	n		reduït	0	0	12	1,9	0	0	1
Cabernet	z		reduït	0	0	0	0	0	0	0
Cabernet	z		reduït	0	0,3	0	7,6	0	0	1

La darrera sèrie de vins negres estudiats eren de diverses varietats i cellers. Un havia estat tractat amb 0.4 mg/L de sulfat de coure. Els descriptors més habituals van ser reduït i sulfur, i un vi va ser descrit com goma cremada. Un vi tenia el metà tiol per sobre el llindar, sis vins tenien el età tiol per sobre el llindar i quatre vins tenien el sulfur de metil per sobre el llindar. En vuit dels onze vins es van trobar un o dos compostos de sofre per sobre el llindar.

Taula 3.6 Concentració de compostos de sofre volàtil en vins negres ($\mu\text{g/L}$) (en negreta els que estan per sobre el llindar de percepció)

Varietat	celler	llevat	descriptors	tractament	MeSH	EtSH	DMS	DMDS	DEDS	altres
Merlot	G		Sulfur	0	0	1,1	5,5	0	0	1
Merlot	I		Sulfur	0	0	0,7	34,2	0	0	1
Merlot	I		Sulfur	0	0	0,4	15,4	0	0	0
Merlot	I		Sulfur	0	0	6	23,2	0	0	1
Merlot	L		Reduït	0	0	12	100	0	0	2
Merlot	A		Reduït	0	0	0,8	5,1	0	0	0
Merlot			Reduït	0	1,1	4,6	15,6	0	0	2
Merlot	x		Reduït	0	0	0	1,3	0	23	0
Pinot noir	d		goma cremada	0,4	0	2,7	3,4	0	5,1	1
Pinot noir	q		Reduït	0	0	0	100	0	0	1
Sirah	r		Reduït	0	0	1,9	459	0	0	1

Els compostos identificats en més vins han estat el sulfur de dimetil (DMS) i età tiol (EtSH). També s'han trobat diversos vins amb disulfur de dietil (DEDS) i alguns amb metà tiol (MeSH). Amb l'excepció d'un compost de sofre no identificat que es va trobar en tres vins i tenia un temps de retenció llarg, no es van trobar altres compostos volàtils de sofre. El sulfur d'hidrogen o sulfhídric (H_2S) no es va poder quantificar en aquesta fase de l'estudi, ja que les columnes capil·lars comercials disponibles no separaven el sulfur d'hidrogen del diòxid de sofre (SO_2). A la següent figura es mostra les concentracions mitjanes del MeSH, EtSH, DMS i DEDS.

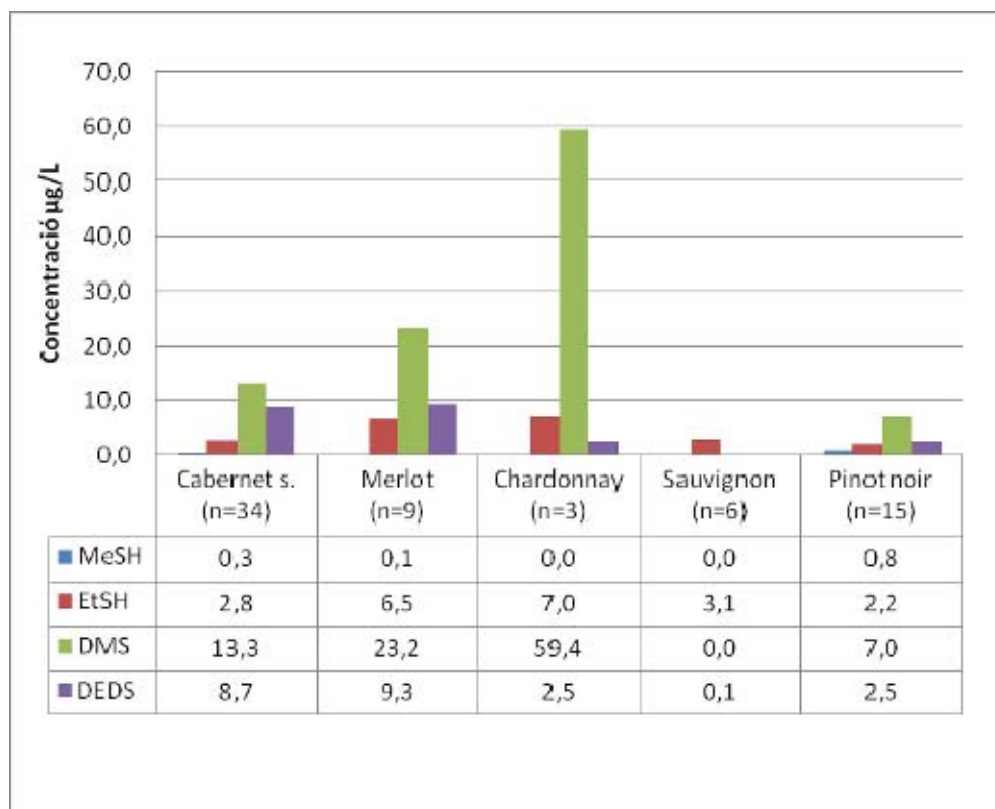


Fig.3.1 Mitjanes de les concentracions en el espai de cap de metà tiol (MeSH), età tiol (EtSH), sulfur de dimetil (DMS) i dietil disulfur (DEES) en µg/L per varietats. Els nombres entre parèntesis indiquen el nombre de mostres de cada varietat.

La incidència dels quatre compostos volàtils de sofre més freqüents en els vins estudiats no presenta correlació, és a dir, alguns vins tenien algun compost però no en tenien dels altres. El DMS es va trobar amb més freqüència i amb més altes concentracions que els altres compostos de sofre estudiats. El DMS es va trobar en tots els Merlot, i tots els Cabernet sauvignon i Pinot noir, menys un. El DMS també es va trobar en cinc de set Chardonnays i dos de set Sauvignon blanc analitzats. Un vi de Petit Sirah va donar un valor de 459 µg/L de DMS. Tot i l'ampla incidència del DMS, només es trobava per sobre del llindar (25 µg/L) de percepció en 13 vins. Per aquests, la concentració promig de DMS va ser de 87 µg/L i la desviació estàndard (SD) de 118 i un rang entre 27 i 459. Entre ells només el Petit Sirah, un Cabernet amb 64 µg/L, un Merlot amb 87, un Chardonnay 166 i un Chenin 86, contenien DMS el doble del llindar, i es podia esperar que tinguessin una olor d'espàrrecs o verdura cuita o altres olors derivades del sofre.

L'età tiol es va detectar en la majoria de vins fets amb raïm negre, incloent el vi blanc fet amb Pinot noir. En canvi a la majoria de vins blancs la incidència del EtSH va ser menor. En total 44 vins tenien EtSH per sobre del llindar de 1.1µg/L, promig de 5 i SD de 7.6, rang de 1.3 a 50 µg/L, i 12 vins tenien valors quatre vegades el llindar, fet que

els donava una olor d'all, ceba o dels tiols que s'afegeixen al gas domèstic per detectar fuites.

El disulfur de dietil (DEDS) es va trobar en 19 vins, dels quals cinc contenien menys del lindar ($4.3 \mu\text{g/L}$). En els vins amb DEDS per sobre del lindar, el promig va ser de 27, la SD 27.9 i el rang entre 5 i $86 \mu\text{g/L}$. Molts vins tenien el caràcter de cremat (olor a goma cremada), ja que alguns estaven entre cinc i vint vegades el lindar del DEDS. El DEDS no es va trobar en vins blancs fets amb Pinot noir. El MeSH es va trobar en nou dels Pinot amb valor promig de $2 \mu\text{g/L}$. D'aquests nou Pinot, tres contenien MeSH per sobre de $4 \mu\text{g/L}$ que podien donar una olor d'all o ceba passada.

Hi van haver vint vins en els que no es van detectar compostos de sofre per anàlisi. Pot ser que no tinguessin compostos de sofre o que els tinguessin per sota els lindars de detecció del sistema utilitzat. El mètode emprat, no permetia discriminar el sulfur d'hidrogen i el diòxid de sofre degut a que els dos són molt volàtils i tenen un pes molecular proper. Veure annex Park et al. 1994.

A les figures següents es mostren els valors de compostos de sofre trobats en vins de Sauvignon blanc, Pinot noir i Cabernet sauvignon.

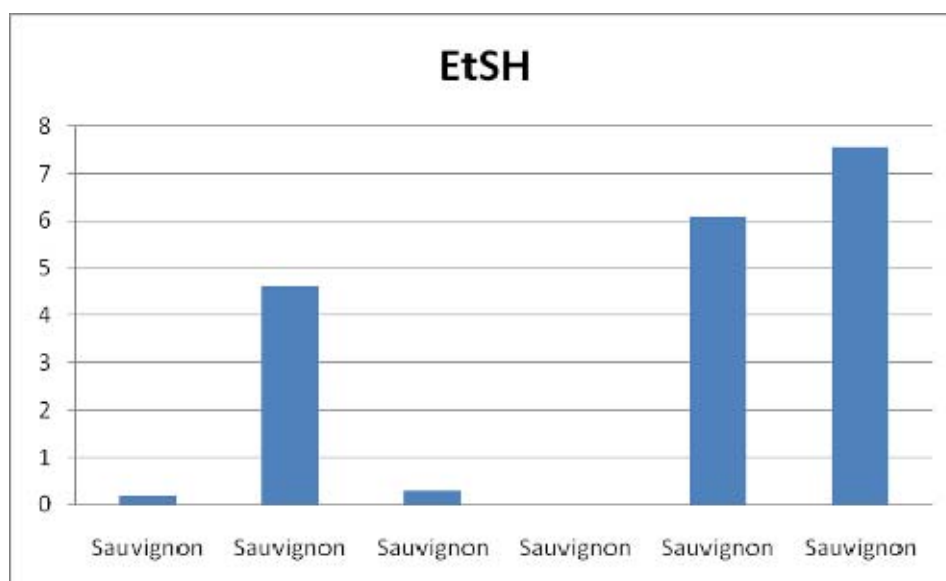


Fig. 3.2 Concentracions d'età tiol, en sis Sauvignon blanc en $\mu\text{g/L}$.

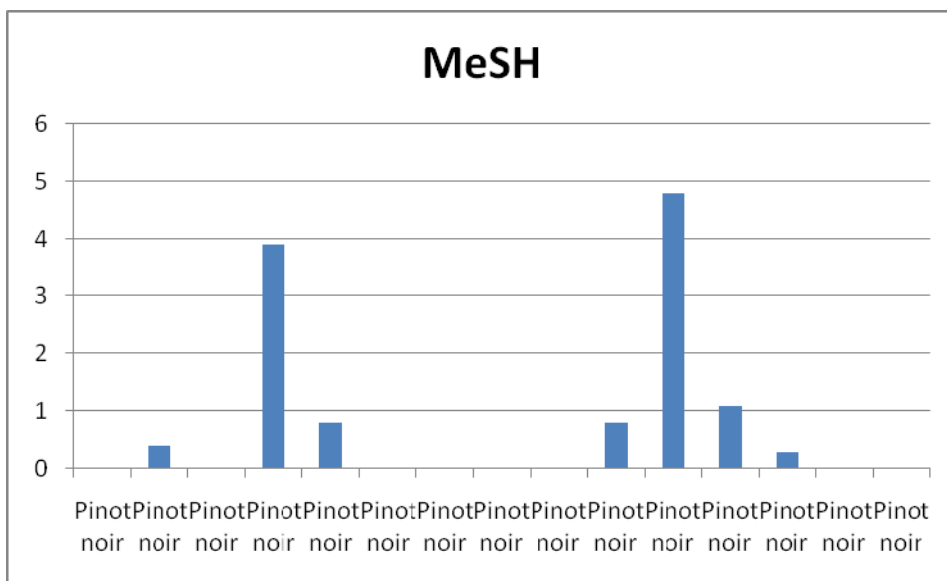


Fig. 3.3 Concentracions de metà tiol, en 15 Pinot noir, en µg/L.

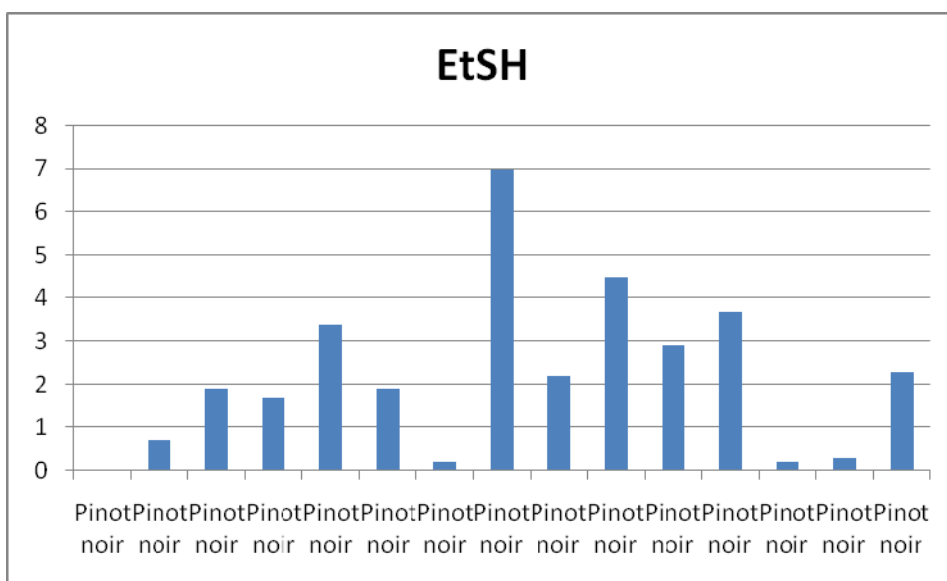


Fig. 3.4 Concentracions d'età tiol, en 15 Pinot noir, en µg/L.

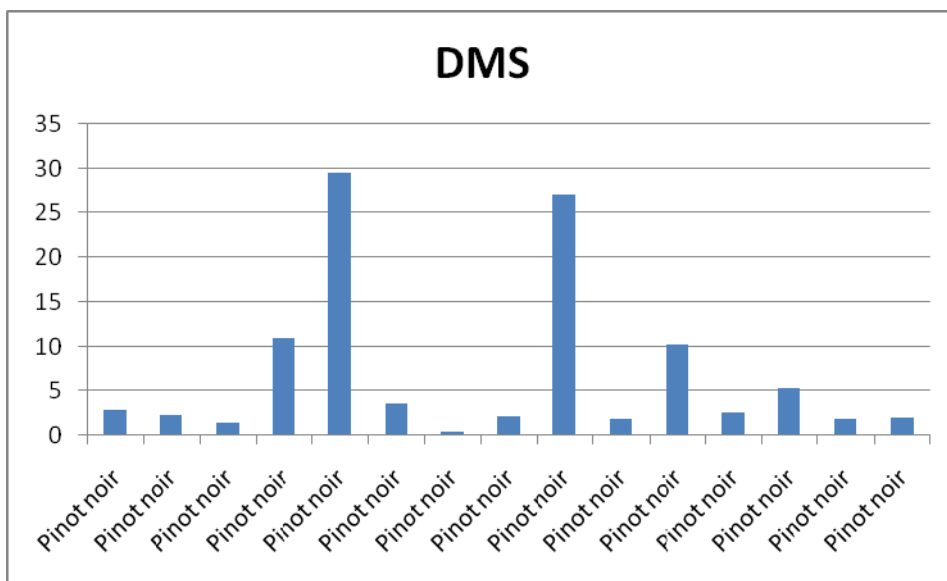


Fig. 3.5 Concentracions de sulfur de dimetil, en vins de Pinot noir en µg/L.

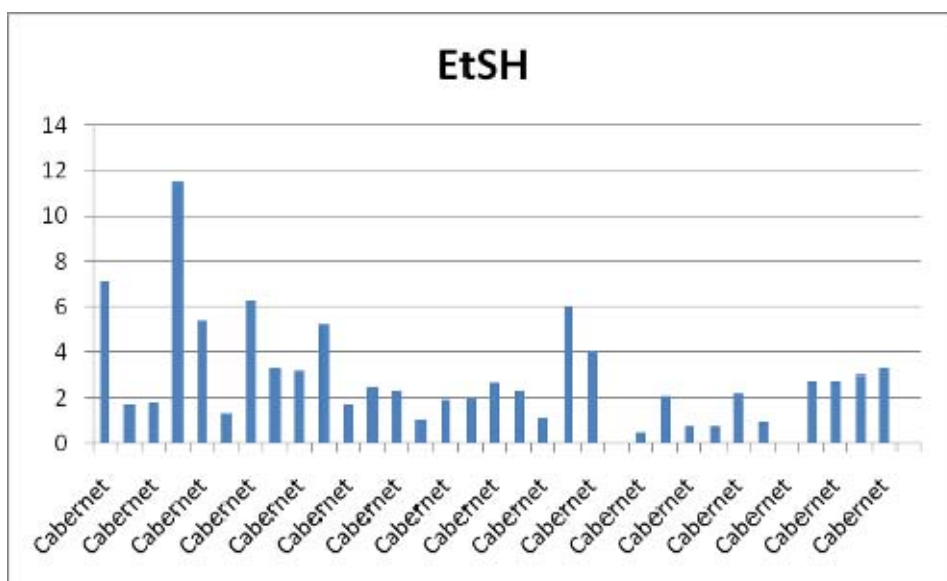


Fig. 3.6 Concentracions d'età tiol, en vins de Cabernet sauvignon en µg/L.

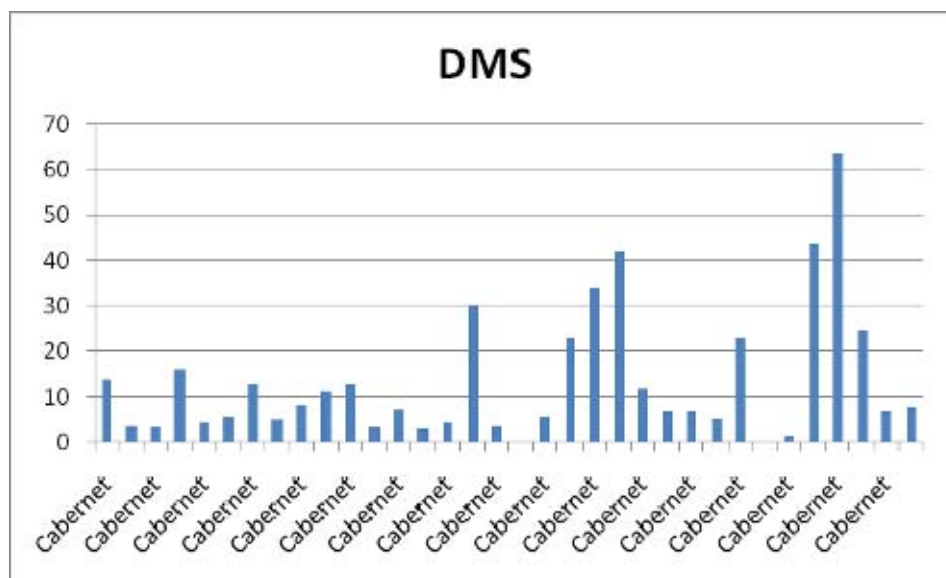


Fig. 3.7 Concentracions de sulfur de dimetil, en vins de Cabernet sauvignon en µg/L.

En resum s’observa que en la majoria de vins que presentaven olors de reducció detectades per anàlisi sensorial, s’han pogut mesurar, posant a punt la tècnica d’anàlisi de l’espai de cap per cromatografia de gasos amb un detector específic, compostos de sofre volàtils en concentració traça però per sobre dels llindars de percepció. Els més abundants han estat el DMS, EtSH, i en menor freqüència el MeSH i DEES. També es veu que poden formar-se en totes les varietats estudiades i amb diferents soques de llevat. Els vins tractats amb sulfat de coure no sempre queden nets dels defectes, per tant és millor prevenir i evitar-ne la formació.

3.2 ANÀLISI DE LA FORMACIÓ DE COMPOSTOS DE SOFRE DURANT LA FERMENTACIÓ

En els resultats anteriors es confirma i quantifica la presència de determinats compostos de sofre volàtils en vins que presentaven defectes de reducció. Aquests resultats es van trobar en vins que provenien de diverses varietats, cellers i fermentats amb diverses soques de llevat. Per a determinar quan es formaven els compostos de sofre volàtils, es van realitzar fermentacions amb most, amb medi model, amb addició de sofre i fermentacions contínues. També es va millorar la tècnica analítica i es va poder separar el sulfur d’hidrogen (H₂S) del diòxid de sofre (SO₂) en l’anàlisi cromatogràfica mitjançant “criofocusing”.

La primera fermentació es va estudiar durant 60 dies. El medi i el llevat van donar un pic de SO₂ que disminuïa després de les primeres 5 hores. El primer dia es va detectar H₂S, SO₂ i DMS. El segon dia encara va haver-hi els mateixos compostos, i el SO₂ va disminuir probablement per l'escombratge de CO₂. El tercer i quart dies es van detectar els mateixos compostos, però l'SO₂ a nivells inferiors. El cinquè dia, les proporcions es van mantenir, però tots els pics es van reduir lentament a mesura que van transcorre els dies, fet que va indicar que ja no hi havia fermentació. Després de 60 dies, només es va poder detectar DMS. En un medi model sense vitamines el llevat 522 forma H₂S, SO₂ i DMS.

Un most de les varietats Chenin blanc i Sauvignon blanc fermentat amb la soca de llevat *Saccharomyces cerevisiae* UCD 522 (Expt. F1), va formar pics de SO₂ i de DMS abans de la fermentació. Al cap de 12 hores, es va observar la presència de SO₂ i de DMS. El segon dia, l'SO₂ va ser inferior i el DMS va assolir el seu punt màxim. Durant els dies 5è al 7è, es va formar H₂S, i el SO₂ i el DMS van disminuir. El dia nou, es va formar més H₂S. Després de 12 dies, només es va detectar la presència de DMS, que es va dissipar durant el dies 14è al 17è.

Amb most de Cabernet Sauvignon (amb pell), fermentat amb 522 (Expt. F2), es va col·locar en un bany d'aigua a 30°C per reproduir una temperatura de fermentació a la que es pot arribar en vins negres. No es va detectar la presència de DMS al most abans de la fermentació. El segon dia, es va formar H₂S i DMS, i el procés va continuar d'aquesta manera fins al 6è dia, bàsicament sense canvis. Durant els dies 7è al 9è, es va detectar H₂S en menor quantitat, i es va observar la presència de compostos oxidats, com ara DMDS.

Es va fermentar un most amb Chenin blanc i Sauvignon blanc amb el llevat 522 (Expt. F3). El resultat va ser semblant a l'F1, però els nivells de DMS i de SO₂ que es van registrar van ser inferiors. Durant els dies 5è al 7è, es va formar H₂S. Dels dies 8è al 14è, només es va detectar un pic desconegut (pic U1), eluït abans del temps de retenció de l'H₂S.

El most de Chardonnay fermentat amb 522 (Expt. F4) només va formar el pic U1 durant i després de la fermentació. Aquest pic va seguir durant un llarg període de temps després de la fermentació i es va observar en altres vins joves que es van provar al final de la fermentació, independentment de la seva aroma.

El most de Cabernet Sauvignon (sense pell) fermentat amb 522 (Expt. F5), no va mostrar compostos de sofre volàtils al most inicial. El pic U1 es va observar des del 1er fins al 5è dia, després va començar a disminuir, però encara es podia detectar al 15è dia. L'H₂S es va formar entre els dies 5è i 9è.

El most amb Chenin blanc i Sauvignon fermentat amb el llevat Penedès 29 (Expt. F6) no va mostrar compostos de sofre volàtils al most inicial. El primer dia només es detectà el pic desconegut U1. El segon dia, després d'afegir SO₂, es va formar un pic de SO₂ i la quantitat del pic desconegut U1 va disminuir. El tercer dia, es va formar

una mica de H_2S i la concentració de SO_2 va ser inferior. Després de 5 dies, la quantitat de H_2S va disminuir i encara es va detectar un pic U1 desconegut i de SO_2 . El dia 7, l' H_2S va desaparèixer quasi del tot. Dels dies 11è al 14è, només es va detectar el pic U1 desconegut, però en quantitats cada vegada menors.

Solució model

Les fermentacions per lots de la solució model amb el llevat 522(B1, B2 i B3) van mostrar una bona reproductibilitat i els compostos que es formen van ser SO_2 , H_2S , metà tiol (MeSH), DMS i el pic desconegut U1. El B3 es va analitzar mitjançant els mètodes A i B. Amb el mètode A, columna empaquetada, es varen separar millor els pics inicials, però els límits de detecció van ser inferiors als de les columnes capil·lars.

Es va utilitzar un lot de solució model amb la soca de llevat Prise de Mousse (Expt.B4) que va mostrar els mateixos compostos H_2S i SO_2 , però el metà tiol i el DMS es van produir més tard (4rt dia) que amb el llevat 522.

Es va fer un seguiment de la solució model amb 50 mg/L de sofre elemental amb el llevat 522(Expt. B5) i es va analitzar amb el mètode C; els compostos principals que es van detectar van ser H_2S , metà tiol i DMS, però, al cap de cinc dies, també es va detectar la presència d'età tiol, de DMDS i de DEDS i d'altres compostos desconeguts entre MeSH i EtSH.

