



**DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA
I EL METABOLISME DE *sachaaaromices cerevisiae*
Maria Francesca Fort Marsal**

ISBN: 978-84-693-6283-9
Dipòsit Legal: T-1605-2010

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.tesisenxarxa.net) 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.tesisenred.net) 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.tesisenxarxa.net) 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 ROVIRA I VIRGILI
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA

TESI DOCTORAL

ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA DEL COURE I LA
DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA
FERMENTATIVA I EL METABOLISME DE
Saccharomyces cerevisiae

MARIA FRANCESCA FORT MARSAL

Tarragona, 1997

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010



"Tàrraco és per a mi la ciutat més agradable i estimada de totes les que són apropiades per al descans. Aquí tens un poble honrat, econòmic, tranquil, que guarda un cert recel del foraster però que una vegada provat el tracta bé. El clima, que és molt atemperat, no té canvis bruscs de temperatura i l'any sembla una primavera continuada. La terra és fèrtil en els camps i més encara en els turons, produint vi i blat tan bons com a Itàlia i gens inferiors en qualitat"

*Poeta P. Anni Florus,
Tarraco, segle II*



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA

**ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA DEL COURE I LA
DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA
FERMENTATIVA I EL METABOLISME DE**
Saccharomyces cerevisiae



Memòria presentada per
MARIA FRANCESCA FORT MARSAL
per optar al grau de Doctora en Ciències Químiques
sota la Direcció del Dr. Lluís Arola Ferrer i del Dr. Fernando Zamora Marín



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

ESCOLA D'ENOLOGIA DE TARRAGONA

Ramón y Cajal, 70
43005 Tarragona
Tel. (977) 25 00 00
Fax (977) 25 03 47

Dr. Lluís Arola Ferrer, Catedràtic de Bioquímica i Biologia Molecular del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili, i

Dr. Fernando Zamora Marín, Professor Titular d'Escola Universitària de Bromatologia i Nutrició del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili,

FAN CONSTAR,

que el present treball, amb el títol "Estudi de la influència del coure i la diclofluanida sobre la cinètica fermentativa i el metabolisme de *Saccharomyces cerevisiae*" que presenta na MARIA FRANCESCA FORT MARSAL, per optar al Grau de Doctora en Ciències Químiques per la Universitat Rovira i Virgili, ha estat realitzat sota la seva direcció, i que tots els resultats obtinguts són fruit dels experiments duts a terme per l'esmentada doctoranda.

I perquè se'n prengui coneixement i tingui els efectes que correspongui, signen aquesta