Fermentacions contínues

mostrar el pic U1 i H_2S el primer dia, i només el pic U1 els dies següents. Amb el mètode B la Es van realitzar dues fermentacions amb solucions model i alimentació continuada, fent servir el llevat 522 (Expts. F7 i F8) i es va mostrar que hi ha grans possibilitats de reproductibilitat. No es van observar pics detectables de sofre abans que comencés la fermentació. La formació de H_2S va començar durant el 2n dia, però es va eliminar en iniciar l'alimentació els dies 5è i 6è respectivament. El H_2S va tornar a aparèixer el dia després d'haver iniciat l'alimentació continuada. L'addició de SO_2 va donar lloc a pics inferiors de H_2S .

Es va fermentar la solució model amb el llevat 522 a diferents índexs de flux: 6 mL/hora (Expt.C5), 10 mL/hora (Expt. C1 i C2), 11,5 mL/hora (Expt.C4) i 13 mL/hora (Expt.C3). El C1 amb el mètode B només va mostrar $\text{H}_2\text{S}+\text{SO}_2$ i una quantitat menor de DMS durant la fermentació. Per analitzar el C2 es van utilitzar els mètodes A i B. Amb el mètode A va major sensibilitat va permetre, a més a més, detectar metà tiol i DMS i oscil·lacions en les quantitats de H_2S i del pic U1 desconegut.

La fermentació de la solució model amb Pasteur Champagne (Expt.C6) va mostrar una producció important de H_2S des del 4rt dia i fins al 8è dia, i es va mantenir fins el dia 11; ambdues puntes de H_2S van coincidir amb els períodes de creixement.

Amb la solució model es va realitzar la fermentació continuada a un índex de dilució de 10mL/hora, amb Penedès 29 (Expt.C7). Durant les condicions d'alimentació i creixement constant es van produir diferents quantitats de H₂S i d'altres sulfurs. La quantitat de H₂S produït amb la soca Penedès 29 va ser inferior a la que es va produir amb els altres tres tipus de soca de llevat estudiats.

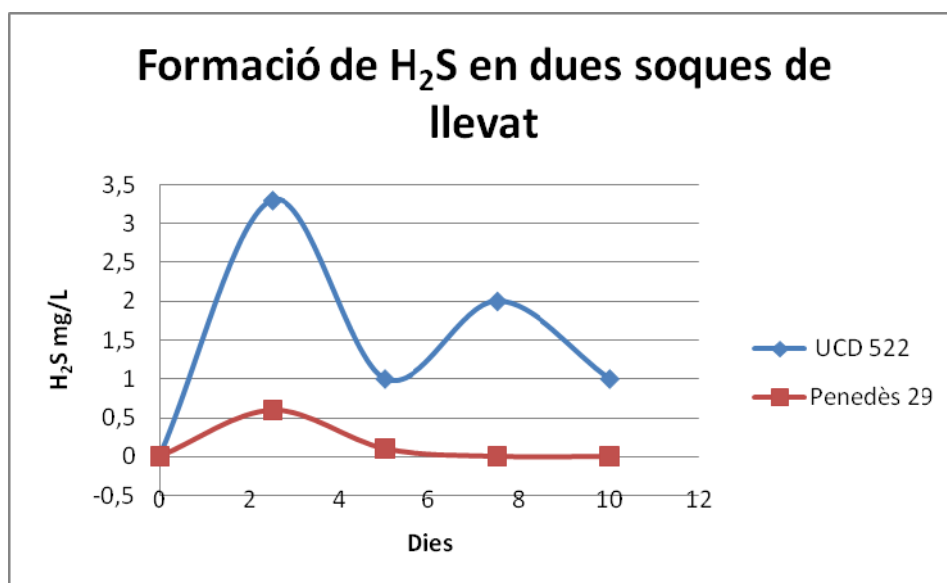


Fig.3.8 Formació de H₂S en mg/L durant la fermentació en dues soques de llevat víniques, UCD522 ha fet més H₂S i en dues fases, P29 ha fet menys H₂S i no n'ha fet al final de la fermentació.

Anàlisi del moment de la formació de compostos de sofre volàtil

S'ha comprovat la formació de H₂S, SO₂, DMS, EtSH durant la fermentació per part dels llevats vínic tant en most, com en medis model. La formació de compostos de sofre volàtil ha seguit el mateix patró tant a les fermentacions per lots, com a les fermentacions continuades que s'han dut a terme. El H₂S es va començar a formar el 2n, 3r i 4rt dies, quan la població va assolir el seu valor màxim i el cultiu s'estava desenvolupant i en alguns casos cap al final de la fermentació.

Quan es va afegir medi, l'efecte de dilució de l'alimentació va reduir la població de cèl·lules aproximadament en 1/3, i l'addició de nutrients va permetre que hi hagués més creixement. En aquest punt, la major part del llevat va créixer en condicions anaeròbiques i en un medi amb absència quasi absoluta de nitrogen amínic. La població va deixar de créixer amb les fonts de nitrogen exhaurides; quan la població intenta tornar a créixer, a causa de l'addició de medi i nutrients, normalment va acompanyat de la formació de H₂S durant els dos dies següents. Aquestes

observacions són més evidents a la fermentació continuada, en què el procés d'alimentació/extracció força el creixement del llevat. Després de la formació de H_2S i disminució unes quantes vegades, segurament pel fet que la major part dels llevats no creixen, la població roman amb un consum mínim de nutrients, però segueix fermentant, mentre que altres cèl·lules, en nombre inferior, es multipliquen i mantenen la població estable segons els recursos de nutrients. Aquest procés d'adaptació generalment forma algunes oscil·lacions del nombre total de cèl·lules i dels nivells de sucre en les fermentacions continuades. Alguns índexs d'alimentació tendeixen a afavorir aquests cicles i algunes soques de llevats sembla que són més propenses a aquest efecte, segurament a causa de les diferències en quant els requisits dels nutrients i a la capacitat d'adaptació de cada soca.

El control dels paràmetres de fermentació, com ara la densitat de les cèl·lules, per detectar una aturada prematura del creixement i la indicació d'un estat pobre en nutrients, pot ajudar a anticipar la formació de H_2S descrita, o bé altres desordres de fermentació, com podria ser un alentiment o aturada.

S'ha trobat una relació entre el creixement dels llevats en un medi empobrit i la producció de sulfurs volàtils. Això explica l'efecte limitat de l'aportació de nutrients al final del creixement del llevat i la recomanació que a les primeres fases de la fermentació el llevat tingui els nutrients adequats.

Les diferències entre soques de llevat que s'observen en aquests experiments suggereixen que hi ha soques que tenen menys requisits de nutrients que d'altres en un entorn específic, com ara la composició del most, la temperatura de fermentació, els nivells de SO_2 que s'utilitzen, etc. Cal dur a terme una recerca més profunda en aquest aspecte per poder entendre aquestes propietats dels llevats vínics.

Per a l'anàlisi sensorial, s'ha fet servir la roda d'aromes del vi i la dels vins escumosos per suggerir descriptors de les aromes dels vins estudiats. També es podien fer servir descriptors lliures. Segons el jutges, els vins analitzats han tingut diverses descripcions: mercaptà, diesel, sofre, sulfur de dimetil. A la roda d'aromes es descriuen olors directament com de sofre i altres que tenen compostos de sofre com poden ser olors a llevat, cafè, espàrrecs, olives, pèsols, mongeta tendra, verdures en llauna. Durant la cocció, les proteïnes que contenen aminoàcids amb sofre com la cisteïna o la metionina, desprenen olors entre altres, el sulfur de dimetil o DMS. En petita quantitat, el DMS, és molt freqüent en l'aroma de molts vins i també en l'olor a mar i marisc.

En un altres experiment per identificar vins amb defectes derivats del sofre els descriptors triats per tretze jutges van ser: coliflor, ceba, metàl·lic, plàstic, all i ou podrit. En una segona sessió es va mantenir el descriptor d'all i es va afegir llumí cremat, sulfur de dimetil (que precisa el terme coliflor cuïta), età tiol, goma i porro. Altres descriptors pels vins amb problemes de sofre han estat: goma cremada, sulfur i gos mullat.

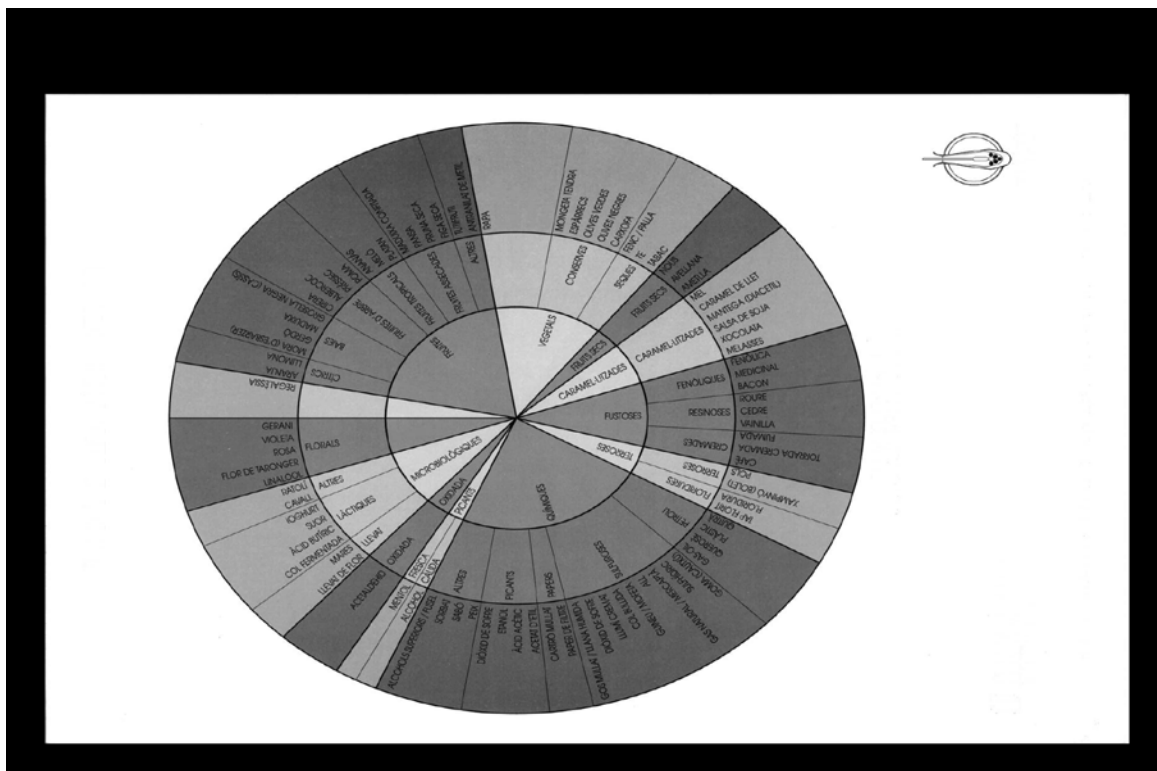


Fig.3.9 Roda d'aromes utilitzada per a l'anàlisi sensorial del panell de tast de l' Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI) a Vilafranca del Penedès, traduïda d'Ann Noble (Noble et al.1987)

Aplicació de la detecció manual del sulfur d'hidrogen per al control enològic.

Detector Toxi Rae (Rae Systems). S'ha utilitzat un detector portàtil específic per al sulfur d'hidrogen per al seguiment de les fermentacions víniques en ampelles o dipòsits. El detector Toxi Rae (distribuït per Sensotran S.L., El Prat del Llobregat) és un aparell pensat per a la seguretat personal en ambients on hi pugui haver acumulació de H₂S. El detector dóna mesures immediates de la concentració de sulfur d'hidrogen. Es pot fer servir en fermentacions a partir d'un litre i pot detectar fins 0.1 ppm de H₂S. Es pot fer servir en una copa de vi amb 50 mL. o servir en el seguiment de dipòsits o tancs de fermentació o criaença. Els seus avantatges són que és portàtil i lleuger, té una llarga duració de la bateria, i permet la determinació immediata. Va bé per a determinacions puntuals, ja sigui en el celler o en el laboratori, que no requereixin més sensibilitat.

Columnes Figasa (Corea). És un sistema que ja s'havia fet servir pel seguiment del sulfur d'hidrogen en fermentacions. És un tub de plàstic amb un farcit d'acetat de plom marcat amb mil·límetres. S'ha de situar en el corrent del H₂S que volem

analitzar. Pot fer el seguiment de la fermentació des d'un matràs amb 250 ml de most, o fent passar un corrent de nitrogen a través d'un vi per analitzar-ne el contingut de H_2S . Un cop instal·lat es poden fer lectures durant la fermentació o al final.



Fig. 3.10 Detector manual (RAE Systems) esquerra i columna Figasa, dreta, utilitzats per a la mesura de H_2S durant les fermentacions.

Sistema Radiello (Sigma). És un detector passiu pensat per a l'anàlisi de la qualitat de l'aire. És un material absorbent amb zinc, que es pot deixar durant tot el procés de fermentació, sobre les ampolles. Quan es vol fer la lectura, s'extreu el cartutx, s'elueix i es fa una lectura colorimètrica amb un espectrofotòmetre. Té l'avantatge que recull tot el H_2S que va sortint i el fixa en un material absorbent. No permet un seguiment visual directe com els altres dos sistemes (Toxi Rae i columnes Figasa).



Fig. 3.11 Fermentadors d'un litre amb detectors Radiello de sulfur d'hidrogen.

3.3 COMPARACIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE SULFUR D'HIDROGEN I SULFITS EN SOQUES VÍNIQUES

En un estudi anterior realitzat a l'Incavi es van aïllar 93 llevats per a la fermentació del cava a partir de llevats del sòl de vinyes del Penedès (Carbó 1987). A partir de dades bioquímiques, la majoria dels llevats es van identificar com *Saccharomyces cerevisiae* (66.7%), però també es va veure que hi havia altres llevats capaços de créixer en les condicions del vi: *Saccharomyces kluyveri* (5.4%), *Pichia membranefaciens* (18.3%), *Saccharomycodes ludwigi* (6.5%) i *Zygosaccharomyces rouxii* (3.1%). Amb els 93 llevats es va fer la prova de cultiu en medi Biggy, que dóna una idea aproximada de la tendència de les soques a formar sulfur d'hidrogen, si la colònia té color fosc és que ha produït H₂S en aquestes condicions. Els resultats van donar una forta tendència dels llevats *S. kluyveri*, *P. membranefaciens*, i *Z. ludwigi* a formar colònies negres que indiquen una formació de H₂S.

Taula 3.7a Resultats del cultiu en medi Biggy, d'una col·lecció de llevats de Incavi.

	Color Biggy		Color Biggy
504 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	501 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
505 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	502 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
535 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	503 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
536 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	506 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	punts negres
538 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	507 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
539 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	508 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
540 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	509 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
553 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	510 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
567 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	511 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
568 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	512 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
570 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	513 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
583 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	514 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
585 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	515 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
589 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	516 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
594 <i>Pichia membranefaciens</i>	negre	517 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
537 <i>Saccharomyces kluyveri</i>	negre	518 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
557 <i>Saccharomyces kluyveri</i>	negre	519 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
580 <i>Saccharomyces kluyveri</i>	negre	520 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
560 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	negre	521 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
575 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	negre	522 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
582 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	negre	523 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró

Taula 3.7b Resultats del cultiu en medi Biggy, d'una col·lecció de llevats de Incavi.

	Color Biggy		Color Biggy	
524	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	551 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
525	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	552 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
526	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	526 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
527	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	527 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
528	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	528 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
529	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	529 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
530	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	530 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
531	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	531 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
532	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	532 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
533	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	533 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
534	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	534 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
541	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	541 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
542	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	542 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
543	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	543 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
544	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	544 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
545	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	545 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
546	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	546 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
547	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	547 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
548	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	548 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
549	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	549 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
550	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	550 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró

Taula 3.7c Resultats del cultiu en medi Biggy, d'una col·lecció de llevats de Incavi.

	Color Biggy		Color Biggy	
551	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	572 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
552	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	574 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
554	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	576 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
555	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	577 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
556	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	578 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
558	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	579 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
559	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	581 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
560	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	586 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
561	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	588 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
562	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	590 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
563	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	591 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
564	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	592 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
569	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró	593 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró
571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	marró		



Fig. 3.13a Sembra de soques de llevats vínics en medi Biggy, com més fosc, més producció de sulfur d'hidrogen. La majoria de soques produeixen H_2S . Les soques 504 i 505 donen una coloració més fosca.

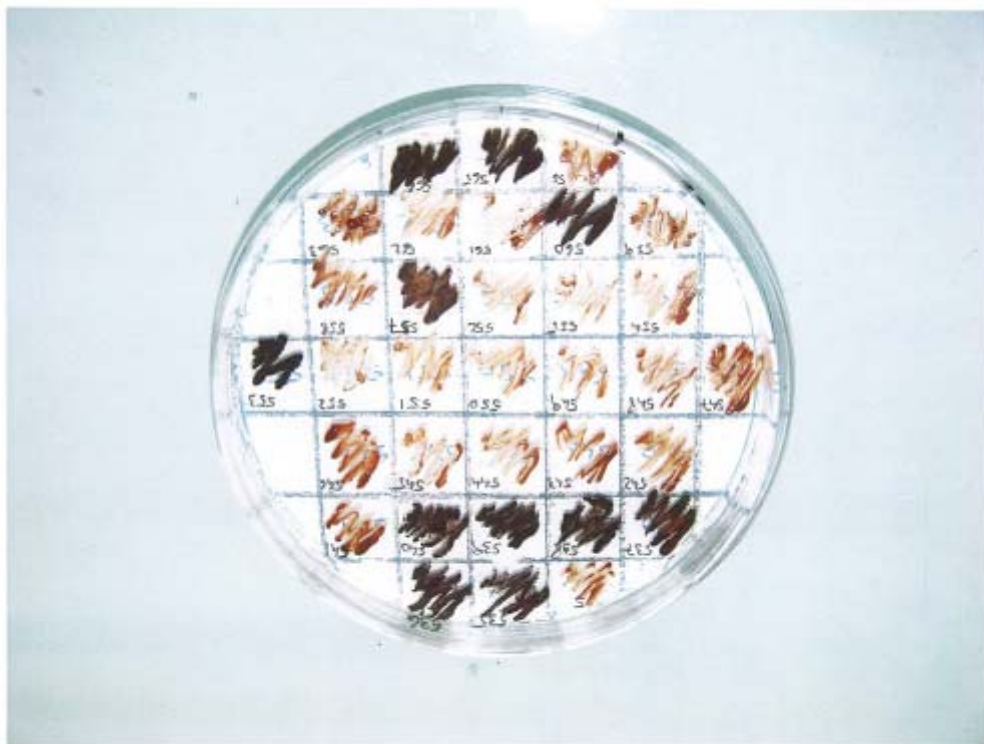


Fig. 3.13b Sembra de soques de llevats vínics en medi Biggy, com més fosc, més producció de sulfur d'hidrogen. La majoria de soques produeixen H_2S . Les soques 535, 536, 537, 538, 539, 540, 553, 557, 560, 565 i 566 donen una coloració més fosca.

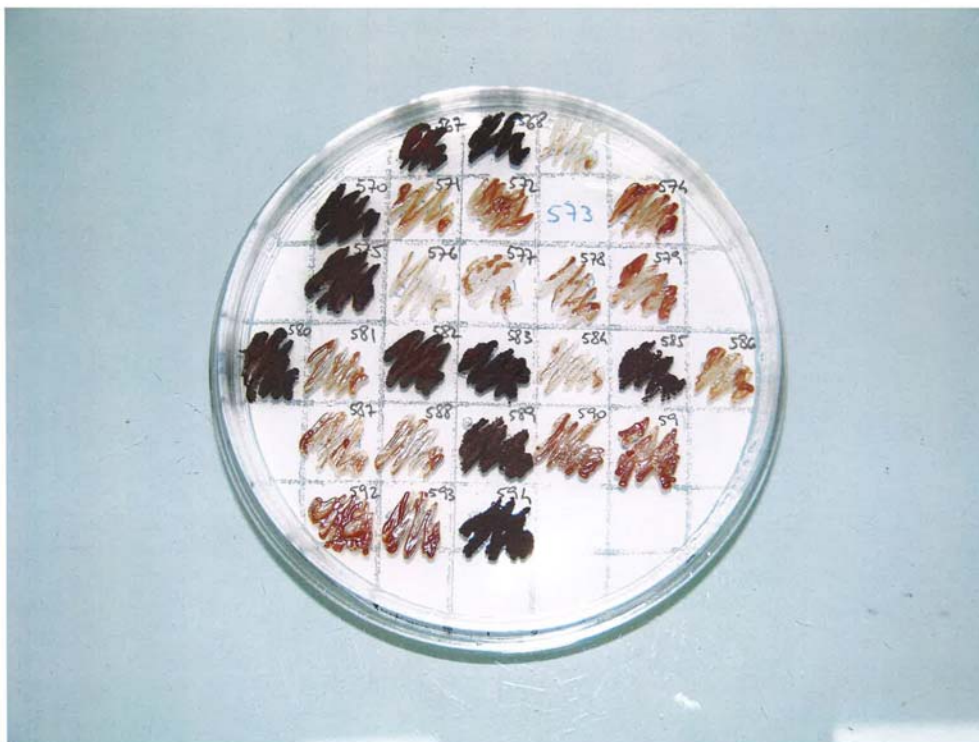


Fig. 3.13c Sembra de soques de llevats vínics en medi Biggy, com més fosc, més producció de sulfur d'hidrogen. La majoria de soques produeixen H₂S. Les soques 557,568, 570, 575, 580, 582, 583, 585, 589 i 594 donen una coloració més fosca.

Comparació de soques de llevat comercial

Es van estudiar 140 soques comercials de llevats comercialitzades a Espanya. D'aquestes, 55 (40%) no van produir H₂S o el van produir en concentracions per sota de la detecció del sistema. 85 soques (60%) de les 140 analitzades van produir valors mesurables de H₂S amb un rang de 0.2 a 13 mg/L.

La producció de sulfits (SO₂) va ser entre 5 i 50 mg/L. S'ha trobat una relació inversa, significativa, entre la producció de H₂S i la de sulfits (P<0.01). Una soca va produir 5 mg/L, 10 soques van produir 10 mg/L, 32 soques van produir 15 mg/L, 28 soques van produir 20 mg/L, 20 soques van produir 25 mg/L, 39 van produir 30 mg/L, una va produir 35 mg/L, 7 van produir 40 mg/L i dues van produir 50 mg/L.

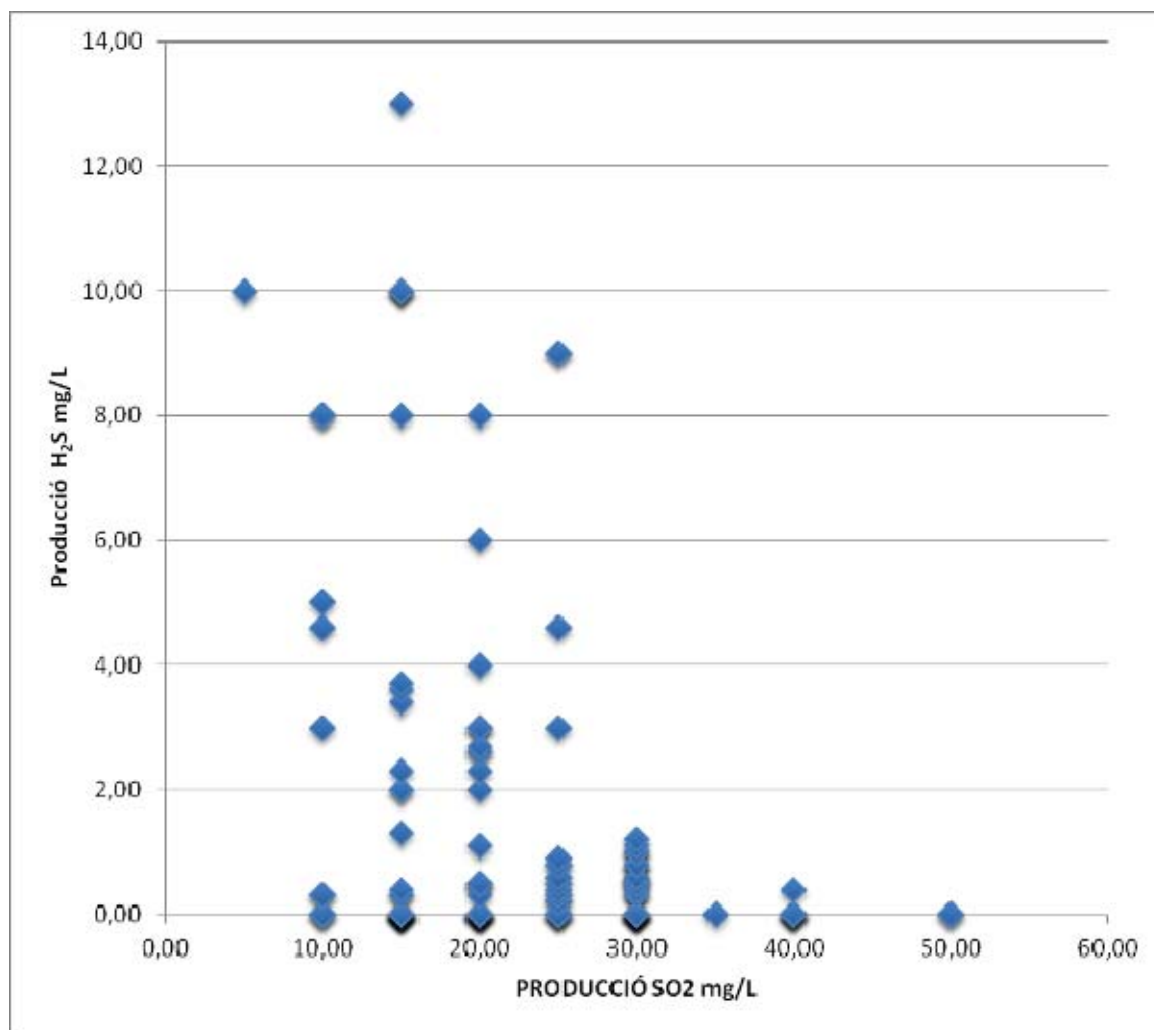


Fig. 3.12 Formació de sulfur d'hidrogen (H_2S) i diòxid de sofre (SO_2) en 140 soques víniques.

Es pot observar que hi ha moltes soques comercials que produeixen H_2S i tenen el risc que una part quedi en el vi. Pel que fa el SO_2 també és important la formació per part dels llevats i caldria estudiar-ho més a fons. La normativa europea de vins permet arribar fins a 120 mg/L de SO_2 total, la normativa europea específica del vi ecològic permet només fins 100 mg/L. Per altra banda, alguns importadors exigeixen concentracions encara més baixes. En tot cas, si el contingut en SO_2 total és superior a 10 mg/L, a l'envàs hi ha d'haver la indicació "conté sulfits".

Es va voler comparar la producció de H_2S i el perfil genètic de la soca de llevat. Un primer objectiu va ser agrupar els llevats d'una manera objectiva. En un estudi en col·laboració amb l'IATA de València per a identificar les soques de llevats comercials, es van comparar diversos mètodes, veure annex Fernandez Espinar et al. 2001. El més complert i pràctic va ser el dels perfils de restricció o patrons d'ADN mitocondrial utilitzant un enzim de restricció com *HinfI*. De les 140 soques comercials es van trobar 22 patrons. A les següents figures es mostra la relació de producció de H_2S en diversos patrons. Tot i la variabilitat entre referències, i ha algun patró que clarament té més producció de H_2S que els altres.

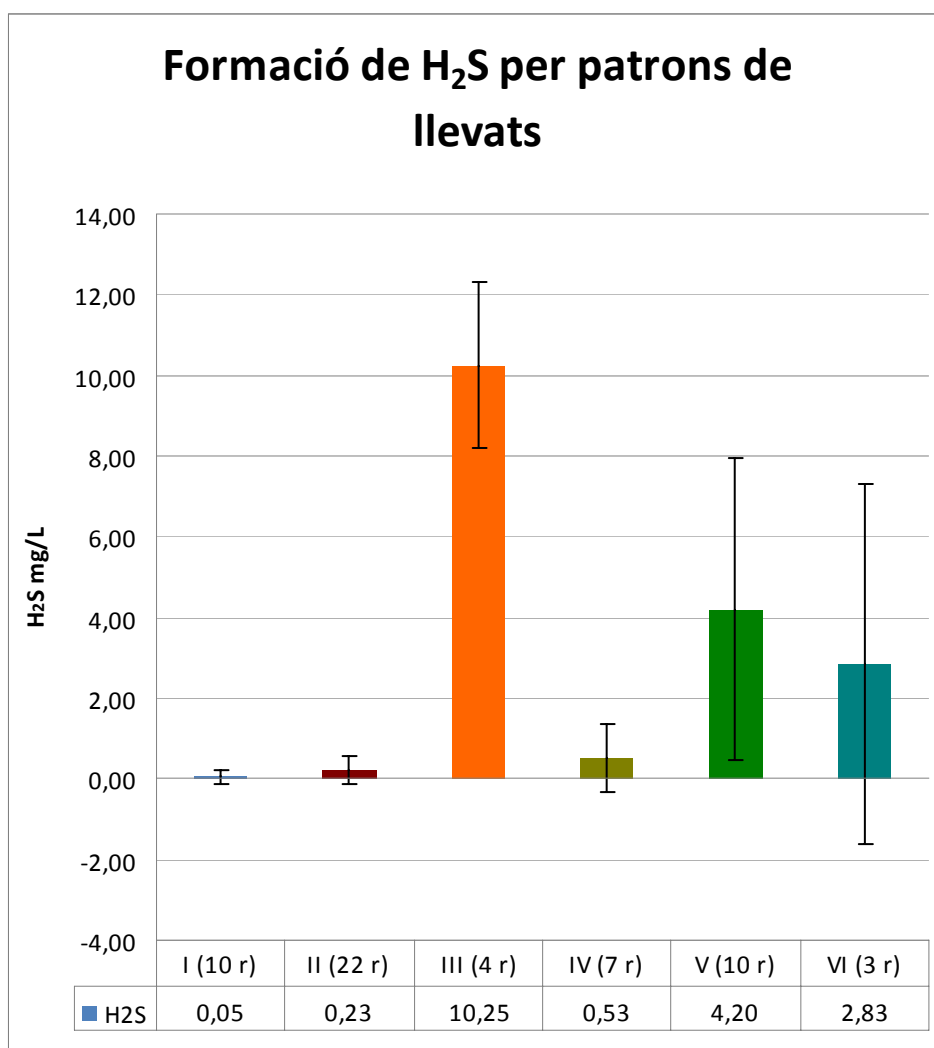


Fig 3.14a Formació de H₂S en sis patrons de RFLP del mtDNA (I-VI) (entre parèntesi el nombre de referències comercials de cada patró i la mitja de H₂S). Les barres equivalen a la desviació estàndard.

El patró I, es va trobar en deu referències i va formar un promig de 0.05 mg/L de H₂S. El patró II, és un dels més utilitzats en enologia i vint i dues referències comercials que comparteixen el perfil, té un promig de producció de 0.23 mg/L. El patró III, amb quatre referències va ser una de les que tenen més producció de H₂S, amb 10.25 mg/L. El patró IV el tenien set referències comercials va produir un promig de 0.53 mg/L de H₂S. El patró V amb deu referències comercials també va tenir una producció alta, en promig 4.2 mg/L de H₂S. El patró VI es va trobar en tres referències i va formar en promig 2.83 mg/L de H₂S però amb molta variabilitat.

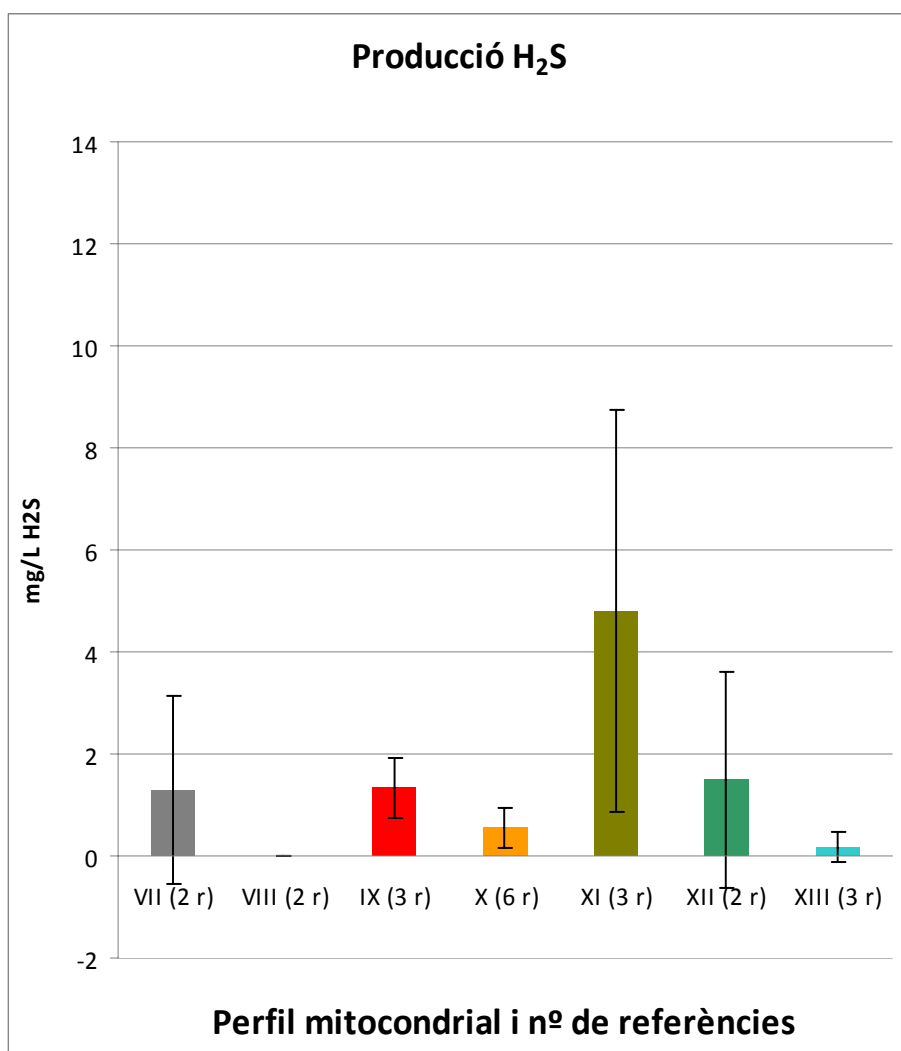


Fig 3.14b Formació de H₂S en sis patrons de RFLP del mtDNA (VII-XIII) (entre parèntesi el nombre de referències comercials de cada patró i la mitja de H₂S). Les barres equivalen a la desviació estàndard.

El patró VII es va trobar en dues referències i va donar un promig de 1.3 mg/L. El patró VIII es va trobar en dues soques comercials i les dues van donar inapreciable en formació de H₂S. El patró IX es va trobar en tres referències i va donar un promig de 1.3 mg/L. El patró X es va trobar en sis referències i va formar una mitja de 0.5 mg/L. El perfil XI es va trobar en tre referències i va donar un promig de 4.8 mg/L.

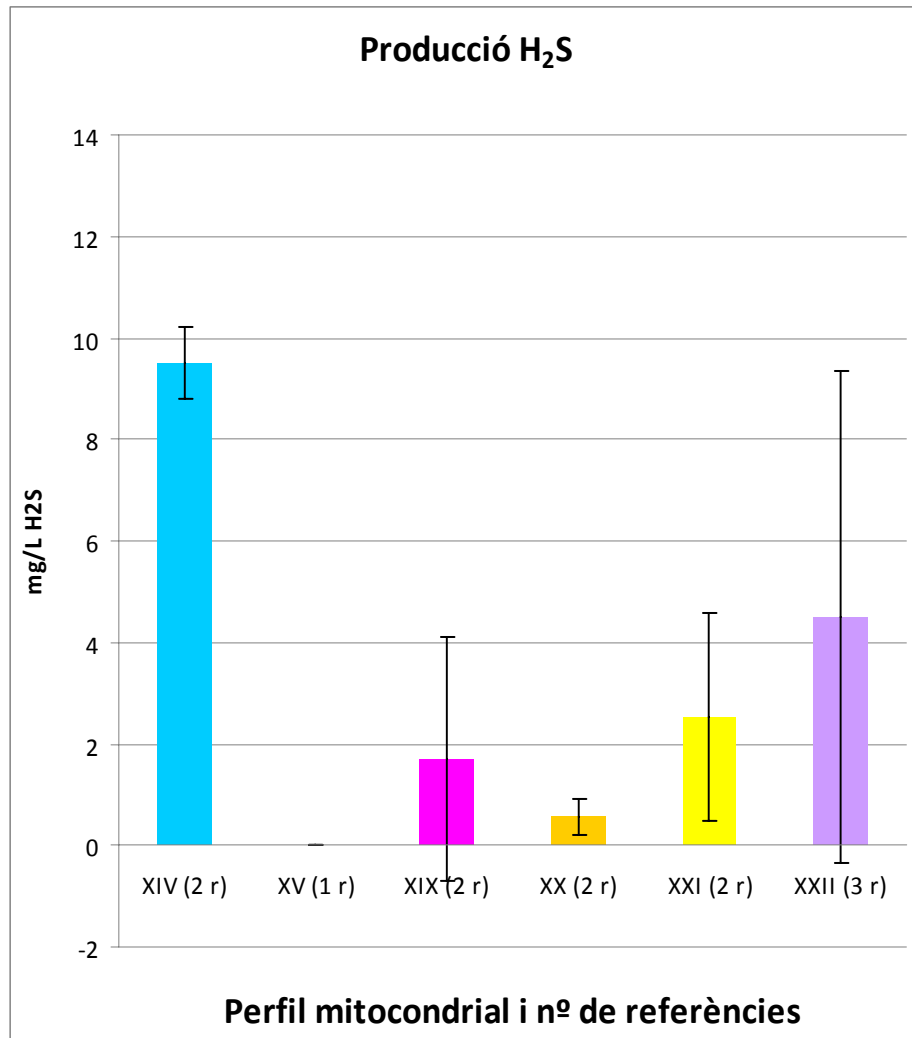


Fig 3.14c Formació de H₂S en sis patrons de RFLP del mtDNA (XIV-XXII) (entre parèntesi el nombre de referències comercials de cada patró i la mitja de H₂S). Les barres equivalen a la desviació estàndard.

El patró XIV es va trobar en dues referències i va donar un promig de 9.5 mg/L de H₂S, un dels més alts. El perfil XV es va trobar en un referència i no es va detectar formació de H₂S. El patró XIX es va trobar en dues referències i va donar un promig de 1.7 mg/L de H₂S. El patró XX es va trobar en dues referències i va donar un promig de 0.5 mg de H₂S. El patró XXI es va trobar en dues referències i va donar un promig de 2.5 mg/L de H₂S. El patró XXII va donar un promig de 4.5 mg/L de H₂S.

A partir d'aquests resultats quedava clar que la soca de llevat tenia una influència important en la formació de compostos de sofre volàtils durant la fermentació del vi.

La majoria formaven H₂S, però quedava per veure quins aspectes metabòlics hi podien influir. Per el proper pas es van triar dues soques, una coneguda per la seva producció moderada o alta de H₂S, comercialitzada en 10 referències i coneguda com UCD522, l'altra era la P29 aïllada per l'INCAVI.

3.4 ANÀLISI TRANSCRIPTÒMICA COMPARATIVA DE DUES SOQUES VÍNIQUES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AMB DIFERENT PRODUCCIÓ DE H₂S

Per tal d'estudiar els aspectes metabòlics que poden influir en la formació de H₂S, s'han comparat dues soques en diverses fermentacions i, en el moment de més formació de H₂S, s'han analitzat els transcriptomes de les dues soques amb tres mètodes. Menys del 10% dels gens han mostrat diferències significatives entre les dues soques. La producció alta de sulfur està correlacionada amb una sobreexpressió dels gens de la biosíntesi de la tiamina. Els gens associats al catabolisme del aminoàcids amb sofre no s'han expressat de manera significativament diferent entre les dues soques.

Les fermentacions conduïdes en paral·lel amb UCD522 i P29 en diversos mostos i anys han donat una alta producció de sulfur d'hidrogen (H₂S) a UCD522 i una baixa producció a P29. En promig UCD522 dona 7.5 vegades més H₂S (rang de 2 a 10 vegades). A part de la diferència en producció de H₂S, les dues soques presenten una fermentació similar.

Taula 3.7 Producció promig dels llevats P29 i UCD522 en diversos anys i medis, mesurat amb diversos detectors en fermentacions de 1L. Prova T de diferenciació i proporció entre la formació de H₂S a UCD522 i P29. Most pasteuritzat (Most p.). Detector electroquímic (ToxiRae), Acetat de zinc (Radiello), Acetat de plom (Figasa).

any	medi	Tipus de detector	P29	UCD522	522/P29
2003	most p.	detector electroquímic	15	290	19,3
2004	most p.	detector electroquímic	22	107	4,9
2005	most p.	detector electroquímic	27	152	5,6
2005	most p.	detector electroquímic	35	627	17,9
2005	most p.	detector electroquímic	35	170	4,9
2006	most p.	detector electroquímic	52	260	5,0
2006	most p.	detector electroquímic	59	270	4,6
2006	most p.	acetat zinc	125	842	6,7
2008	most p.	acetat de plom	89	425	4,8
2009	mos f.	detector electroquímic	94	488	5,2
2009	mos f.	detector electroquímic	40	188	4,7
2009	mos f.	detector electroquímic	27	179	6,6
					7,5
			T Test=2.7 10-4		

S'observa una formació més alta, significativa a UCD522 respecte a P29 tant en mostos pasteuritzats com en mostos frescos. També s'observa uns resultats semblants entre sistemes de detecció. Veure annex Bartra et al. 2010.

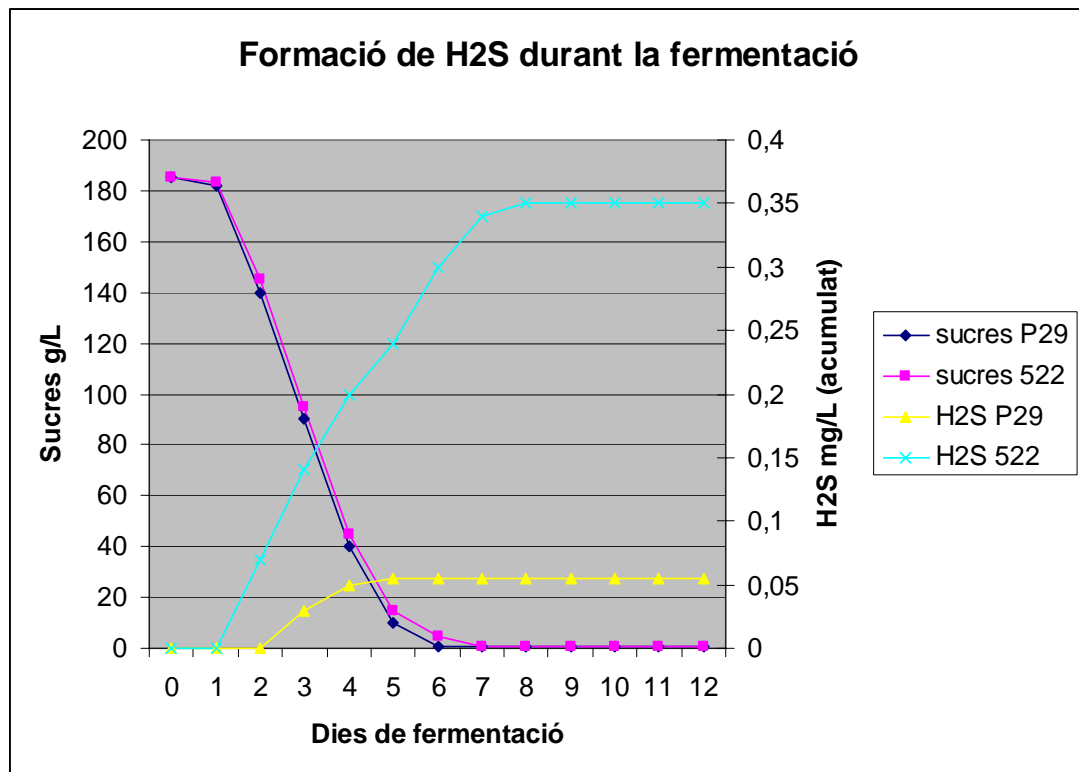


Fig.3.15 Comparació de la formació promig de la soca UCD522 i la soca P29, durant diversos anys, medis i sistemes de detecció. S'observa una formació superior de H₂S a la soca UCD522.

Els perfils d'expressió de les dues soques es van analitzar al quart dia de la fermentació amb un xip basat en el cDNA. De 6014 ORF (*open reading frames*) impresos, 2555 s'ajustaven als requisits de qualitat; això és una proporció mitjana, però habitual, quan no fem servir soques de laboratori. Només 78 (3%) dels gens estudiats presentaven diferències en expressió majors de dos entre les dues soques. 44 estaven més expressats a UCD522 i 34 (1.3%) més expressats a P29. L'anàlisi per GO (Gene Ontology) associava el grup de gens més expressats a UCD522 amb els gens de la síntesi de tiamina de manera molt significativa amb una probabilitat d'error menor a 10^{-15} i era l'únic terme GO significativament més expressat en aquesta soca. Per tenir un altra anàlisi d'expressió, les dues soques es van analitzar amb un xip d'oligonucleòtids sintetitzats in situ en la plataforma Geniom. En aquest cas el nombre

de gens totals i els que s'expressaven més d'un factor de dos en una soca va ser superior, 783 (13%). Les dades dels arrays per oligonucleòtids donen més gens sobreexpressats, però els mateixos resultats per termes de GO, relacionats amb la biosíntesi de la tiamina. En el terme GO 0042723, dels 19 gens relacionats, 17 estaven sobreexpressats, mostrant una sobreexpressió de tota la via de síntesi. En canvi, els gens relacionats amb el metabolisme del nitrogen o la síntesi d'aminoàcids amb sofre, no es van sobreexpressar.

La comparació de les dades dels dos tipus de xips mostren la majoria dels gens en una diagonal estreta, que reflexa una expressió semblant de la majoria dels gens amb les dues tècniques. La majoria dels gens relacionats amb la biosíntesi de la tiamina es desvien de la distribució majoritària, més apartats com més expressats de manera diferent en les dues soques. A la soca P29 els gens més expressats estan relacionats amb altres vies, com el metabolisme del alcohol.

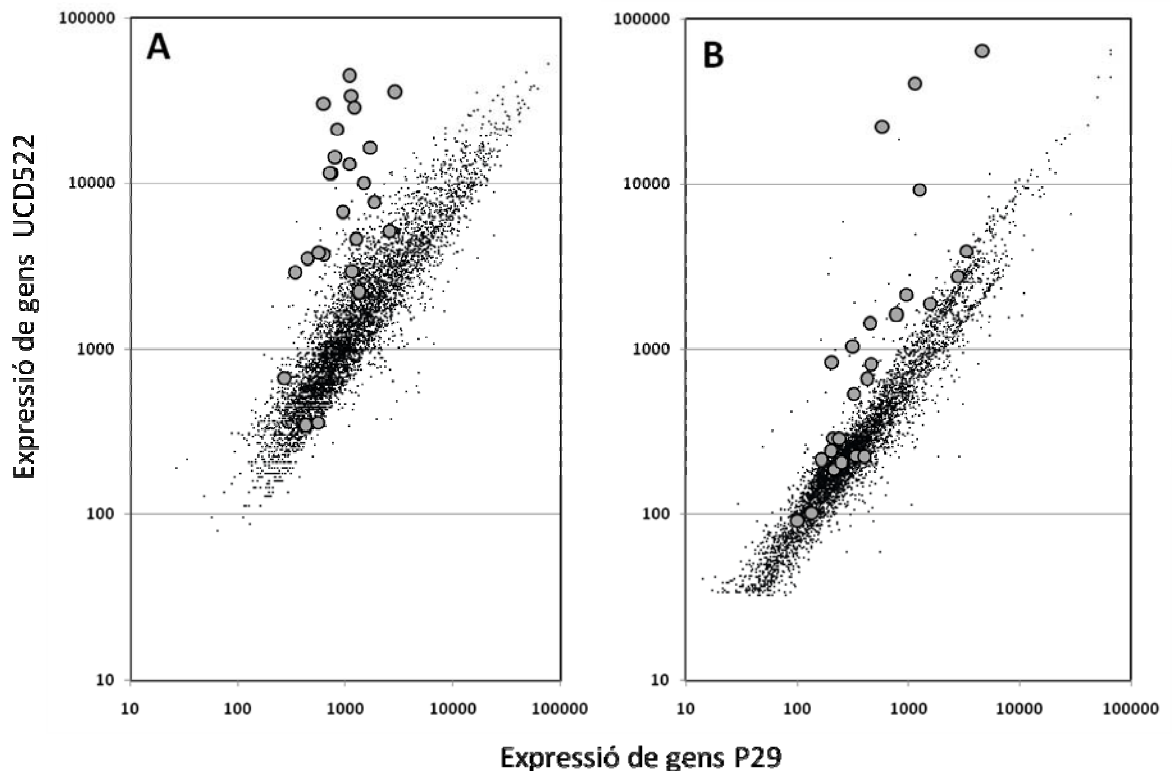


Fig.3.16a Comparació de l'expressió dels gens de la soca UCD522 en abscesses i de la soca P29 en ordenades en els dos tipus de xip utilitzats, a) xip basat en oligonucleòtids Geniom One i b) xip basat en c-DNA. Les dades d'expressió es donen en unitats arbitràries de fluorescència. Els gens relacionats amb la síntesi de la tiamina es mostren com cercles en gris.

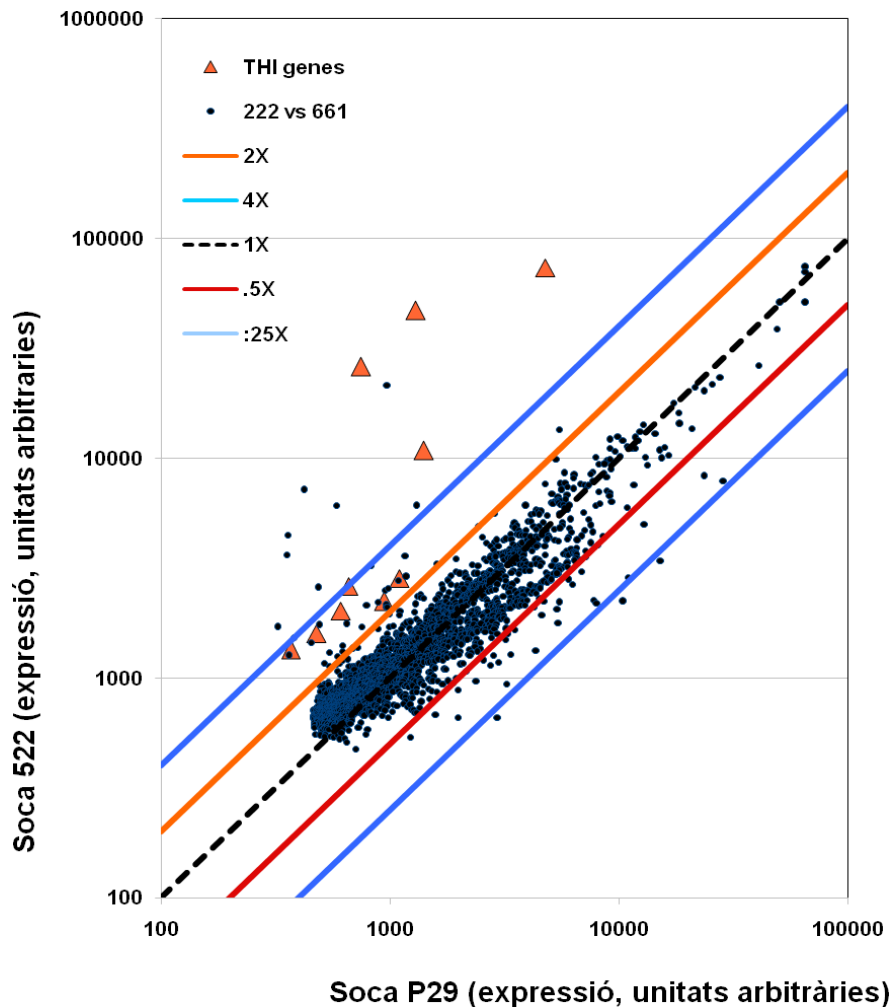


Fig. 3.16b Comparació de l'expressió del gens a les soques UCD 522 a ordenades i P29, abcises. Els punts que es troben sobre la línia de punts, s'han expressat de manera semblant a les dues soques, els que es troben cap amunt, s'han expressat més. Els que es troben cap avall s'han expressat menys. Els gens de la síntesi de la tiamina es mostren amb triangles.

S'observa que la majoria del gens s'expressen de manera similar, punts negres sobre l'eix central. Dos grups estan sobre expressats, els triangles, més expressats a la soca 522, productora de H_2S , pertanyen al grup de la síntesi de la tiamina. Alguns més expressats a P29 no s'agrupen en cap terme del Gen Ontology (GO).

Taula 3.8 Estadística dels gens expressats de manera diferent a la soca UCD522 i a la soca P29 calculat a partir dels microarrays o xips.

	Xip cDNA	Xip d'oligonucleòtids
Gens totals	2555	6032
Nombre de gens sobreexpressats a 522 (>2x)	44	543
GO terms	GO:0042723 Metabolisme de la tiamina i derivats	GO:0042723 Metabolisme de la tiamina i derivats
valor p	4.44x10 ⁻¹⁶	4.37x10 ⁻¹⁴
Gens	<i>PHO3, PET18, THI13, THI5, SNZ3, THI4, THI12, SNZ2, THI20, THI22</i>	<i>PHO3, THI2, PET18, THI13, THI5, SNZ3, SNO3, THI4, THI11, THI12, SNZ2, SNO2, THI20, THI80, THI6, THI21, THI22</i>
Nombre de gens sobreexpressats a P29 (>2x)	34	240
GO terms	GO:0006066 metabolisme de l'alcohol	No hi ha terme GO significatiu
valor p	3.01x10 ⁻⁵	
Gens	<i>ERG4, INO1, MCRI, ERG3, ERG5, ADH3, ADH2, ADH1</i>	

És molt significativa la relació ente el grup de gens més expressats a la soca UCD522 en els diferents tipus de proves, i el grup de gens de la tiamina. Els gens més expressats a P29 estaven relacionats amb el metabolisme de l'alcohol en el xip de cDNA però no tenen un terme comú amb l'altra tipus de xip que els agrupi de forma significativa.

A la figura 3.17 es mostra la localització de tots els gens inclosos en els diferents termes GO relacionats amb el metabolisme de la tiamina (GO:0042723, GO:0006772 i

GO:0009228 www.yeastgenome.org). A la figura es veu que una part important d'aquests gens més expressats poden ser els que estan més regulats.

Entre els gens més expressats a P29 hi ha gens del metabolisme de l'alcohol. No es va observar un expressió diferent en els gens del metabolisme del nitrogen o de la síntesi d'aminoàcids amb sofre. Aquests gens no semblen ser diferents en el present treball.

Per validar aquests resultats es van fer una qRT-PCR de gens seleccionats dels passos centrals de la síntesi de tiamina: *THI4*, *THI5* i *THI20*. *ADH1* es va fer servir com referència per si havia diferències en la via glicolítica. *TDH1*, *TDH2* i *TDH3* es van fer servir de referència. Els resultats, tal com es va observar en els xips, mostren sobreexpressió en els tres gens *THI*, 5 vegades a *THI20*, 30 vegades per *THI4* i 450 vegades per *THI5*. Per tant totes les dades d'expressió d'aquest estudi conclouen que hi ha més expressió en els gens de la biosíntesi de la tiamina a la soca UCD522 respecte a P29.

Aquest estudi presenta proves que indiquen que, per les soques de llevat estudiades, la biosíntesi de la tiamina i potser altres compostos relacionats pot ser igual o més important que la disponibilitat de nitrogen en relació a la producció de sulfurs durant la vinificació. Això pot ser una nova solució al problema i un nou objectiu alhora de seleccionar soques de llevat per a la fermentació vínica.

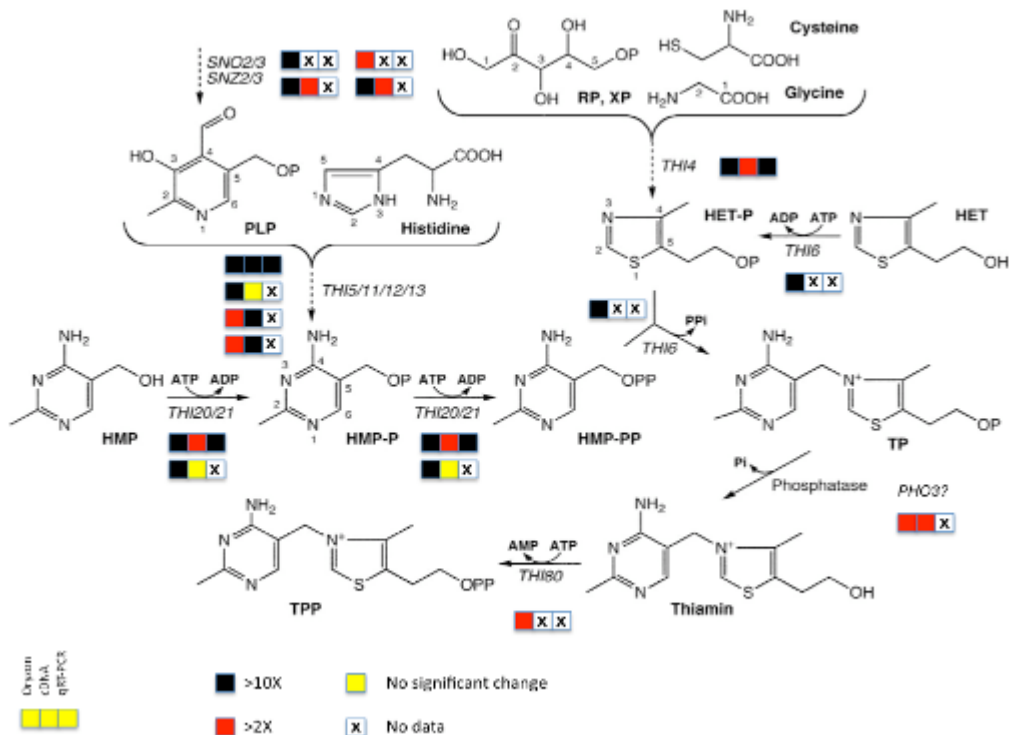


Fig. 3.17 Resum dels resultats dels experiments d'expressió gènica amb els 17 gens i enzims relacionats amb la síntesi de la tiamina. Els quadrets a sota del nom de cada gen indiquen l'expressió relativa entre el llevat UCD522 i P29, calculat pel xip d'oligos (esquerra), xip de DNA (centre) i qRT-PCR. Els quadrets negres indiquen un

expressió de més de 10 vegades, els vermells 2 vegades, els grocs sense diferència significativa i els que tenen una creu, sense dades.

Cap gen d'aquest grup es va expressar més a P29 que a UCD522. HET-P: 4-metil 5-beta hidroxil etil tiazol fosfat, HMP: hidroximetil pirimidina, HMP-P: HMP fosfat, HMP-PP: HMP pirofosfat, PLP Piridoxal fosfat, RP: Ribulosa 5-fosfat, TP:tiamina fosfat, TPP:tiamina pirofosfat, XP: xilulosa fosfat. Adaptat de (Nosaka 2006)

3.5 FACTORS VITÍCOLES QUE PODEN AFECTAR LA FORMACIÓ DE COMPOSTOS DE SOFRE VOLÀTILS

A part del llevat i el most, hi ha factors de cultiu de la vinya que també influeixen en la formació de H₂S durant la fermentació. S'ha estudiat el contingut de nitrogen assimilable en mostres analitzades a l'INCAVI a Vilafranca i Reus. S'ha comparat l'efecte de l'aclarit de raïms; en una experiència del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi natural (DAAM). S'han analitzat els efectes del reg. S'han comparat productes alternatius al sofre en la protecció de la vinya contra l'oïdi.

Nitrogen en els mostos

El valor mig del nitrogen amoniacal i amínic ha estat de 164 mg/L i el nitrogen total de 783mg/L a les mostres analitzades a Vilafranca del Penedès, i de 162 mg/L de nitrogen amoniacal i amínic i 428 mg/L de nitrogen total a les mostres analitzades a Reus.

A l'estudi global amb mostos des del 2003 al 2012, la meitat de les mostres tenia una concentració inferior a la mínima recomanada de 150 mg/L.

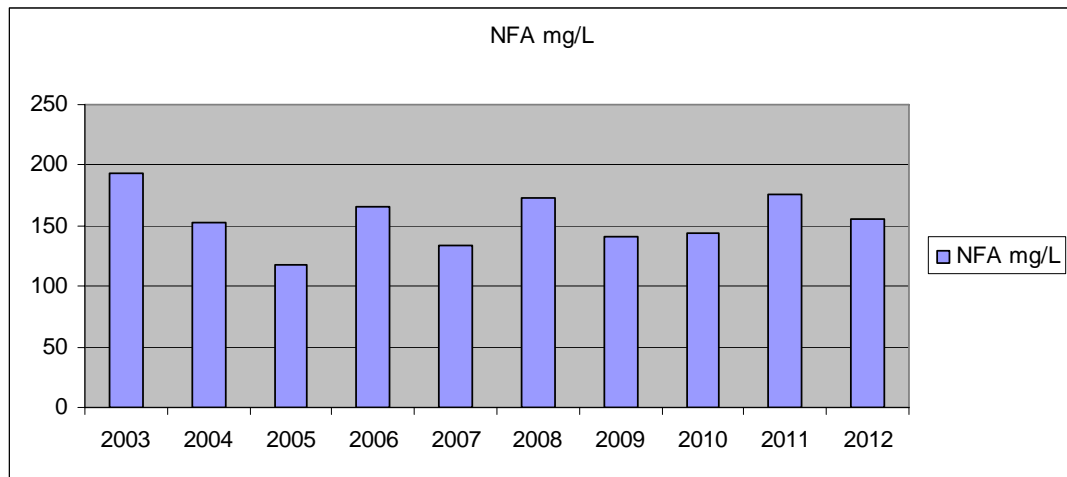


Fig. 3.18 Concentració de nitrogen assimilable en mostos del 2003 a 2012. El promig és 155mg/L.

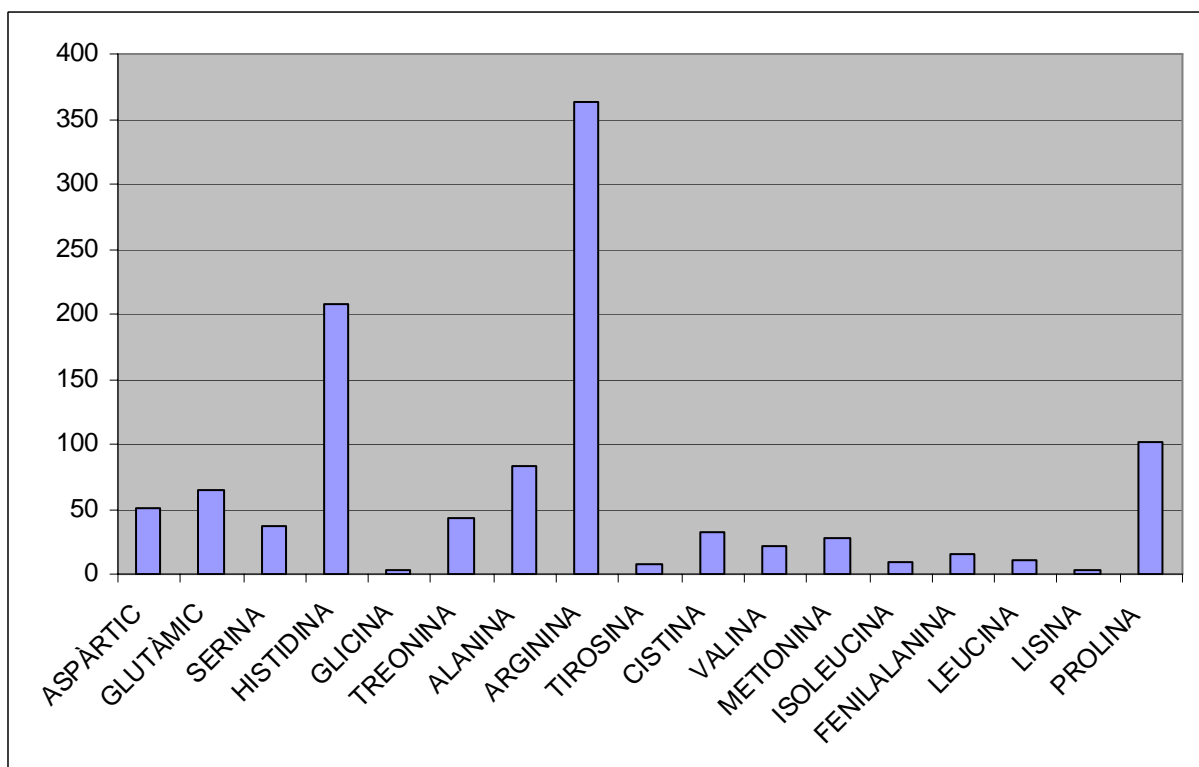


Fig. 3.19 Composició en mg/L d'aminoàcids en un most de xarel·lo.

Irrigació i composició del most

S'han comparat tres quantitats de reg en una vinya durant tres anys, a partir del potencial hídic de la fulla a migdia. Les quantitats aportades van ser de 378, 252 i 148 L/m² en els tractaments control C, control dèficit CD i dèficit dèficit DD respectivament. Les mesures de la vegetació van ser similars entre C i CD, en canvi, DD va tenir un menor creixement en els tres anys. La producció es va mantenir semblant el primer any entre C i CD, però va disminuir 19% a CD el segon any i 24% el tercer any. L'efecte en la maduresa es va observar en els graus Brix més alts en DD i en canvi, es varen apreciar poques diferències entre C i CD. L'acidesa va ser inferior a DD respecte a C i CD. El raïm del tractament DD va tenir una menor concentració d'aminoàcids i nitrogen assimilable respecte a CD i C. Veure annex Girona et al. 2005.

Tractaments alternatius al sofre en pols

El tractament més tradicional de l'oïdi de la vinya és el sofre elemental, ja sigui en pols o altres presentacions. En viticultura ecològica és una de les úniques opcions autoritzades; en viticultura convencional hi ha altres productes sintètics autoritzats però hi ha hagut casos de resistències i per tant, es recomana fer algun tractament de sofre. Veure altres exemples de tractament alternatiu a l'annex Calvo et al. 2012.

La protecció de la vinya contra l'oïdi en el clima mediterrani, en cultiu ecològic, depèn gairebé exclusivament del sofre en pols. Es tracta d'una bona protecció contra l'oïdi i els àcars, però té alguns desavantatges: depèn del temps atmosfèric, les altes temperatures poden generar danys a les vinyes, les mesures de protecció ambientals i de seguretat estan augmentant i durant l'elaboració del vi pot ser una font d'olors de sofre en el vi. En aquest treball s'ha comparat un tractament clàssic amb sofre en pols com tractament de referència, amb un tractament amb oli de gira-sol ecològic i amb llevat com tractaments alternatius. S'han estudiat diversos aspectes de la vegetació de la vinya, la composició de suc, els paràmetres de la fermentació i la qualitat del vi per determinar la viabilitat dels tractaments alternatius o complementaris en la producció de vi ecològic i augmentar les opcions de pràctiques respectuoses amb el medi, social i econòmicament sostenibles. És possible la utilització d'olis vegetals i llevats com a un tractament complementari però no únic, contra l'oïdi amb l'avantatge d'una menor incidència de H₂S. Aquests tractaments podrien estar autoritzats en la producció de vi ecològic de qualitat, tenir menor afectació ambiental i dels treballadors.

Es van trobar diferències entre els tractaments en termes de control de l'oïdi, la formació de sulfur d'hidrogen (H₂S) i en el color del vi final.

En condicions favorables per l'oïdi, el sofre en pols segueix sent el millor tractament, seguit per l'oli i el llevat que tenia algun efecte protector, però no suficient en les condicions d'alta pressió de la malaltia de l'experiment. El H₂S s'ha

estudiat per mesurar la influència de possibles residus de sofre en pols a la fermentació. Les diferències eren relativament petites, però els vins de raïm tractats amb sofre en pols tenien la major quantitat de H₂S, seguit pel control, del raïm tractat amb llevat i les més baixes van ser els raïms tractades amb oli vegetal.

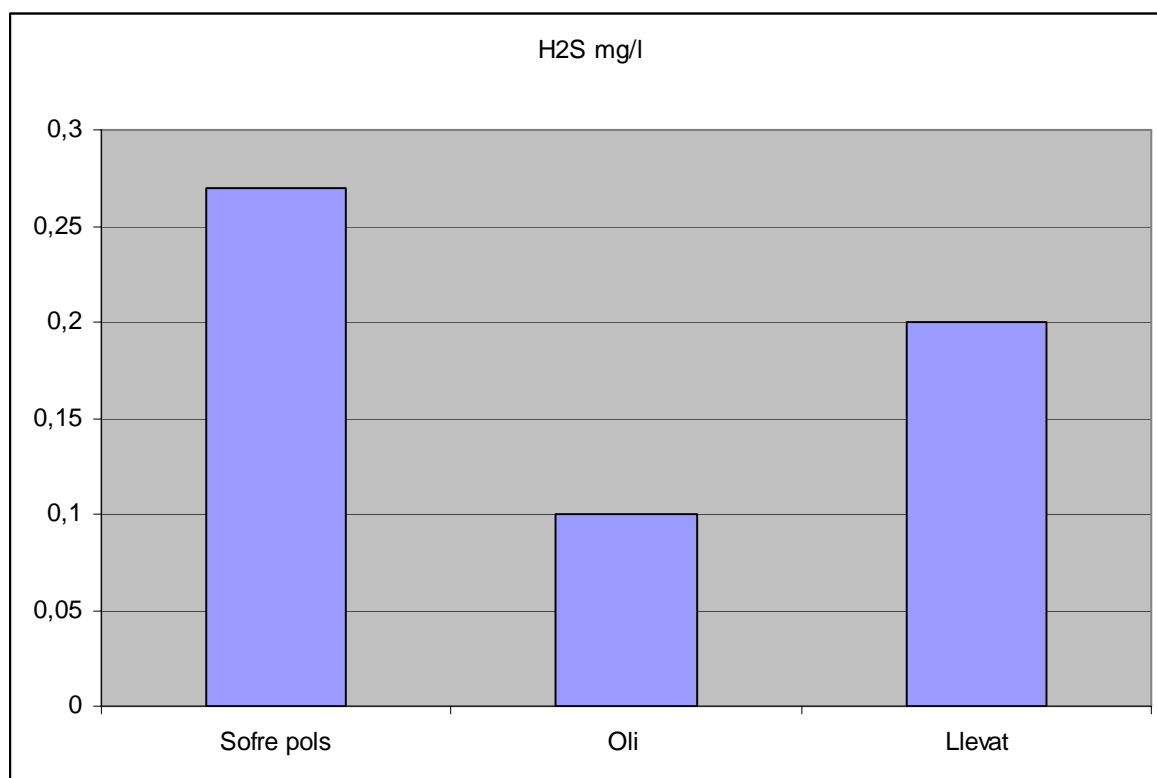


Fig. 3.20 Formació de H₂S en mg/L, en tres tractaments de la vinya, sofre en pols, oli vegetal i llevat.

3.6 TRACTAMENT DE VINS AMB DEFECTES DE COMPOSTOS DE SOFRE VOLÀTILS

L'estudi es va fer amb 20 vins de diferents cellers tractats a l' Institut Català de la vinya i el Vi (INCAVI) de Vilafranca del Penedès. La primera prova va ser per determinar la quantitat de coure necessària per a disminuir les olors de sofre en els vins. Seguidament es varen tractar 3 dels vins amb la mateixa quantitat de coure amb dos compostos diferents: sulfat de coure (com a material de referència), citrat de coure o Kupzit (bentonita amb un 2% de citrat de coure). Les mostres es van filtrar per plaques (K150) amb un contacte mínim d'aire i embotellades amb tap de rosca. Les anàlisis dels compostos de sofre volàtils van ser realitzades per la Professora Doris Rauhut a l' Institut del Vi (SLFA) de Geisenheim (Alemanya) per cromatografia de gasos i detector de quimioluminescència. El tast va ser fet per un panell entrenat.

Codificació de las proves després del tractament necessari per a cada vi

Primera sèrie

- B: vi blanc control, sense tractament
- BK: tractat amb 40 g Kupzit por 100 L
- BS: tractat amb 1,0 g de sulfat de coure per 100 L
- N: vi negre control, sense tractament
- NK: tractat amb 40 g Kupzit por 100 L
- NS: tractat amb 1,6 g de sulfat de coure per 100 L

Taula 3.9 a Avaluació sensorial i concentració de coure en vins control i tractats amb citrat de coure (K) i sulfat de coure (S)

Mostra	Tast	Coure final mg/L
Vi blanc control	Sulfhídric	0.1
Vi blanc 1g/Hl SO ₄ Cu	Net, correcte	2.9
Vi blanc 40g/Hl K	Agradable, net	0.8
Vi negre control	Reduït	0.1
Vi negre 1.6 g/Hl SO ₄ Cu	Net	3.6
Vi negre 40 g/Hl K	Net, fresc	0.7

Taula 3.9 b Concentracions de compostos de sofre en vins control, tractats amb citrat de coure (K) i sulfat de coure (S)

		H ₂ S [µg/L]	MeSH [µg/L]	EtSH [µg/L]	DMS [µg/L]	CS ₂ [µg/L]	MeSAc [µg/L]	DMDS [µg/L]	EtSAc [µg/L]	DEDS [µg/L]
B	a	39,5	4,5	11	2,5	10,2	24	0,5	9,6	n. d.
B	b	35,5	4,7	10,8	2,8	10,8	23,6	0,5	9,6	n. d.
B	(a+b)/2	37,5	4,6	10,9	2,7	10,5	23,8	0,5	9,6	n. d.
BK	B	7,6	n. d.	n. d.	1,7	9,7	23,7	0,5	9,7	n. d.
BK	b	7,1	n. d.	n. d.	1,5	9,6	23,3	0,3	8,8	n. d.
BK	(a+b)/2	7,4	n. d.	n. d.	1,6	9,7	23,5	0,4	9,3	n. d.
BS	A	9,6	n. d.	n. d.	1,6	10,4	24,3	0,5	9,4	n. d.
BS	B	9,1	n. d.	n. d.	1,6	10,1	23	0,5	9,2	n. d.
BS	(a+b)/2	9,4	n. d.	n. d.	1,6	10,3	23,7	0,5	9,3	n. d.

Taula 3.9 c Concentracions de compostos de sofre en vins control, tractats amb citrat de coure (K) i sulfat de coure (S)

	Mostra	H ₂ S [µg/L]	MeSH [µg/L]	EtSH [µg/L]	DMS [µg/L]	CS ₂ [µg/L]	n.i.	MeSAc [µg/L]	DMDS [µg/L]	EtSAc [µg/L]	DEDS [µg/L]
N	a	9,4	n. d.	n. d.	11,3	5,3	0,068	17,9	0,5	<3	n. d.
N	b	9,2	n. d.	n. d.	11,6	5,7	0,053	17,9	0,5	<3	n. d.
N	(a+b)/2	9,3	n. d.	n. d.	11,5	5,5	0,060	17,9	0,5	<3	n. d.
NK	a	8,9	n. d.	n. d.	10	3,5	0,053	17,7	0,5	<3	n. d.
NK	b	9,2	n. d.	n. d.	9,9	3,8	0,054	17,8	0,5	<3	n. d.
NK	(a+b)/2	9,1	n. d.	n. d.	10,0	3,7	0,053	17,8	0,5	<3	n. d.
NS	a	4	n. d.	n. d.	10,8	4,1	0,144	17,9	0,5	<3	n. d.
NS	b	4,2	n. d.	n. d.	10,2	3,6	0,141	17,2	0,5	<3	n. d.
NS	(a+b)/2	4,1	n. d.	n. d.	10,5	3,9	0,142	17,6	0,5	<3	n. d.

Segona sèrie

-C: Vi blanc control, sense tractament

-CS: Vi blanc - sulfat de coure (SO₄Cu)

-CK: Vi blanc - Kupzit

-P: Vi negre - control, sense tractament

-PS: Vi negre - sulfat de coure (SO₄Cu)

-PK: Vi negre – Kupzit (K)

Taula 3.10 a Tast i concentració de coure en vins control i tractats amb citrat de coure (K) i sulfat de coure (S)

Mostra	Tast	Coure (després del tractament)	Coure (després de 8 setmanes)
C Control	Reduït fort i persistent persistent	< 0,05 mg/L	< 0,05 mg/L
C SO ₄ Cu	Reduït lleuger	2,30 mg/L	1,95 mg/L
C K	Net	2,27 mg/L	1,80 mg/L
P Control	Reduït, làctic	< 0,05 mg/L	< 0,05 mg/L
P SO ₄ Cu	Làctic lleuger	2,52 mg/L	0,61 mg/L
P K	Tancat	1,43 mg/L	0,29 mg/L

Taula 3.10 b Concentracions de compostos de sofre en vins control i tractats amb citrat de coure (K) i sulfat de coure (S)

Mostra	H ₂ S [µg/L]	MeSH [µg/L]	EtSH [µg/L]	DMS [µg/L]	CS ₂ [µg/L]	MeSAc [µg/L]	DMDS [µg/L]	EtSAc [µg/L]	DEDS [µg/L]
C	3,9	n.d.	2,2	0,9	1,4	18,7	0,7	7,6	n.d.
C S	3,8	n.d.	2,2	1,0	4,4	23,9	0,6	13,5	n.d.
C K	3,6	n.d.	n.d.	1,5	11,5	29,0	0,6	13,2	n.d.
P	6,2	n.d.	3,2	3,2	19,5	45,2	0,6	10,1	n.d.
P S	3,5	n.d.	2,3	3,5	29,7	50,7	0,6	12,0	n.d.
P K	1,4	n.d.	n.d.	3,8	17,0	47,7	0,7	11,0	n.d.

Tercera sèrie

W: vi blanc control sense tractament

WK: vi blanc amb 30 g Kupzit per 100 L, sense àcid ascòrbic

WKA: vi blanc amb 30 g Kupzit per 100 L + 50 mg/L àcid ascòrbic

WS: vi blanc amb 1 g sulfat de coure per 100 L, sense àcid ascòrbic

WSA: 1 g sulfat de coure per 100 L + 50 mg/L àcid ascòrbic

Taula 3.11 a Tast i concentració de coure en vins control i tractats amb citrat de coure (K), citrat de coure i asòrbic (KA), sulfat de coure (S) i sulfat de coure i ascòrbic (SA)

Mostra	Tast	Coure (després del tractament)	Coure (després de 8 setmanes)
W	Reduït fort, herbaci	< 0,05 mg/L	< 0,05 mg/L
W K	Net , neutre	1,66 mg/L	1,67 mg/L
WKA	Molt net, fruita	1,64 mg/L	1,34 mg/L
WS	Lleugerament, herbaci	2,28 mg/L	2,22 mg/L
WSA	Reduït lleuger	2,37 mg/L	2,02 mg/L

Compostos de sofre analitzats: sulfur d'hidrogen (H_2S), metil mercaptà (MeSH), etil mercaptà (EtSH), sulfur de dimetil (DMS), carbonil disulfur (CS_2), metiltioacetat (MeSAc), disulfur de dimetil (DMDS), etiltioacetat (EtSAc), sulfur de dietil (DEDS).

En el vi blanc el tractament amb citrat de coure és igual o més efectiu que el sulfat de coure en la disminució del sulfur d'hidrogen , metil mercaptà i etil mercaptà. També disminueix el DMS, però no disminueixen la resta dels compostos de sofre mesurats. En el vi negre el tractament amb citrat de coure no és tan eficaç com el sulfat de coure en la disminució del sulfur d'hidrogen i no es poden comparar els tiols perquè el vi inicial no s'hi detecten. En canvi un compost de sofre no identificat, augmenta amb el tractament amb sulfat de coure respecte a la concentració inicial i al tractament amb citrat de coure. Els altres compostos estudiats metiltioacetat, dimetil disulfur i dietil disulfur no presenten diferències.

En un altre grup de mostres, en els tasts, els vins tractats amb citrat de coure han quedat nets de notes de sofre igual o millor que les vins tractats amb sulfat de coure i amb igual o menor coure residual. A les anàlisis cromatogràfiques, el sulfur d'hidrogen ha disminuït lleugerament en el vi blanc i en major grau en el vi negre tractat amb citrat de coure respecte al sulfat de coure. L'etil mercaptà ha estat combinat pel citrat de coure tant en el vi blanc com en el vi negre. El sulfur de dimetil i el dimetil disulfur no han disminuït. El disulfur de carboni i el metiltioacetat han augmentat.

En el tercer grup de mostres, el tractament combinat d'àcid ascòrbic i citrat de coure ha permès obtenir vins amb aromes netes i afruitades amb menys coure residual que en els tractats amb sulfat de coure i àcid ascòrbic i sense.

L'anàlisi dels compostos de sofre ha mostrat un efecte sinèrgic de l'àcid ascòrbic i el coure en aquests vins i s'han obtingut concentracions més baixes dels compostos analitzats.

Les proves sensorials realitzades en els vins tractats han mostrat una clara millora en les aromes dels vins. En la descripció dels vins s'ha valorat els defectes individuals i la qualitat global.

Taula 3.11 b Compostos de sofre en vins control i tractats amb citrat de coure (K) de coure i ascòrbic (KA), sulfat de coure (S) i sulfat de coure i ascòrbic (SA)

	Mostra	H ₂ S [µg/L]	MeSH [µg/L]	EtSH [µg/L]	DMS [µg/L]	CS ₂ [µg/L]	MeSAc [µg/L]	DMDS [µg/L]	EtSAc [µg/L]
W	a	2,8	2,3	n.d.	1,6	1,5	16,4	1,1	2,6
W	b	3,5	2,2	n.d.	1,3	1,5	17,5	1,0	3,4
W	(a+b)/2	3,2	2,3		1,5	1,5	17,0	1,1	3,0
WK	a	3,0	2,7	n.d.	1,6	1,3	17,0	0,8	2,3
WK	b	3,8	3,0	n.d.	1,5	1,4	16,5	1,0	3,1
WK	(a+b)/2	3,4	2,9		1,6	1,4	16,8	0,9	2,7
WKA	a	3,0	2,2	n.d.	1,3	0,8	16,4	1,0	2,8
WKA	b	2,2	2,2	n.d.	1,7	1,1	17,0	1,0	3,2
WKA	(a+b)/2	2,6	2,2		1,5	1,0	16,7	1,0	3,0
WS	a	2,2	2,9	n.d.	1,6	1,4	16,2	0,9	3,3
WS	b	2,5	2,8	n.d.	1,7	1,3	17,4	0,9	3,4
WS	(a+b)/2	2,4	2,9		1,7	1,4	16,8	0,9	3,4
WSA	a	n.d.	2,6	n.d.	1,6	0,9	15,5	0,8	2,9
WSA	b	n.d.	2,3	n.d.	1,5	0,9	17,6	1,0	3,0
	(a+b)/2		2,5		1,6	0,9	16,6	0,9	3,0

3. 7 DESCRIPCIÓ DE LES AROMES DEL VI I NOTES TIÒLIQUES

Quan no hi ha defectes, els vins poden mostrar les seves aromes característiques. Les varietats tradicionals estan encara molt poc caracteritzades de manera rigorosa. Per tal d'establir els perfils sensorials d'algunes varietats tradicionals s'està fent una revisió de vins varietals. Per a definir les aromes de la varietat Garnatxa blanca, es va reunir un panell de tast amb la participació de 12 tastadors amb experiència i formació del comitè de tast de la denominació d'origen (D.O.) Terra Alta, entre ells hi ha enòlegs, tècnics del INCAVI i de la Universitat Rovira i Virgili i sommeliers, que porten diversos anys tastant i qualificant els vins de la zona. Es varen tastar tots els vins del mercat qualificats de la D.O. Terra Alta que indiquen a l'etiqueta que estan fets amb Garnatxa blanca. En concret 12 vins del 2009, 4 del 2008 i 2 del 2007. Es va realitzar una sessió prèvia per arribar a un consens entre tastadors i definir els descriptors que millor definien la varietat. Es van realitzar 4 sessions on es tastaven els vins codificats.

Per a l'elecció dels descriptors es va definir una fitxa amb 17 termes: Color, Tonalitat, Aroma Floral, Flor blanca, Fruita pinyol, Fruit cítric, Fruit tropical, Planta fresca, Planta seca, Fruit cuit, Especial, Torrat, Notes làctiques, Gust, Volum, Persistència, i una nota de valoració.

Les notes donades a cada descriptor permeten agrupar els resultats de la següent manera: descriptors que han donat una valor alta en tots els vins i descriptors que han variat entre les mostres. Entre els primers es pot dir que tots els vins tastats tenen una bona nota de coloració, tonalitat, intensitat de gust, volum en boca, persistència gustativa i valoració.

Els descriptors que més van variar entre mostres van ser: notes florals, fruita de pinyol, cítrics, tropical i planta fresca, que van ser més puntuats a les garnatxes joves. Els descriptors especial, torrat i notes làctiques van tenir valors més alts a les garnatxes de cria. Els descriptors planta seca i fruit cuit es van valorar més a les garnatxes dolces.

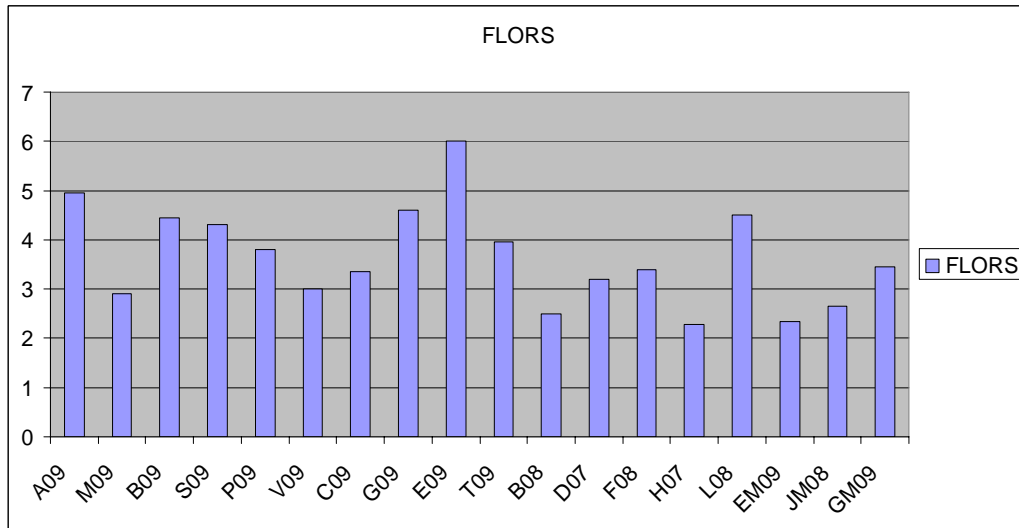


Fig.3.20 c Valoracions del terme “Flors”, en 18 Garnatxes blanques tastades.

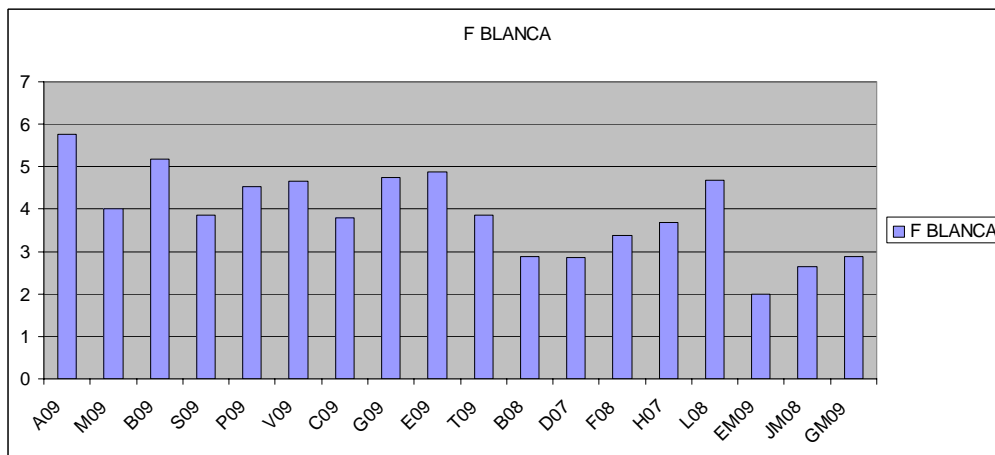


Fig.3.20 b Valoracions del terme “Fruita blanca” en 18 Garnatxes blanques tastades.

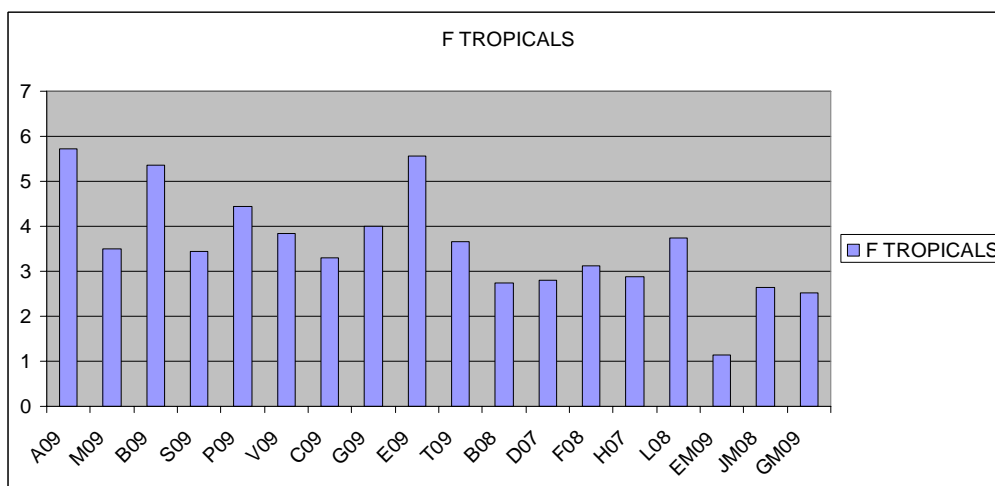


Fig.3.20 c Valoracions dels termes “Fruita tropical” en 18 Garnatxes blanques tastades.

Els caràcters florals es van trobar repartits però amb predomini a les mostres joves com la flor blanca i fruit tropical.

De les dades obtingudes s'observa tres estils de vins: Garnatxa blanca jove, on predomina les notes fresques i florals; Garnatxa blanca de criança amb predomini de notes especiades i torrades; i Garnatxa blanca dolça amb notes de planta seca i fruit cuit.

Descripció de vins de la varietat Xarel·lo

El Xarel·lo és una de les varietats tradicionals de Catalunya. Ocupa més de 8000 Ha., la major part en el Penedès, amb 6000 Ha. Hi ha referències de l'any 1785 a la zona del Garraf i inclús anteriors, del 1680, amb la sinonímia de "pansal". En aquest treball s'han analitzat la majoria de Xarel·los varietals del mercat, 25, tastats com s'ha descrit per a la Garnatxa, per tal de descriure les seves aromes més característiques per anàlisi sensorial descriptiva.

S'ha consensuat una fitxa adaptada al grup de vins amb setze descriptors: Flors blanques, Fruita blanca, Fruita de pinyol, Fruita cítrica, Fruita tropical, Planta fresca, Planta seca, Fruita cuita, Especiada, Torrada, Làctic, Gust a fruita fresca, Volum (gustatiu), Persistència, Intensitat de color i Tonalitat. S'han observat dos estils de vins de Xarel·lo, un jove, fresc floral i cítric, i un altre amb diversos graus de criança, més madur, amb notes torrades i més complexitat.

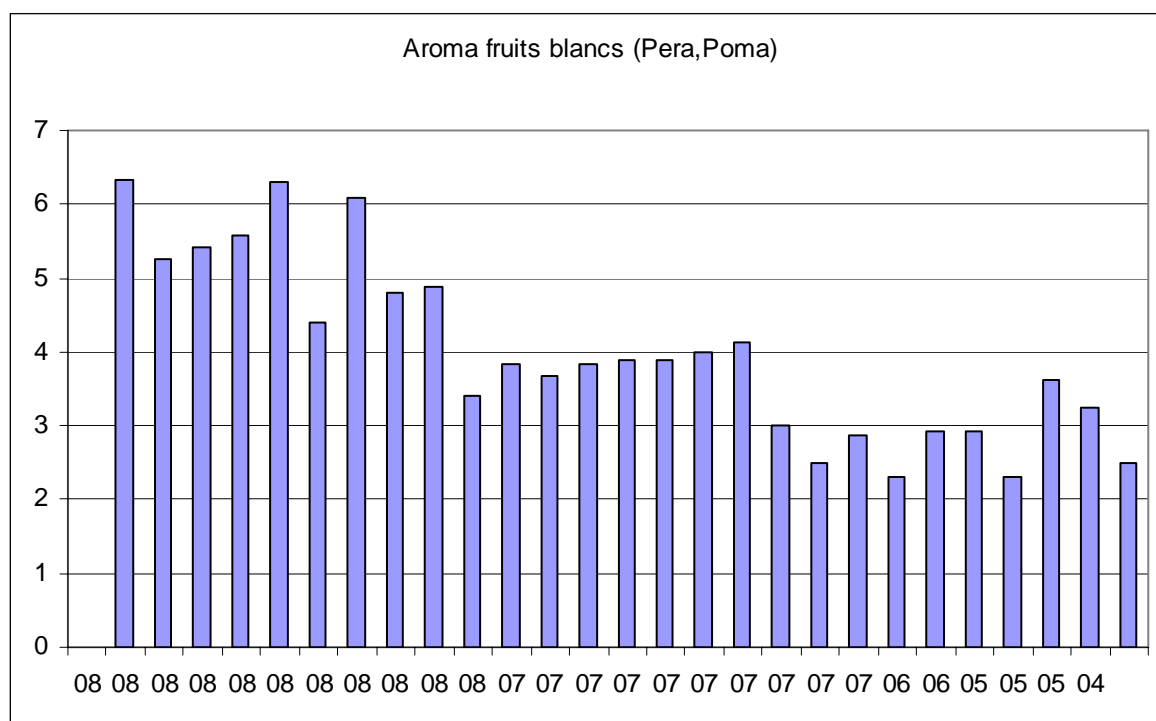


Fig.3.21 a Valoracions del terme "Fruits blancs" en 25 xarel·los tastats.

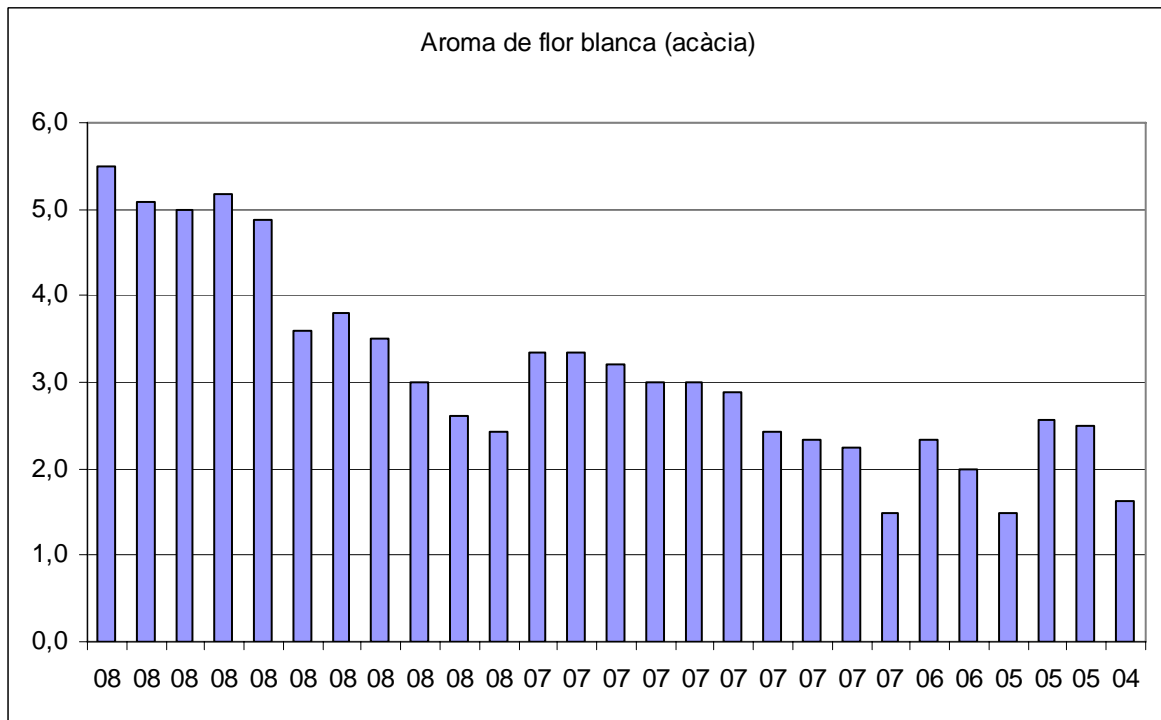


Fig.3.21 a Valoracions del terme “Flor blanca” en 25 xarel.los tastats.

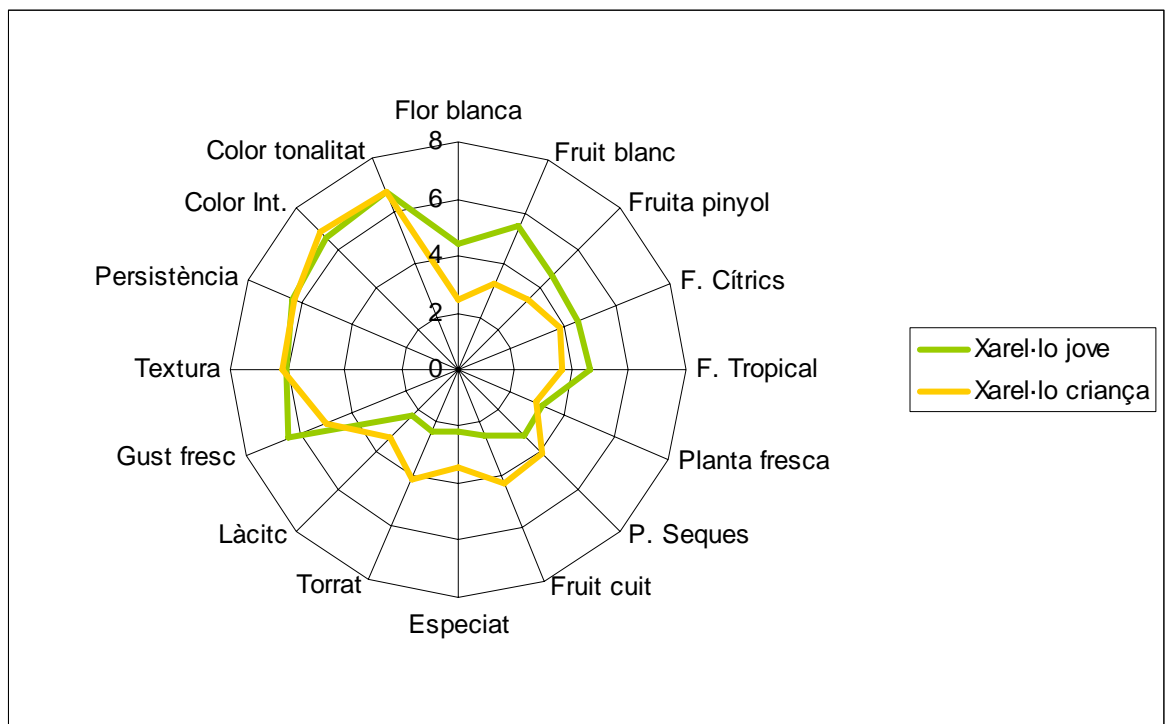


Fig.3.22 Gràfic del resultat de l'anàlisi sensorial descriptiu de 25 vins de Xarel-lo

L'anàlisi de components principals mostra dos components que expliquen el 74% de la variança, El primer (41%) correlacionat amb flor blanca, fruit blanc, fruit de pinyol i gust fresc i el segon (32.7%) correlacionat negativament amb fruit cítric, tropical, persistència, color i tonalita. Veure article Muñoz-Gonzalez et al. 2011 a l'annex.

Descripció de vins de Malvasia de Sitges

La Malvasia de Sitges és una varietat minoritària, de molt renom des de l'edat mitja, cultivada tradicionalment al Garraf, que està emparentada amb altres malvasies aromàtiques del mediterrani. Es pot elaborar, entre altres, com vi de licor, vi sec o escumós. Les seves aromes característiques són les notes de florals taronger i espígol, de fruita groga com el préssec i notes especiades.

Aromes característiques	Garnatxa	Malvasia de Sitges	Xarel·lo
Joves	Flor, fruita blanca i tropical	Flor taronger, fruit groc	Fruita cítrica, flor d'acàcia, fresc en boca
Criança	Torrat, fruita madura	Espígol i espècies	Torrat, espècia, compota

En aquestes tres varietats tastades, Garnatxa blanca, Xarel·lo i Malvasia de Sitges, sensorialment, no s'han trobat aromes relacionades amb els tiols (boix, aranja, fruita de la passió). Les aromes de tipus torrat o vegetal poden venir de la criança o podrien estar relacionades amb compostos de sofre però caldrien estudis més detallats per confirmar-ho.

4. DISCUSSIÓ

La fermentació vínica és un procés biològic utilitzat des d'antic, que s'ha anat convertint en una indústria alimentària important a Catalunya i al Món. El most té molt poques aromes per tant és el metabolisme del llevat, i les seves interaccions amb el most, el que dóna, majoritàriament les aromes al vi jove i revela les característiques de la varietat de raïm, la zona de producció, o possibles defectes. Durant l'elaboració del vi, l'enòleg, segons l'objectiu de vi que vulgui, ha de decidir si sembla llevats i quina soca tria entre les nombroses soques del mercat. Després n'ha de controlar les fermentacions i mirar que siguin correctes i complertes. Des de la verema a l'embotellat, s'ha de vigilar que no hi hagi contaminacions (Boulton et al.1996). Els llevats vínics s'han adaptat durant dècades a les condicions del celler en un procés de domesticació (Querol et al.1992, Bartra 1995, Nadal et al. 1999, Carro et al. 2003) però poden trobar limitacions en el most que poden resultar en fermentacions lentes o defectes (Park et al. 1994). Els compostos de sofre volàtils, com el sulfur d'hidrogen (H₂S), inclús en petites quantitats, poden comprometre la qualitat d'un vi (Ferrari 2002, Moreira et al. 2002, Carrau et al. 2008) i cal prevenir-ne la formació. La dificultat de la mesura dels compostos de sofre volàtils i les diverses causes de la seva formació fan que encara hi hagi diversos aspectes per esbrinar. Es sap que són els llevats que els produeixen (Rankine 1964, Acree et al. 1972, Eschenbruch 1972) però hi ha diversos factors que intervenen com els tractaments de la vinya (Rauhut 1993), contingut de nitrogen (Jiranek et al. 1995), diòxid de sofre afegit al most o deficiències en vitamines (Bohlscheid 2007).

En aquest treball s'ha fet un repàs de diversos aspectes relacionats amb els compostos de sofre volàtils i el seu efecte en l'aroma dels vins. S'han identificat defectes deguts a compostos de sofre per part dels llevats, factors com la soca de llevat i les possibles mancances de nutrients, factors vitícoles i possibles tractaments.

Alguns enòlegs que han treballat a diferents zones (Salgues 2000) consideren que les temperatures elevades indueixen directament o indirecta el gust reduït degut als sulfurs i disulfurs, que es poden formar en vins i vins escumosos. La pressió de l'oïdium a la vinya obliga a fer servir sofre en pols o mullable que, si arriba al celler, és reduït pels llevats. L'alta maduresa i la temperatura alta dels raïms afavoreix un inici de la fermentació. Això fa que hi hagi llevats espontanis, que consumeixen nutrients, empitjoren la decantació i augmenten la terbolesa del most. Les solucions que es proposen per evitar residus de sofre són: evitar tractaments tardans, no fer servir mullables al final de la campanya i despampolar la zona del raïm per afavorir la ventilació. Per reduir les fermentacions espontànies cal collir en hores fresques, reduir el temps de transport, refredar el raïm i el most, i sulfitar.

En viticultura i enologia ecològica, la normativa limita el tipus d'adob que es pot fer servir i els nutrients per llevats. En definitiva els vins ecològics de zones càlides han d'assegurar que els llevats i els mostos siguin compatibles. Per aquest motiu en cas de

dubte pot ser recomanable fer alguns assaigs previs de fermentació a petita escala per preveure el comportament d'una o més soques amb un most determinat.

Si tenim en compte que en fermentacions normals la major part de les cèl·lules poden multiplicar-se sempre que el nivell de nutrients ho permeti i que els nivells d'etanol no siguin inhibidors, cal de cinc a set generacions per a poder aconseguir el creixement de la massa de cèl·lules que hem observat en les nostres condicions.

La formació de H_2S observada coincideix amb la tercera i quarta o amb la quarta i cinquena generacions, abans de començar a mostrar falta d'aliment en algun factor limitador del creixement. En aquest punt, en condicions d'un medi limitant, el llevat pot reduir el nombre de generacions i per tant el nombre de cèl·lules. Sembla que la multiplicació de les cèl·lules en unes condicions limitants està associada a una determinada producció de H_2S . Altres factors que poden induir a canvis en el creixement del llevat, com ara l'addició de mostos a un vi que s'està fermentant, variacions de temperatura, oxigen disponible i addició de nutrients, poden dificultar l'adaptació d'una soca a un medi i induir a la producció de H_2S . L'anàlisi de vitamines seria molt apropiada per a determinar les condicions reals dels nutrients. Una conseqüència de la variabilitat observada en la formació de sulfur d'hidrogen entre soques fa que sigui recomanable estudiar cada soca per predir la seva resposta en un medi concret.

L'exhauriment de metionina podria ser un dels factors que desencadena la producció de sulfur. La metionina es pot sintetitzar a partir de sulfat i d'altres aminoàcids, per la qual cosa és molt probable que les vitamines i altres cofactors necessaris en quantitats menors, però necessaris per a vies metabòliques més generalitzades, siguin els responsables del desencadenament de sulfurs. L'àcid pantotènic com a part del coenzim A juga diverses funcions, entre d'altres, en el metabolisme d'àcids grassos i de proteïnes i també és responsable de la permeabilitat de les membranes del llevat, tal i com passa en condicions aeròbiques als mitocondris i al nucli que les cèl·lules. El llevat que té poc àcid pantotènic i que creix en un medi que conté sulfat d'amoni com a única font de nitrogen, mostra la mort de cèl·lules immadures amb nuclis sense gemma (Shimada 1972). Aquests fets poden indicar que l'addició d'amoni no resoldrà la producció de sulfur quan el factor limitador és el pantotenat. Les dificultats que hi ha per a mesurar l'àcid pantotènic i la possibilitat que les soques requereixin àcid pantotènic, deixa el tema parcialment per resoldre. És important observar que els requisits de pantotenat per al vi comercial no es coneixen. Per altra banda, un gran nombre de referències, especialment en la cervesa, mostren un efecte positiu del pantotenat, especialment en el metabolisme del llevat, amb èmfasi especial a la multiplicació, ús del sulfat i a la síntesi de metionina i leucina.

La reducció de disulfur també està implicada en la paret cel·lular associada a la formació de pseudo queratina i, per tant, també a la divisió de les cèl·lules. L'addició de sofre elemental provoca una major formació de H_2S , però acompanyada de metatiol, que pot reaccionar per sí mateix amb sofre elemental i produir H_2S . Se sap també

que el glutatió (GSH) reacciona amb el sofre elemental i produeix H₂S (Roy 1970). En la nostra solució model no s'afegeix GSH, però el most sí que en conté i el llevat produeix grans quantitats que també es segreguen en determinades condicions.

Durant la fermentació del vi, els resultats indiquen que la formació de sulfur al principi de la fermentació probablement és deguda a l'existència de condicions d'inòcul inadequades o d'un most amb alguna deficiència. L'evolució del sulfur a la meitat de la fermentació indica l'exhauriment dels nutrients disponibles. La producció de sulfur al final de la fermentació pot ser deguda a la conversió de disulfurs i tiols, a l'efecte del tiol sobre el sofre elemental o la formació tardana de H₂S que no s'elimina mitjançant l'efecte d'escombratge de CO₂.

Els compostos de sofre volàtils que més sovint s'han detectat durant l'estudi del vi, són el dimetil sulfur (DMS) i el SO₂. Alguns dels vins que s'han enviat per ésser analitzats perquè sembla que fan mala olor o que tenen problemes de sofre, no mostren sempre sofre volàtil per sobre dels nivells esperats, la qual cosa suggereix que l'origen de la mala olor és un altre, que no està relacionat amb el sofre o que està per sota els nostres límits de detecció. Alguns vins mostren nivells més alts que la mitja de compostos de sofre volàtils, fet que suggereix un possible efecte d'aquests compostos a l'aroma del vi, que també pot estar emmascarada per altres components del vi.

Alguns vins tractats amb coure o coure i àcid ascòrbic, generalment no mostren diferències quant als compostos volàtils analitzats, ni diferències sensorials òbvies, la qual cosa indica la dificultat d'eliminar les males olors en els vins acabats. És molt important tenir un millor coneixement d'aquests compostos de sofre i dels mètodes preventius per tal d'evitar aquests defectes en el vi.

Alguns vins es descriuen com a "sulfurosos", "de sofre", "torrats", mentre que d'altres només mostren poca aroma en general, o poden ser afruitats o amb espècies, però sense cap problema detectable. Els descriptors que s'utilitzen més sovint són "vegetal", "verdures cuites", "ceba", "col", relacionats amb el DMS, l'età tiol i el metà tiol, el DMDS i el DEDS. Aquests compostos es troben en molts dels vins estudiats.

Cal fer més recerca per tal de millorar les condicions cromatogràfiques per poder dur a terme una anàlisi més ràpida i més completa, especialment en la resolució del H₂S i de l'SO₂ i en la identificació del pic U1 desconegut. La identificació d'altres compostos desconeguts millorarà la possibilitat de fer altres treballs relacionades amb les vies del metabolisme del sofre. El control de les vitamines i del sulfat, fosfat i altres anions relacionats, ajudarà a determinar altres factors en la producció de sofre volàtil. La conversió de sulfurs i tiols, inclòs el glutatió al final de la fermentació i durant el procés d'envelliment, obre les portes a un estudi molt interessant i complementari sobre els compostos de sofre volàtils que permetrà entendre la producció del vi des d'un punt de vista analític i sensorial. Un altra aspecte a estudiar és la producció de sulfits per les seves conseqüències legals i de salut (Dott et al. 1977, Dott i Troper 1978, Heinzl i Troper 1978, ITV France 2003).

Als darrers anys s'ha anat seqüenciant el DNA de diversos organismes, entre ells el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, contribuint a l'avanç de la genòmica. Podem dividir la genòmica en dues categories, la estructural i la funcional. La genòmica estructural estudia la caracterització i localització de les seqüències que constitueixen els gens i la genòmica funcional estudia les tècniques que permeten avaluar les funcions dels gens. Aquests estudis van acompanyats de sistemes de processat d'un nombre important de dades (Pfaffl et al. 2002). Amb la genòmica funcional es vol anar completant la relació entre gens i funcions i entendre millor el funcionament d'organismes i comunitats biològiques, no estudiant un sol gen si no el conjunt de gens d'una població de la mateixa espècie. Els microxips de DNA són, actualment, una eina important per a la recerca en genòmica. Ens poden donar informació de les funcions activades, quin processos estan en procés, l'expressió en diferents moments, condicions ambientals o diferents tipus de cèl·lules. Un microxip de DNA està fet amb un nombre gran de molècules de DNA ordenades sobre un suport de vidre o niló de manera que fan una matriu ordenada de seqüències en dues dimensions. Aquestes molècules de DNA poden ser fragments curts, oligonucleòtids o més llargs, cDNA, DNA complementari sintetitzat a partir del RNA missatger o altres productes amb DNA. Els fragments immobilitzats s'anomenen sondes. Els àcids nucleics que volem analitzar es marquen amb fluorescència o radioactivitat i es posen en contacte amb les sondes i es deixa un temps d'incubació perquè s'uneixin les seqüències homòlogues durant la hibridació. La identificació i quantificació del DNA de la mostra es pot fer a partir dels àcids nucleics marcats units a les sondes. Amb programes informàtics s'analitzen les imatges obtingudes després de la hibridació i se n'obtenen les dades (Alberola et al. 2004).

En aquest treball s'han fet servir dos tipus de xips per a analitzar l'expressió gènica diferencial. Està basat en una hibridació entre una mostra marcada amb un fluorocrom Cy3 i una altra mostra marcada amb un altra fluorocrom Cy5. Es fa l'extracció del RNA de les mostres, el marcatge amb un fluorocrom de cada mostra i després la hibridació.

Els resultats dels microxips tenen una gran variabilitat entre experiments i per això es recomana fer tantes rèpliques biològiques com tècniques. El marcatge diferencial permet analitzar dues mostres en un xip i per tant les dues mostres estan en les mateixes condicions, evitant possibles diferències derivades d'utilitzar diferents xips per les dues mostres. En aquest cas les rèpliques s'han fet utilitzant mostres independents en diferents xips, per tant són rèpliques biològiques. Amb aquest mètode es pot perdre en precisió, però es guanya en representativitat, en aquest cas per comparar dues poblacions o soques diferents. El marcatge s'ha fet indirecte, o sigui, s'han incorporat nucleòtids modificats amb un grup amino al·lil durant la síntesi del cDNA i després s'incorpora un derivat del fluorocrom per reacció química.

Els gens *THI4* codifiquen una proteïna de la síntesi de hidroxil etil tiazol, *THI6*, fosforilació del hidroxil etil tiazol i síntesi de tiamina monofosfat, *PHO3* codifica una

fosfatasa periplasmàtica que permet l'entrada de tiamina que només és possible en la forma desfosforilada.

La formació de sulfur d'hidrogen per part del llevat durant la fermentació, ha estat un problema durant molts anys a l'enologia. S'han fet molts esforços en fer fermentacions amb medis diversos amb aminoàcids, diferents soques de llevat i altres factors alhora que es mesurava el H₂S. Les eines genètiques actuals permeten una nova perspectiva de la fermentació, estudiar quins gens s'activen en un període, quins enzims codifiquen i entendre millor el funcionament dels organismes, en aquest cas el llevats (Goffeau et al. 1996, Beltran et al. 2006, Borneman et al. 2008, Jimenez-Martí et al. 2008). Per altra banda, les eines genètiques estan dissenyades per a soques de laboratori i no encaixen directament amb soques industrials (Carreto et al.2008, Dunn et al.2005). Per tal d'evitar aquest problema s'ha fet un triple sistema d'anàlisi, mirant primer tots els gens amb dos sistemes complementaris i confirmant per qRT-PCR els gens identificats.

Perquè els llevats sobre expressen aquests gens d'aquesta manera? És xocant que l'expressió d'un gen regulador com *THI2* augmenti 10 vegades en una soca amb el mateix medi que una altra. L'expressió dels gens del grup del THI és en la mateixa direcció, però la intensitat varia bastant entre gens. Alguns estudis (Nosaka 2005, Rodriguez-Navarro 2002) apunten a *Thi3p* com a sensor de la concentració de TDP intracel·lular. Entre UCD522 i P29 potser hi ha diferències deguts als requeriments de tiamina, ja que en les mateixes condicions UCD522 expressa els gens implicats en la seva síntesi i P29 no. La manca de tiamina pot venir del most, del consum per microorganismes contaminants com altres llevats, fongs, tractaments per calor i l'efecte del diòxid de sofre que és un antioxidant utilitzat normalment en els mostos. Des del punt de vista de l'evolució, els llevats tenen la particularitat que conserven fins a quatre enzims redundants en la síntesi d'hidroximetil pirimidina, precursor de la tiamina (*THI5*, *THI11*, *THI12* i *THI13*). La conservació d'aquests gens i altres relacionats, suggereix una forta dependència de la tiamina en el metabolisme de les soques víniques. Això pot estar relacionat amb el paper de la tiamina pirofosfat com a cofactor de la piruvat descarboxilasa, un punt clau de la fermentació alcohòlica.

En altres estudis (Linderholm et al 2008, Spiropoulos et al. 2000) amb soques de llevats productors de H₂S els gens més expressats són de la família dels MET, relacionats amb la reducció de sulfats i síntesi de metionina. En el nostre estudi sembla que a banda de la regulació per manca de nitrogen amínic FAN o metionina, hi ha una necessitat de tiamina prioritària, necessària per el tercer pas de la fermentació alcohòlica; aquesta necessitat dispara els gens dels enzims de síntesi de la tiamina que també exigeix un àtom de S en la seva formació. Altres autors havien esmentat la deficiència de vitamines com factor de formació de H₂S però apuntaven l'àcid pantotènic o la piridoxina (Wang et al. 2003, Edwards i Bohlscheid 2007, McCready et al. 1979, Kuraishi 1966, Slaughter i McKernan 1988). La tiamina també s'havia estudiat però de manera limitada (Bataillon et al. 1996). La síntesi de tiamina a *Saccharomyces* presenta quatre proteïnes redundants funcionalment (Whigman i

Meacock 2003) el que podria indicar la importància d'aquesta vitamina evolutivament i metabòlica en aquest llevat.

La tiamina en la forma de tiamina difosfat (TDP) és un cofactor per molts enzims necessaris pel metabolisme de la glucosa com la piruvat descarboxilasa, 2 oxoglutarat deshidrogenasa, transcetolasa i altres. La TDP també és un senyal negatiu a la regulació gènica com metabòlit lligant amb el RNA (Brantl 2004) i combina amb la proteïna del sistema de regulació de la tiamina.

En alguns casos, tant als mostos com a les solucions model, a les primeres etapes de la fermentació es formen sulfurs orgànics i tiols, especialment DMS. Diferents llevats produeixen diferents nivells de compostos de sofre. Durant la fermentació, el sofre elemental afegit a la solució model produeix tiols, a més a més de H₂S, això confirma i afaegeix informació al treballs anteriors (Lawrence i Cole 1968, Marais 1979, Matsui 1981)

La part analítica i sensorial dels vins amb compostos de sofre d'un estudi industrial, mostra que en un cinquanta per cent dels casos es detecten valors superiors als llimars per a un o més compostos de sofre volàtils. L'altre cinquanta per cent no es detecten compostos de sofre perquè no hi són o perquè estan per sota del límit de detecció. Es confirmen i completen revisions anteriors (Leppanen et al. 1980, Nykanen i Suomalainen 1983, Spedding et al. 1980)

Les condicions cromatogràfiques són molt importants per detectar els compostos de sofre en el rang dels micrograms per litre amb reproductibilitat. El diòxid de sofre pot interferir en l'anàlisi del sulfur d'hidrogen a les columnes HP-1 amb i sense "cryofocusing" i dona un artefacte a la columna GS-Q. S'ha contribuït a millorar la tècnica i sensibilitat (

Entre els factors vitícoles, s'ha estudiat l'efecte del reg i alternatives al sofre en pols. El potencial hídric de la planta ha estat una bona eina per programar el reg i permet adaptar-se a les particularitats de cada parcel·la de vinya i estalviar aigua. El reg deficitari permet disminuir la mida del gra de raïm i augmentar la concentració de sucres i polifenols, donant un potencial qualitatiu més alt. L'aplicació del reg deficitari pot reduir les reserves de la planta i tenir conseqüències de menor producció en els anys posteriors i per tant, s'ha de valorar el seu ús cada any en funció del precedent i dels criteris qualitatius i el valor del producte que es vol obtenir. La limitació de l'aigua també ha donat una menor concentració de nitrogen que pot influir en la formació de compostos de sofre si no es corregeix .

En l'assaig d'alternatives al sofre es va mostrar algun efecte de protecció dels olis vegetals usats per controlar l'oïdi que coincideix amb resultats d'un estudi anterior dut a terme amb diferents varietats de raïm (Silvarrey et al.)

L'oli vegetal (oli de gira-sol ecològic) al 2% va tenir un cert efecte protector en la vinya contra l'oïdi. Els vins obtinguts després del tractament amb oli de gira-sol,

tenien la mateixa puntuació que els vins de referència. El sulfur d'hidrogen va ser menor en el vi de raïm tractat amb oli.

El tractament amb llevat va tenir un cert efecte protector contra l'oïdi. Els vins obtinguts després d'un tractament amb llevat van tenir menor H_2S que els vins procedents de raïm tractades amb sofre en pols.

Les estratègies per reduir el sofre en pols a la vinya i reduir la producció de H_2S en els vins ecològics poden incloure alguns dels tractaments amb oli vegetal diluït o una suspensió amb llevat, però el sofre en pols no pot ser eliminat d'un programa de tractament contra l'oïdi en condicions altes de pressió de la malaltia. El sofre en pols va ser el millor tractament per al control d'oïdi en viticultura ecològica en comparació amb l'oli vegetal i llevat.

Les experiències en tractaments del vins van mostrar un bon comportament del nou producte formulat a partir de citrat de coure. Els tractaments autoritzats pels vins amb defectes de reducció són el sulfat de coure i recentment, el citrat de coure. En altres països també es pot fer servir el clorur de plata, però el seu ús és minoritari. En aquest treball s'han fet experiències amb citrat de coure comparant amb sulfat de coure. En casos de vins amb disulfurs, la forma oxidada d'alguns tiols, ha anat millor el tractament previ amb àcid ascòrbic i després amb el citrat o sulfat de coure. L'àcid ascòrbic, també està autoritzat per a la correcció de l'acidesa del vi i com antioxidant. Els vins tractats han millorat però s'elimina completament els compostos de sofre volàtils, això reforça la idea que és millor prendre mesures preventives des de la vinya, la selecció i nutrició dels llevats, i les operacions enològiques de seguiment correctes per evitar els olors dels compostos de sofre volàtils negatius i permetre la màxima qualitat sensorial del vins.

5. CONCLUSIONS

1. En vins amb defectes s'han descrit aromes de reduït, olor a llevat, als sediments del vi, col bullida, ceba, all, porro, goma cremada i llumí cremat. En 57 vins es va trobar DMS, DEDS, EtSH i/o MeSH amb valors per sobre dels llindars de detecció sensorial.

2. El H₂S es va formar a la majoria de les fermentacions dutes a terme. Es pot formar en dues etapes, al principi o al final de la fermentació. També s'han format altres compostos com DMS, SO₂ i EtSH.

3. En la comparació de soques comercials realitzada, 60% de les 140 soques estudiades donen quantitats de H₂S entre 0.2 i 13 mg/L. La formació de diòxid de sofre ha variat entre 5 i 50 mg/L. En 49 soques es van formar 30mg/L o més de SO₂.

Es proposa un sistema senzill, manual a l'abast dels cellers per comparar la producció de sulfur d'hidrogen (H₂S).

4. En l'estudi del transcriptoma de dues soques de llevat, els gens del grup de la tiamina *THI1*, 2, 4, 5, 10 tenen una clara sobreexpressió (10 vegades) a la soca UCD522, alta productora de H₂S respecte a la soca P29, baixa productora de H₂S. Per tant el contingut de cofactors del most és important per a la formació de compostos de sofre com el sulfur d'hidrogen. La selecció de llevats pot incorporar aquest tret genètic per evitar defectes de sulfurs en el vi.

5. En els aspectes de cultiu de la vinya, el reg deficitari ha donat una menor concentració de nitrogen que pot generar formació de sulfur en el llevat. Les alternatives als pesticides per evitar la formació de compostos de sofre volàtil, oli i llevat han permès reduir la producció de sulfur d'hidrogen respecte al sofre en pols, però no tenen l'eficàcia antifúngica del sofre en pols.

6. El tractament amb citrat de coure disminueix els defectes derivats de compostos de sofre en la mateixa proporció, o més, que el sulfat de coure. Després del tractament amb citrat de coure, els continguts residuals de coure han estat iguals o menors que en els vins tractats amb sulfat de coure. Els compostos de sofre eliminats pel citrat de coure han estat el sulfur d'hidrogen i l'età tiol; quan el tractament ha estat precedit amb àcid ascòrbic també han disminuït els disulfurs com el dimetil disulfur.

7. Els vins de varietats tradicionals analitzats es poden agrupar entre els joves amb notes florals i fruita fresca i els que tenen algun tipus de criança amb notes de compota i espècies. No s'han trobat descriptors tipus boix o aranja, típics de les aromes tiòliques a la Garnatxa blanca, Malvasia de Sitges o Xarel·lo.

6 MATERIALS I MÈTODES

6.1 Anàlisi de compostos de sofre volàtils en els vins

Es van analitzar setanta set vins procedents de dinou cellers de Califòrnia. Entre ells hi havia 32 Cabernet Sauvignon, 19 Pinot noir, 7 Merlot, 7 Chardonnay, 7 Sauvignon, i 1 mostra de Petit Sirah, Chenin blanc, Semillon i Tokay.

Anàlisi per Cromatografia de gasos:

Els compostos volàtils de sofre es van analitzar per cromatografia de gasos (Spedding et al. 1983, Simpson 1979) equipat amb un detector fotomètric de flama (FPD) de Hewlett Packard HP5890 Series II. La columna era HP-1 de 30 metres per 0.53 mm, amb recobriment intern de 0.88µm. Cinquanta mil·lilitres de vi es posaven en vials de 120 ml que s'havien omplert prèviament de nitrogen gas i es tapaven amb un sept de tefló. S'afegia EtilMetilsulfur (EMS) com estàndard intern a 41 µg/L. Es va deixar les mostres 30 minuts d'equilibri a la temperatura del laboratori, es treien 0.2ml de la fase gasosa o espai de cap i injectada en sense divisió o splitless després d'una estona de condensació en fred o criofocusing amb 20 cm de la columna submergida en nitrogen líquid. Després de la injecció es treia el nitrogen líquid i es mantenia la temperatura de la columna a 35°C durant quatre minuts. A continuació s'incrementava la temperatura 30°C per minut fins 230°C. La temperatura de l'injector i detector es mantien a 170°C i 200°C respectivament. Pel detector, el flux d'hidrogen era de 72 ml/min i 96 ml/min d'aire. El gas transportador era Heli a 4ml/min. Els estàndards eren productes de Eastman Chemical, Rochester Nova York. Metà tiol (MeSH), Età tiol (EtSH), Sulfur de dimetil (DMS), i Dietil disulfur (DEDS) van ser identificats per comparació dels temps de retenció dels estàndards i quantificats amb corbes patró per cada compost.

6.2-.4 Formació de compostos de sofre volàtils durant la fermentació

Fermentacions preliminars. Kitasato de 300 ml amb un tap de fermentació a la part superior i una membrana per a l'espai de cap de mostra a l'obertura lateral. S'utilitza per a les proves preliminars abans de passar a fermentadors més grans.

Per lots, most F1-F16 Fermentadors New Brunswick de 14l amb o sense agitació. Són adequats per a les fermentacions per lots però no per a les fermentacions continuades a causa de l'alt volum de solució d'alimentació necessari.

Per lots, solucions model F7, F8, B1-B5 Bioreactor de borosilicat Applikon 11 BTS1 amb fons arrodonit amb velocitat controlada per remenar. És adequat per a volums d'un litre i inferiors, en fermentacions per lots i contínues.

Es duen a terme fermentacions continuades als mateixos fermentadors amb un sistema d'alimentació subministrat per una bomba peristàtica de Coleman amb tubs masterflex per a l'alimentació i per a eliminar del sobreeiximent. El medi d'alimentació s'emmagatzema en

ampolles de 2 l que tenen un filtre de membrana de 0,2 µm, per a aconseguir l'equilibri de pressió. El medi d'abastiment es filtra mitjançant un filtre de membrana de 0,2 µm però no és fàcil mantenir l'esterilitat del medi i es realitzen altres filtracions quan és necessari amb la mateixa porositat (Watson 1966, Portno 1968, Berry i Chamberlain 1985, Brown i Johnson 1970, Endo et al. 1981).

Medis de fermentació

Solució model A deficient en vitamines

4 g medi bacto sense vitamines (Difco)

22 g glucosa

22 g fructosa

0,75 g bitartrat de potassi

250 ml aigua destil·lada

Solució model B amb vitamines

El medi B estava format per una base de vitamines adequada a partir de "Base de nitrogen de llevat sense amoni" (Difco) i amb un conjunt d'aminoàcids per poder reproduir la composició de mostos de raïm que havien originat defectes de sofre. També es facilita un medi amb un 10% de glucosa i fructosa, i amb bitartrat de potassi i pH 3.3; tots els medis es filtren mitjançant filtres de membrana de 0,2 µm i s'afegeixen 15 mg/L de SO₂.

100 g/L glucosa

100 g/L fructosa

17 g/L base de nitrogen de llevat sense amoníac

pH 3,3 ajustat amb bitartrat de potassi i àcid tartàric

SO₂ 15 mg/L

Els mostos de Cabernet Sauvignon i de Chardonnay de la Vall de Napa (Califòrnia) i de Chenin Blanc de Davis (Califòrnia) s'han conservat a una temperatura de 0° C abans de les fermentacions.

Mostos utilitzats en els experiments (Experiments F1 a F6)

F1: Chenin blanc / Sauvignon blanc, Davis 1988

F2: Cabernet Sauvignon amb pell, Vall de Napa 1989

F3: Chenin blanc / Sauvignon blanc, Davis 1988

- F4: Chardonnay, Vall de Napa 1989
- F5: Cabernet Sauvignon, most, Vall de Napa 1989
- F6: Chenin blanc / Sauvignon blanc, Davis 1988

Procediments de la fermentació

S'inicia una fermentació preliminar (FP) amb una solució model (A) deficient en vitamines abans que hi hagi bioreactors disponibles. Només es duu a terme una anàlisi d'espais de cap. Totes les fermentacions es fan a la temperatura ambient, ~25° C.

Es realitzen dues fermentacions per lots de 5L en dos fermentadors New Brunswick, un es remena i l'altre no. El mètode utilitzat és l'F1: most de raïm de 1988 de Chenin blanc/Sauvignon blanc de Davis, filtrat, amb addició de sulfít i emmagatzemat a 0°C, de la darrera verema.

La resta de fermentacions es realitzen en tres bioreactors BTS1 Aplikon de fons arrodonit d'11 on es regula l'agitació. Es creen mostres d'espai de cap mitjançant una membrana en un orifici de la coberta. Inicialment, es prenen mostres de líquid com a mínim cada dia, i més endavant es fa cada dos dies. Després, es filtren mostres de mesures d'absorció mitjançant filtres de membrana de 0,2 µm i refrigerades o congelades abans de fer-ne l'anàlisi detallada (amino àcids, sucres, etanol, etc.) (Fernández-Anero 1990).

Organismes de fermentació: llevats de vi deshidratats actius

Tipus *Saccharomyces cerevisiae*: s'utilitza Montrachet UCD 522 en la major part d'experiments, i també s'utilitza Prise de Mousse UCD 796, Pasteur Champagne UCD 595, (de Red Star) i Penedès 29 seleccionat a l'Institut Català de la Vinya i el Vi (Vilafranca del Penedès). Les fermentacions s'inoculen als nivells recomanats: (250 mg/L). Els llevats es rehidraten a una temperatura de 38°C durant 15 minuts.

Taula 6.1 Resum de les fermentacions realitzades

Codi de fermentació	Medi	Fermentador	Tipus de llevat
PF	A	Kitasato B	UCD522
F1	Chenin blanc	Applikon B	UCD522
F2	Cabernet Sauvignon	Applikon B	UCD522
F3	Chenin blanc	Applikon B	UCD522
F4	Chardonnay	Applikon B	UCD522
F5	Cabernet	Applikon B	UCD522

	Sauvignon		
F6	Chenin blanc	Applikon B	Penedès 29
F7 i F8	B	Applikon C	UCD522
B1	B	Applikon B	UCD522
B2	B	Applikon B	UCD522
B3	B	Applikon B	UCD522
B4	B	Applikon B	Prise de mousse
B5	B	Applikon B	UCD522
C1-C4	B	Applikon C	UCD522
C5	B	Applikon C	Pasteur Champagne
C6	B	Applikon C	Penedès 29

Creixement de les cèl·lules:

La població de llevats es va seguir per la densitat òptica amb un espectrofotòmetre Bausch&Lomb Spectronic 21 a 580 nm. La dilució de les mostres es fa amb una pipeta Pipettman amb aigua destil·lada i homogeneïtzada en un mesclador vòrtex.

El pes en sec de les cèl·lules del llevat es va calcular al final de la fermentació. El llevat i el filtre pesat amb anterioritat, es deshidraten al microones abans de mesurar el pes.

Substrat i composició del producte:

La glucosa, la fructosa, el glicerol i l'etanol es mesuren amb un HPLC en un sistema modular Bio-Rad amb un detector de l'índex refratomètric; la columna era iònica de calci HPX-87C (Bio Rad), amb una velocitat de 0,6 mL/min, a una temperatura de 85°C amb aigua desionitzada com a fase mòbil. Les dades de l'HPLC s'enregistren en un integrador C-R3A Chromatopac (Shimadzu).

Cromatografia de gasos

S'analitzen els compostos de sofre volàtil mitjançant un mètode GC-FPD d'espai de cap estàtic. Durant els primers períodes de fermentació es prenen mostres cada dia, i més endavant cada dos dies, fent servir una xeringa hermètica als gasos (Hamilton) amb una vàlvula de Tefló i s'injecten 0,2 mL al cromatògraf.

Mètode A (columna farcida)

Cromatògraf de gas Hewlett-Packard 5890 Series II equipat amb FPD i amb un ordinador IBM PC per a processar les dades. S'utilitza la cromatografia de gasos equipada amb un detector fotomètric de flama (FPD) HP 18805 en la modalitat de sofre. La columna era de 2 m x 3,18 mm. ID, de Tefló (Alltech) empaquetada amb 60/80 Carbopack B (Supelco). Es van optimitzar les condicions operatives.

Taula 6.2 Condicions cromatogràfiques del mètode A

Nitrogen portador:	35 ml/min
Hidrogen :	75 mL/min
Aire:	50 mL/min
Oxigen:	10 mL/min
Programació del forn:	35°C durant 3 min
velocitat:	4°C/min
temperatura final:	110°C
Temperatura d'injecció:	60°C
Temperatura del detector:	200°C
Volum d'injecció:	0,5 mL

Per tal de minimitzar el contacte amb el metall de la mostra, s'empeny la columna de Tefló a través de l'injector cap a la part superior on hi ha la membrana, de manera que la mostra s'injecti directament a la columna. L'altre contacte amb el metall, el revestiment entre el final de la columna i el detector no es pot evitar, i podria ser una millora significativa per al conjunt. Una de les limitacions principals d'aquest sistema és l'integrador, que també controla l'operació de cromatografia del gas, ja que els seus paràmetres per a la integració no són prou flexibles per a mesurar els pics petits o amples, la qual cosa limita la interpretació de l'alçada o càlcul dels pics.

Identificació amb el mètode A. S'utilitzen diversos estàndards per a la identificació o càlcul de les puntes. Es dilueix età tiol (EtSH), sulfur de dimetil (DMS), sulfur d'etil metil (EMS), disulfur de dimetil (DMDS) i disulfur de dietil (DEDS) (Kodak) en etanol per a fer una reserva i en una barreja de 12% etanol/aigua per als estàndards. La manipulació s'ha de fer en una campana amb un extractor i allunyat d'àrees per on s'hi passa sovint ja que es desprenen olors repulsives de gas domèstic. Es prepara H₂S per poder dur a terme la identificació tot barrejant NaS amb HCl diluït als mateixos flascons de 100 mL fets servir per a l'anàlisi. Es prepara SO₂ a partir de les solucions d'aigua al 5% utilitzades per fer el vi. Es prepara metà tiol (MeSH) amb metionina i K₂S₂O₅ i ferro (Wainwright, 1971). Tots els compostos esmentats s'han identificat de manera efectiva i s'han pogut separar durant l'experiment.

Mètode B (columna capil·lar HP-1)

Cromatògraf de gas Hewlett-Packard 5890 Series II equipada amb FPD i amb un ordinador IBM PC per a processar les dades. La pantalla del cromatograma, la integració de les puntes i el procés de dades s'obté fent servir el programari Maxima 820 (Waters). Es prova la columna HP-1 d'un diàmetre interior de 0,52 en 10 m, 30 m sense cryofocusing, i 30 m amb cryofocusing, submergint la part inicial de la columna en nitrogen líquid.

Taula 6.3 Condicions cromatogràfiques del mètode B

Portador (Heli) :	15mL/min.
Nitrogen:	35 ml/min.
Hidrogen:	75 mL/min.
Aire:	50 mL/min.
Programació de forn:	35°C durant 3min.
velocitat:	10° C/min.
temperatura final:	110°C
Temperatura d'injecció:	60°C
Temperatura del detector:	200°C
Volum d'injecció:	0.2mL

La membrana de l'injector tendeix a perdre flexibilitat i les partícules petites poden caure al revestiment d'injecció de vidre; poden arribar i obturar la columna. A més a més de comprovar la membrana i de canviar-la per una altra, per tal d'evitar aquests problemes es connecta una columna d'un metre amb un connector de vidre al principi de la columna, que es pot substituir fàcilment. Es proven altres tècniques, com ara la col·locació de filtre de llana de vidre a l'interior del revestiment.

Identificació per al mètode B. Es proven els mateixos compostos que s'han esmentat al mètode A. El H₂S i l'SO₂ no se separen de manera satisfactòria; no obstant això, es milloren els nivells de detecció i la resolució per als compostos menys volàtils (MeSH, EtSH, DMS, etc). També es redueix el temps d'anàlisi, especialment a la longitud 10 m. Sembla que la resolució que s'obté amb "Cryofocusing" és millor per a la major part dels components. Les possibilitats de representació de dades, emmagatzematge i processament de fitxers són avantatjoses, malgrat el llarg període de formació que cal seguir per poder utilitzar el programa Maxima.

Mètode C

(Columna capil·lar GS-Q) Les mateixes condicions que al mètode B. Columna: GS-Q (J&W científic) 30 m.

Taula 6.4 Condicions cromatogràfiques del mètode C

Portador Heli:	15mL/min
Nitrogen :	35 ml/min.
Hidrogen:	75 mL/min.
Aire:	50 mL/min.
Programació del forn:	35°C durant 3min
Índex:	10°C/min.
Temperatura final:	110°C
Temperatura d'injecció:	60°C
Temperatura del detector:	200°C
Volum d'injecció:	0,2 mL

Identificació per al mètode C: es proven extensament els mateixos compostos que s'han utilitzat als mètodes anteriors. El H₂S i l'SO₂ donen un temps de retenció similar, però l'SO₂ té com a mínim una desena part de la resposta del H₂S i, a altes concentracions, fa una cresta a la segona meitat del cromatograma. També s'observa un arrossegament a la línia base quan la temperatura de la columna és superior als 190°C.

Preparació d'estàndards

S'utilitzen estàndards i barreges de gas calibrades a baixes concentracions (10mg/L) en nitrogen per als compostos més volàtils per tal d'obtenir resultats més exactes i per raons de seguretat. Altrament, s'utilitzen estàndards de líquids de grau analític tal i com s'ha dit abans, tenint molta cura quan s'utilitzen líquids purs.

S'afegeixen estàndards de líquids (Kodak) de metà tiol, età tiol, sulfur de metil, sulfur de metil etil, sulfur de dimetil i sulfur de dietil a 50 mL de barreja d'aigua destil·lada/etanol en vials de vidre de 100 mL, que també s'han utilitzat als estàndards de la fase gasosa o espai de cap.

A la meitat d'aquesta fase del projecte s'adopten preparacions d'estàndards complementaris, tal i com s'explica més endavant, per tal d'utilitzar estàndards volàtils fàcilment quantitius i barreges de gasos diluïts segures.

S'utilitzen barreges de gasos calibrats (Alphagaz) de H₂S, SO₂, carbonil sulfur (COS) i metà tiol (MeSH) en nitrogen com a estàndards de reserva per a aquests compostos. Les mostres dels estàndards es preparen a partir de la barreja certificada (10 mg/L, 2% de tolerància) continguda en un cilindre pressuritzat de 6 L. Les barreges de gas s'alliberen mitjançant reguladors de baixa pressió resistent a la corrosió que tenen un orifici de sortida a un vial de 100 mL, es refreden durant 30 segons i, tot seguit, es precinten amb un septum cobert de Tefló amb un tap d'alumini premsat.

S'utilitza nitrogen per a refredar tots els recipients de vidre, després d'haver-los esbandit amb etanol i aigua destil·lada.

En tot l'experiment, s'utilitzen per a la injecció manual xeringues hermètiques a gas d'1 i 2 mL Pressure-Lock (Precision Sampling Co.) amb una vàlvula de Tefló. Per rentar les xeringues, i durant 30 minuts abans de la injecció, es bombeja aire varies vegades i després s'utilitza un sistema tèrmic al buit.

S'utilitza una xeringa Hamilton d'aire de 500 µL per a l'addició de dilucions estàndard i d'estàndards interns.

Es redueix al mínim el contacte amb el metall i cautxú durant tot el procés de mostres i d'anàlisi. Aquest tipus de contacte es limita a l'agulla de la xeringa i al tub del detector del cromatògraf model H-P 5840 que s'utilitza a la primera fase d'aquest projecte.

6.5 i 6.6 Producció de sulfur d'hidrogen en llevats vínics i comparació de soques de llevats comercials

L'estudi es va fer amb 140 soques de llevat comercial de diferents productors a l'Institut Català del Vi (INCAVI) de Vilafranca del Penedès. Es va fer servir un most pasteuritzat en ampolles d'1L. La inoculació es va fer a les dosis recomanades pel fabricant que normalment és de 25g/HL. La temperatura de fermentació va ser de 20°C. Les anàlisis es van fer amb un detector específic de sulfur d'hidrogen de l'empresa Toxi RAE amb una precisió de 0.1ppm. El detector serveix com avisador personal de presència de sulfur d'hidrogen, també detecta en pocs segons la concentració de sulfurs en un recipient on hi ha una fermentació. L'anàlisi del sulfits és aproximada, amb una precisió de 5mg/L i es van fer amb un WineScan de l'empresa Foss pel sistema de comparació de l'espectre infraroig proper (NIR-FT). La mesura de l'escuma es va fer per l'alçada de l'escuma dins l'ampolla amb una precisió de 1mm.

6.7 Expressió gènica en dues soques víniques de *Saccharomyces cerevisiae* amb diferent producció de H₂S.

Amb most pasteuritzat, s'han fet dues fermentacions amb duplicats semblant la soca UCD M522, seleccionada per la Universitat de Califòrnia Davis, com alta productora de H₂S i la soca P29 CECT 166, seleccionada per l'INCAVI, com baixa productora de

H₂S. La sembra es fa de forma habitual, hidratant el llevat amb aigua a 40°C durant 15 minuts i sembrant l'ampolla de most pasteuritzat. Les fermentacions es fan en una estufa Hot-Cold de programada entre 18 i 20°C amb un agitador Selecta programat a 100 rpm. Les fermentacions es fan en ampolles de 1000 mL. El seguiment de la fermentació es fa per diferència de pes i anàlisis enològiques per WineScan de Foss o altres mètodes (OIV 2011). En aquest cas es va fer servir most pasteuritzat amb 80 g/L de glucosa i 80 g/L de fructosa i un contingut mitjà de nitrogen de 100mg/L característic de mostos de la zona mediterrània. Quan s'estudia la producció de un compost difícil de mesurar com el H₂S i altres sulfurs volàtils s'ha d'intentar reproduir les condicions del celler en el laboratori. S'han fet les fermentacions en recipients de 1 litre per ser més representatiu que volums inferiors i ser pràctic per a la repetició i manipulació. La temperatura ha estat de 18 a 20°C, per ser intermitja de les més utilitzades en els cellers. S'ha fet servir agitació per facilitar una fermentació homogènia. Les anàlisis de sulfur d'hidrogen s'han fet amb tres sistemes amb detectors específics: Toxi Rae (Sensotran), Figasa International (Seul, Korea) i Radiello (Sigma-Aldrich). Hydrogen Sulfide (H₂S) 123-6 Codi 120 White Diffusive Body (Cat. No. RAD1201) i Codi 170 5 RAD1236 Cartridge Adsorbent (Supelco Cat. No. RAD170).

Extracció de l'RNA i anàlisi per array de DNA. Els llevats es van recollir per centrifugació i rentats amb aigua destil·lada, tractats amb RNA Later (Sigma) i mantinguts en congelador fins l'extracció, trencant les cèl·lules amb boletes de vidre i triazol amb el mètode del fenol (Collart i Oliveiro 2001). Els microxips genòmics per llevat es van construir a la UAB amb 6014 amplificats ORF (Open Reading Frames) de *Saccharomyces cerevisiae* (Viladevall i al. 2004). Quinze micrograms de RNA es van utilitzar per sintetitzar el cDNA i marcat amb els nucleòtids fluorescents Cy3-dUTP i Cy5-dUTP, seguint un protocol de marcatge indirecte (CyScribe post labelling kit GE). El disseny i resultats es van dipositar al Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), referències GPL4069 i GSM407314. Els xips han estat analitzats segons el SGD i TM4 (Saeed et al.2003)

Una rèplica biològica de les mostres es va analitzar amb un array de nucleòtids sintetitzats in situ de Geniom a Oryzon genomics. El disseny i resultats es van dipositar a (GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), referències GPL8589 i GSM407315. Per a confirmar els resultats dels dos arrays es van fer unes sèries de qRT-PCR de gens seleccionats incloent *ADH1*, *TDH1-3*, *THI4*, *THI5* i *THI20*. Els experiments es van fer amb RNA del utilitzat en els arrays i noves extraccions fent un total de quatre rèpliques biològiques i tres rèpliques tècniques (qRT-PCR). Aquest darrers es van fer en un ABI-Prism 7000 Sequence Detection System d'Applied Biosystems utilitzant SYBRGreen PCR master mix (Applied Biosystems).

Gen	Sense primer	Anti-sense primer	Longitud del Producte (bp)
<i>ADH1</i>	AACGAATCCAACCTGTCCTCA	CCGTCAGCGGTAGCGTATTG	79
<i>TDH1-3</i>	AGAC TGHGACGGTCCATCCC	AAGCGGTTCTACCACCTCTCC	51
<i>THI4</i>	TACGAAGACGAAGGTGACTATG	TAGCATTGAACAGTTTAAACATTTGG	106
<i>THI5</i>	AGGTTACTTCAAGGAGCAAGG	CCAATTAACCTCAGTGACATCGG	78
<i>THI20</i>	TGTCGCTACTTCTGGTTCTTCCTTT	CTTTCCTCACCTAACAATTTG	133

6.8 Factors vitícoles

6.8.1 Estudi del contingut dels mostos en nitrogen

Es van analitzar més de 400 mostres entre els anys 2004 i 2007 per a conèixer la concentració de nitrogen en mostos a l'Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI) a Vilafranca del Penedès.

Abans de realitzar l'anàlisi, els mostos es centrifuguen a uns 3000 rpm durant 20 minut i, si no s'analitzen desseguida, s'afegeix azida sòdica per evitar el creixement de llevats i el consum de nitrogen. S'analitzen el nitrogen amoniacal i amínic (Free amino nitrogen) basat en el mètode Sorensen que mesura l'hidrogen de la funció amino dels amino àcids i l'amoni mesurat amb formaldehid i valorat amb sosa fins a pH de 8.4.

També s'han analitzat 85 mostres a Vilafranca i 10 a Reus en les que s'ha mesurat el nitrogen total, i altres compostos nitrogenats.

6.8.2 Irrigació i composició dels aminoàcids del most

L'experiment es va conduir durant tres anys consecutius en un vinya comercial de Pinot noir a Raïmat (denominació d'origen Costers del Segre) a Lleida. Es va fer servir el criteri de potencial hídric al migdia de -0.8 MPa per indicar que no hi ha estrès, -1.2MPa per un estrès moderat i -1.5MPa per un estrès sever. El potencial es va mesurar amb una cambra de pressió (Scholander et al. 1965). Es van estudiar el raïm i el most de cada tractament, grau Brix, pH acidesa total, antocianins, polifenols totals, nitrogen assimilable i aminoàcids amb el mètode de l'Organització Internacional del Vi (OIV, 1990).

6.8.3. Tractament amb oli vegetal i llevat per a substituir el sofre en pols

L'experiment de camp es va establir en una vinya comercial en què es van seleccionar 40 plantes de vinya empeltades de Sumoll dividit en 4 blocs. La vinya està situada a la Denominació Penedès, a 4 km del mar i exposada a les brises marines que afavoreixen el creixement del oïdi. El bloc "C" es va utilitzar com a control, el bloc "S" tractat amb sofre en pols com a referència, el bloc "O" tractats amb oli de gira-sol en un 2% amb aigua i un agent humectant, i el bloc "L" tractat amb llevat. L'elaboració del vi es va fer amb el procediment estàndard al celler experimental de l'INCAVI a Vilafranca del Penedès. Els raïms van ser collits amà, i premsats. El suc es va deixar reposar una nit i després del desfangament, es va sembrar amb 30 g/Hl amb llevat seleccionat. La fermentació es va realitzar a 20°C. En el fermentadors s'hi va afegir uns tubs de detecció d'hidrogen (Figasa Internacional) per mesurar la formació de H₂S. Es va mesurar el valor final acumulat durant la fermentació. En els vins finals es va mesurar l'ocratoxina A (OTA) pel mètode de l'OIV, com a indicador de l'activitat del fong *Aspergillus ochraceous*. El sòl es va analitzar al laboratori de sòls de l'INCAVI a Reus per mètodes estàndard per observar les possibles diferències degudes als tractaments.

6.8.4. Utilització del te de compost i tractament tradicional de la vinya

Es va plantejar un tractament amb repeticions en una vinya comercial de 30 anys de la varietat Sumoll a la DO Penedès. El te de compost es va fer en un dipòsit aerobi amb aportació continua de bombolles d'aire; el compost estava suspès en una malla que permetia la seva difusió. Els tractaments tradicionals es van fer amb sofre en pols i amb caldo bordelès fet amb sulfat de coure neutralitzat amb calç. Els tractaments es van realitzar a partir de 10 cm de creixement de la vinya, cada 15 dies.

6.9 Tractament de vins amb compostos de sofre amb dues sals de coure

L'estudi es va fer amb 20 vins de diferents cellers tractats a l'Institut Català del Vi (INCAVI) de Vilafranca del Penedès. La primera prova va ser per determinar la quantitat de coure necessària per a disminuir les olors de sofre en els vins. Seguidament es varen tractar 3 dels vins amb la mateixa quantitat de coure amb dos compostos diferents: sulfat de coure (com a material de referència), citrat de coure o Kupzit (bentonita amb un 2% de citrat de coure). Les mostres es van filtrar per plaques (K150) amb un contacte mínim d'aire i embotellades amb tap de rosca. Les anàlisis dels compostos de sofre volàtils van ser realitzades per la Professora Doris Rauhut a l'Institut del Vi (SLFA) de Geisenheim (Alemanya) per cromatografia de gasos i detector de quimioluminescència. El tast va ser fet per un panell entrenat.

Primera sèrie: Codificació de les experiències:

- W-2159: vi blanc - testimoni, sense tractament
- Prova 1: tractat amb 40 g Kupzit per 100 L.
- Prova 2: tractat amb 1,0 g sulfat de coure per 100 L.
- W-2160: vi negre - testimoni, sense tractament
- Prova 1: tractat amb 40 g Kupzit per 100 L.
- Prova 2: tractat amb 1,6 g sulfat de coure per 100 L.

Compostos de sofre analitzats: Sulfur d'hidrogen (H_2S), Metil mercaptà (MeSH), Etil mercaptà (EtSH), Sulfur de dimetil (DMS), Carbonil disulfur (CS_2), Metiltioacetat (MeSAc), Disulfur de dimetil (DMDS), Etiltioacetat (EtSAc), disulfur de dietil (DEDS).

Segona sèrie: Codificació de les experiències:

W-2590 Vi blanc - testimoni (T)

W-2591 Vi blanc - sulfat de coure (S)

W-2592 Vi blanc – citrat de coure(K)

W-2593 Vi negre - testimoni (T)

W-2594 Vi negre - sulfat de coure (S)

W-2595 Vi negre – citrat de coure (K)

Tercera Sèrie:

Codificació de les mostres:

W-2717 – vi blanc sense tractament (T)

W-2718 – 30 g citrat de coure per 100 L, sense àcid ascòrbic

W-2719 – 30 g citrat de coure per 100 L + 50 mg/L àcid ascòrbic (C+Asc)

W-2720 – 1 g sulfat de coure per 100 L, sense àcid ascòrbic (S)

W-2721 – 1 g sulfat de coure por 100 L + 50 mg/L àcid ascòrbic (S+Asc)

Reacció amb el coure

Aquest és un mètode qualitatiu. Normalment es detecta l'olor de sofre en els vins de manera sensorial; una vegada detectat, s'ha de confirmar el tipus de compost de sofre. Per a determinar si el tipus d'olor és degut a H₂S, tiol o disulfur, es poden preparar tres recipients amb les següents indicacions: control, coure, coure + ascòrbic. Es mesuren 50 mL de vi a cada copa. En el recipient de control no s'afegeix res, en el de coure s'afegeix 1 mL d'una solució de 10 g/L de sulfat de coure, en el de coure i ascòrbic afegir 0.5 mL d'una solució de 100 g/L d'àcid ascòrbic, remenar, esperar 5 minuts i afegir 1 mL de la solució de 10 g/L de sulfat de coure. El resultat es comprova de manera olfactiva. És millor si es fa amb més d'una persona.

Taula 6.5 Esquema per determinar el tipus de compost de sofre en vi

Assaig	Vi +CuSO₄ (10 g/L)	Vi +CuSO₄ (10 g/L) i À. Ascòrbic (100 g/L)	Resultat
1	No hi ha canvis	No hi ha canvis	No és un sulfur o tiol
2	No hi ha canvis	Eliminació reduït	Disulfur
3	Menys reduït	Eliminació reduït	H ₂ S, tiol, disulfur
4	Eliminació reduït	Eliminació reduït	H ₂ S i/o tiol

BIBLIOGRAFIA

- Acree, T. E. , Sonoff, E.P., Splittstoesser, D.F. (1972). Effect of Yeast Strain and Type of Sulfur Compound on Hydrogen Sulfide Production. *Amer. J. Enol. Viticult.* **23**, 6-9
- Alberola, T.M., Garcia-Martinez, J., Antunez, O., Viladevall, L., Barcelo, A., Ariño, J., Perez-Ortin, J.E. (2004) A new set of DNA macrochips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses. *Int Microbiol* **7**, 199–206.
- Anness, B. J. (1981). The role of Dimethyl Sulphide in Beer flavour. European Brewery Convention - Flavour Symposium, Copenhagen
- Anònim S.XV. Llibre de plantar vinyes e arbres (2011) edició X. Luna Publicacions Abadia de Montserrat
- Barnett, J.A. Payne, R.W. Yarrow (1992) *Yeast: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press.
- Bartra, E. (1995) Microbiological aspects of sparkling wine processing. *Microbiologia SEM* **11**, 43–50.
- Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J.M., Salmon, J.M. Barre, P. (1996) Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: impact on alcoholic fermentation kinetics. *J Ferment Bioeng* **82**, 145–150.
- Beltran, G., Novo, M., Leberre, V., Sokol, S., Labourdette, D., Guillamon, J.M., Mas, A., Francois, J. (2006) Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Res* **6**, 1167–1183.
- Berry. D. R., Chamberlain, H. (1985). Formation of Organoleptic Compounds by Yeast Grown in Continuous Culture on a Defined Medium. *American Society of Brewing Chemists* **44**, 52-56
- Bidan, P. Collon, Y. (1985) Metabolisme du soufre chez la levure. *Bulletin de l'O.I.V.* **652-653**, 544-563
- Bobet, R. A. , Noble, A.C., Boulton, R.B. (1990). Kinetics of the Ethanethiol and Diethyl Disulfide Interconversion in Wine-like Solutions. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 449-452
- Bohlscheid, J.C., Fellman, J.K., Wang, X.D., Ansen, D. Edwards, C.G. (2007) The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations. *J Appl Microbiol* **102**, 390–400.
- Borneman, A.R., Forgan, A.H., Pretorius, I.S. Chambers, P.J. (2008) Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS Yeast Res* **8**, 1185–1195.

- Boulton, R.B., Singleton, L.F., Bisson, R.E., Kunkee (1996) Principles and practices of winemaking. Kluwer ed. New York
- Brantl, S. (2004) Bacterial gene regulation from transcription attenuation to riboswitches and ribozymes. Trends Microbiol **12**, 473-475
- Brenner, M. W. , Owades, J.L., Golyznizk, R. (1953). Determination of Volatile Sulfur Compounds. I. Hydrogen Sulfide. A.S.B.C. Proceedings 83-98
- Brown, C. M., Johnson, B. (1970). Influence of the Concentration of Glucose and galactose on the Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in Continuous Culture. J GenMicrobiol **64**, 279-287
- Carbó, R.(1987) Aislamiento y selección de levaduras para la producción de vino espumoso (Cava). Memòria de grau. Universitat de Barcelona. Facultat de Biologia.
- Carrau, F.M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P.A. Dellacassa, E. (2008) Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. FEMS Yeast Res **8**, 1196–1207.
- Carreto, L., Eiriz, M.F., Gomes, A.C., Pereira, P.M., Schuller, D. Santos, M.A. (2008) Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. BMC Genomics **9**, 524.
- Carro, D., Bartra, E. Piña, B. (2003) Karyotype rearrangements in a wine yeast strain by rad52-dependent and rad52-independent mechanisms. Appl Environ Microbiol **69**, 2161–2165
- Ciurana, J. (1980) Els vins de Catalunya. Ed. Barcino. Barcelona
- Collart, M.A. and Oliviero, S. (2001) Preparation of yeast RNA. Curr Protoc Mol Biol Chapter 13, Unit13, 12. doi: 10.1002/0471142727.mb1312s23.
- de Mora, S. J., Eschenbruch, R., Knowles, S.J., Spedding, D.J. (1986). The Formation of Dimethyl Sulphide During Fermentation Using a Wine Yeast. Food Microbiology **3**, 27-32
- Del Cupolo, L. Zambonelli, C. (1973). Sulphite Reductase, Intracellular Concentration of Cysteine and H₂S production in *Saccharomyces cerevisiae*. Ann. Micr. **23**, 51-58
- Descout, J.J. (1991) Observations pratiques sur le goûts de réduit. Revue des Oenologues num. **60**, 15-19
- Dominé, A. (2008) El vino. Ed Ullmann. Postman, Alemania
- Dott, W., Heinzl, M., Troper, H. G. (1977). Sulfite Formation by Wine Yeasts. Arch. Microbiol. **112**, 283-285

- Dott, W., Troper, H.G (1978). Sulfite Formation by Wine Yeasts:VI. Regulation of Biosynthesis of NADPH-and BV-Dependent Sulfit Reductases. Arch. Microbiol. **118**, 249-251
- Drozd, J., Havlov , P., Novak, V. (1990). Quantitative Evaluation, of Headspace Determination of Dimethyl Sulphide in Malt. J. Inst. Brew. **96**, 69-73
- Dunn, B., Levine, R.P. Sherlock, G. (2005) Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. BMC Genomics **6**, 53.
- Edwards, C.G. Bohlscheid, J.C. (2007) Impact of pantothenic acid addition on H₂S production by *Saccharomyces* under fermentative conditions. Enzyme Microb Technol **41**,1-4.
- Endo, I., Nagamune, T., Inoue, I. (1981). Start-up of the Chemostat Culture. Annals New York Academy of Sciences **369**, 245-255
- Eschenbruch, R.(1972). Sulphate Uptake and Sulphite Formation Related to the Methionine and/or Cysteine Content of Grape Must During the Fermentation by Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Vitis **11**, 222-227
- Eschenbruch, R. (1974). Sulfite and Sulfide Formation During Winemaking a Review. Amer. J. Enol. Viticult. **25**, 157-161
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. Querol, A.(1999) Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**:329-337
- Feeney, M., DeGood,J.,Warren,E. (1983). Analysis of Trace Sulfur Gases by Capillary Gas Chromatography using Flame Photometric Detector. Hewlett Packard
- Fernández-Anero, J. (1990) Amino Acid Utilization of Wine Yeast in Batch and Continuous Culture. M.Thesis University of California, Davis.
- Fernández-Espinar, M.T., López, V., Ramón, D., Bartra, E. Querol, A. (2001) A study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. Int.J. Food. Microbiol **70**. 1-10
- Ferrari, G. (2002) Influence of must nitrogen composition on wine and spirit quality and relation with aromatic composition and defects - A review. J Int Sci Vigne Vin **36**, 1-10.
- Generalitat de Catalunya. (2007) Observatori de la vinya, el vi i el cava
- Giralt, E. (2005) Història Agrària del Paissos Catalans. Ed. Universitat de Barcelona

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 563–567.

Goniak, O.J. Noble, A.C. (1987) Sensory Study of Selected Volatile Sulfur Compounds in White Wine. *Am. J. Enol. Vitic* vol. **38** no. 3 223-227.

Goode J. and Harrop, S. International Wine Challenge (2008) cited in Entretiens scientifiques Lallemand. Sulphur-related compounds.

Guasch, J. (2007) Reflexiones sobre el análisis enológico: Acidez volátil. *Enólogos* n°45.

Hall, R. D. (1974). A highly Sensitive and Selective Microelectrolytic Conductivity Detector for Gas Chromatography. *J. of Chromat. Science* **12**:152-160.

Hartnell, P. C., Spedding, D.J. (1979). Uptake and Metabolism of 35S-Sulphate by Wine Yeast. *Vitis* **18**, 307-315

ITV France (2003) Choix et emploi des micro-organismes en oenologie ITV Paris

Heinzel, M. A. Troper, H.G. (1978). Sulfite Formation by Wine Yeasts: V. Regulation of Biosynthesis of ATP- and ADP-Sulfurylase by Sulfur- and Selenium-Compounds. *Arch. Microbiol.* **118**, 243-247

Jimenez-Marti, E., del Olmo, M.L. (2008) Addition of ammonia or amino acids to a nitrogen-depleted médium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation. *FEMS Yeast Res* **8**, 245–256.

Jiranek, V., Langridge, P. Henschke, P.A. (1995) Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl Environ Microbiol* **61**, 461–467.

Kumar, G.R., Ramakrishnan, V. Bisson, L.F. (2010) Survey of Hydrogen Sulfide in Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* vol. **61**.365-371

Kuraishi, H.(1966). Death of Yeast Cells in Pantothenic Acid Deficiency. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **12**, 103-112.

Lawrence, W. C., Cole, E.R. (1968). Yeast Sulfur Metabolism and the Formation of Hydrogen Sulfide in Brewery Fermentations. *Wallerstein Communications* **31**, 95-113.

Leppanen, O., Denslow, J., Ronkainen, P. (1979). A Gas Chromatographic Method for the Accurate Determination of Low Concentrations of Volatile Sulphur Compounds in Alcoholic Beverages. *J. Inst. Brew.* **85**, 350-353.

- Leppanen, O. A., Denslow, J., Ronkainen, P.P. (1980). Determination of Thiolacetates and Some Other Volatile Sulfur Compounds in Alcoholic Beverages. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 359-362.
- Linderholm, A.L., Findleton, C.L., Kumar, G., Hong, Y. Bisson, L.F. (2008) Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 1418–1427.
- Marais, J. (1979). Effect of storage time and temperature on the formation of DMS and on white wine quality. *Vitis* **18**:254-260.
- Marais, P. G. Kruger, M.M. (1976). Effect of Benomyl on Fermentation and Hydrogen Sulphide Formation During Winemaking. *Agrochemophysica* **8**, 61-64.
- Matsui, S., Yabuuchi, S. Amaha, M. (1981). Production of S-Methyl Thioacetate from Methyl Mercaptan by *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 771-772.
- McCready, R. G. L., Din, G.A., Krouse, H.R. (1979). The Effect of Pantothenate on Sulfate Metabolism and Sulfur Isotope Fractionation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* **25**, 1139-1144.
- Mestres, M., O. Bustos, J. Guasch (2000) Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *J. of Chromatography A* **881**, 569-581
- Moreira, N., Mendes, F., Pereira, O., Guedes De Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I. (2002) Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Anal Chim Acta* **458**, 157–167.
- Nadal, D., Carro, D., Fernández-Larrea, J. Piña, B. (1999) Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling- wine yeast strains. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1688–1695.
- Nagami, K., Takahashi, T., Nakatani, K., Kumada, J. (1980). Hydrogen Sulfide in Brewing. *M.B.A.A. Technical Quarterly* **17**, 64-68.
- Nosaka, K., Onozuka, M., Konno, H., Kawasaki, Y., Nishimura, H., Sano, M. Akaji, K. (2005) Genetic regulation mediated by thiamin pyrophosphate-binding motif in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **58**, 467–479.
- Nosaka, K. (2006) Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**, 30–40.
- Noble, A. C. Arnold, R. A. Buechsenstein, J. Leach, E. J. Schmidt, J. O. Stern, P. M. (1987) Modification of a Standardized System of Wine Aroma Terminology. *Am. J. Enol. Vitic* vol. **38** no. 2 143-146. (Versió en català: ACE revista enologia gen/feb 1990)

Nykanen, L. Suomalainen, H. (1983). Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages. D. Reidel Publishing Company, Berlin.

O'Connor, C. J., Singh, R. M. Dd., Walde, P., Spedding, D.J. (1986). Uptake and Metabolism of Sulphides by Wine Yeasts. *J. Plant Physiol.* **125**, 123-136.

OIV (2011) Compendium of International Methods of Analysis of Wine and Musts.

Park, S.K., Boulton, R.B., Bartra, E. and Noble, A.C. (1994) Incidence of volatile sulfur compounds in California Wines- A preliminary survey. *Amer. J. Enol. Viticul.* **45**,341–344.

Peppard, T.L. (1985). Analytical Measurement of Volatile Sulphur Compounds in Beer. in *Beer Analysis*. Springer-Verlag, Berlin. 241-253.

Pérez-Ortín, J.E.; García-Martínez, J. Alberola T. M. (2002).DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. *J. Biotech.* **98**, 227-240.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (RESTa) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl Acids Res* **30**, e36.

Portno, A. D. (1968). Continuous Fermentation in Relation to Yeast Metabolism. *J. Inst. Brew.* **74**, 448-456.

Pretorius, I. (2000) Tailoring wine yeast for the next millenium: novel aproaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16** (8) 675-729.

Puig, A., Bartra, E. Franquet, R. Capdevila, F. Garcia J. (2007) Rápida detección en vinos de *Brettanomyces-Dekkera* por real time PCR.(Simposium Microsafety)

Querol, A., Barrio, E. and Ramon, D. (1992) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst Appl Microbiol* **15**, 439–446.

Rankine, B. C. (1963). Nature, Origin and Prevention of Hydrogen Sulphide Aroma in Wines. *J. Sci. Fd. Agric.* **14**, 79-91.

Rankine, B. C.(1964). Hydrogen Sulphide Production by Yeasts. *J. Sci. Fd. Agric.* **15**, 872-877.

Rauhut, D.(1993) Volatile sulfur compounds Impact on reduced sulfur flavors defcets and atypical aging in wine. 31 Annual New York Wine Industry Workshop

Rodriguez-Navarro, S., Llorente, B., Rodriguez-Manzaneque, M.T., Ramne, A., Uber, G., Marchesan, D., Dujon, B., Herrero, E., et al. (2002) Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B-1 and B. *Yeast* **6**, 1261–1276.

Roy, A. B., Trudinger, P.A. (1970). The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulfur. Cambridge Univ. Press.

- Ruiz Hernández, M. (1980). Sobre la Producción de SO₂ y de H₂S por *Saccharomyces cerevisiae* en Fermentaciones Vínicas. *La Semana Vitivinícola* 4321-4323.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M. et al. (2003) TM4: a free, opensource system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* **34**, 374–378.
- Salgues, M. (2000) Elaboració de vins escumosos a Califòrnia. Actes del Congrés Internacional del Cava. Sant Sadurní d'Anoia.
- Schiller, R. G. Bronsky, R.B. (1977). Gas Chromatographic Analysis for Hydrogen Sulfide, Organic Sulfides, Mercaptans, and Carbon Dioxide in Hydrocarbon Matrices Using an Electrolytic Conductivity Detector. *J. Chromatographic Science* **15**, 541-545.
- Seaton, J. C., Sugget, A., Moir, M. (1981). The role of sulphur compounds in beer flavour. *European Brewery Convention - Flavour Symposium, Copenhagen*.
- Shearer, R. L., O'Neal, D.L., Rios, R., Baker, M.D. (1990). Analysis of Sulfur Compounds by Capillary Column Gas Chromatography with Sulfur Chemiluminescence Detection. *Journal of Chromatographic Science* **28**, 24-28.
- Shimada, S., Kuraishi, H., Aida, K. (1972). Unbalanced Growth Death of Yeast Due to Pantothenate Deficiency. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **18**, 383-397.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* **148**:339–346.
- Schutz, M, Kunkee, R.E. (1977) Formation of hydrogen sulfide from elemental sulfur by wine yeast. *Am. J. Enol. Vitic.* **28**, 137-144
- Silvarrey C, Cabaleiro C. Jacas J. (2002) Uso de aceites en control fitosanitario en vid *Viticultura Enologia Profesional* nº **79** Marzo Abril.
- Simpson, R. F. (1979). Aroma composition of bottle aged white wine. *Vitis* **18**:155-160.
- Sinclair, A., Hall, R.D., Burns, T. (1969). The Analysis of Volatile Sulphur Compounds in Beer. *Proc 12th Brew Conv Congr, Interlaken*, **42** 427-444.
- Slaughter, J. C., McKernan, G. (1988). The Influence of Pantothenate Concentration and Inoculum Size on the Fermentation of a Defined Medium by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* **94**, 14-18 100.
- Spedding, D. J., Eschenbruch, R., Purdie, A. (1980). Sulphur compounds in headspace of some New Zealand wines. *Vitis* **19**:241-245.
- Spedding, D. J., Eschenbruch, R., McGregor, P.J. (1983). Sulphur Compounds in the Headspace of Some New Zealand Commercial Wines. *Food Tech. in Australia* **35**, 22-23.

Spiropoulos, A., Bisson, L.F. (2000) MET17 and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4421–4426.

Stewart, G. G. Russell, I. (1981). The influence of yeast on volatile sulphur compounds in Beer. European Brewery Convention - Flavour Symposium, Copenhagen.

Stratford, M., Rose, A.H. (1985) Hydrogen-sulfide production from sulfite by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **131**, 1417–1424.

Thomas, C.S., Boulton, R.B., Silacci, M.W. Douglas Gubler, W. (1993) The effect of elemental sulfur, yeast strain, and fermentation medium on hydrogen sulfide production during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. **44**, No.2, 212-215

Thoukis, G., Stern, L.A. (1962). A Review and Some Studies of the Effect of Sulfur on the Formation of Off-Odors in Wine. **13**, 133-140.

Tokuyama, T., Kuraishi, H., Aida, K., Uemura, T. (1973). Hydrogen Sulfide Evolution Due to Pantothenic Acid Deficiency in Yeast Requiring this Vitamin, with Special Reference to the Effect of Adenosine Triphosphate on Yeast Cysteine Desulhydrase. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **19**, 439-466.

Tominaga, T., Furer, A., Henry, R., Dubordieu, D. (1998) Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc. *Flavour and Fragrance Journal* Vol. **13**, 3, 159-162.

Turin, L. (1996) A spectroscopic mechanism for primary olfactory reception. *Chem. Senses* **21**, 773-791.

Ugliano, M., Fedrizzi, B., Siebert, T., Travis, B., Magno, F., Versini, G., Henschke, P.A. (2009) Effect of nitrogen supplementation and *Saccharomyces* species on hydrogen sulfide and other volatile sulfur compounds in Shiraz fermentation and Wine. *J Agric Food Chem* **57**, 4948–4955.

Vanderstraeten, P., Wauters, E., Muylle, E., Verduyn, G., Vanderheyden, E., Vansant, E.F. (1988). A Continuous Quantitative Detection Method for Total Mercaptans, Organic Sulphides, H₂S, and CS₂ for Odouriferous Emissions. *J.A.P.C.A.* **38**, 1271-1274.

Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barcelo, A., Ariño, J. (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 43614–43624.

Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I.S., Henschke, P.A. (2007) Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and nonvolatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**, 145–157.

Viñegra, M. (1992) Contribución al estudio de fermentaciones artesanales e industriales de Rioja Alavesa. Eusko Jaurlaritzaren Gobierno Vasco.

Vos, P.J.A., Gray, R.S. (1979) Origin and control of hydrogen-sulfide during fermentation of grape must. *Am J Enol Vitic* **30**, 187–197.

Wainwright, T. (1970) Hydrogen sulphide production by yeast under conditions of methionine, pantothenate or vitamin B6 deficiency. *J Gen Microbiol* **61**, 107–119.

Wainwright, T. (1972). Sulfur Tastes and Smells in Beer. *The Brewers Digest* 78-84.

Wang, X.D., Bohlscheid, J.C., Edwards, C.G. (2003) Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *J Appl Microbiol* **94**, 349–359.

Watson, T. G., Hough, J.S. (1966). Studies in Continuous Fermentation : I.Effects of Yeast Concentration. *J. Inst. Brew.* **72**, 547-555.

Watson, T. G. (1969). Steady State Operation of a Continuous Culture at Maximum Growth Rate by Control Carbon Dioxide Production. *J. Gen. Microbiol.* **59**, 83-89.

Wightman, R., Meacock, P.A. (2003) The TH15 gene family of *Saccharomyces cerevisiae*: distribution of homologues among the hemiascomycetes and functional redundancy in the aerobic biosynthesis of thiamin from pyridoxine. *Microbiology-(UK)* **149**, 1447–1460.

Yoshimoto, A., Sato, R. (1968). Studies on Yeast Sulfite Reductase: I.Purification and Characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 555-575.

Zambonelli, C., Del Cupolo, L. (1971). Factors affecting the Production of Sulfur Dioxide and Hydrogen Sulfide in *Saccharomyces*. *Ann. Micr.* **21**, 113-121.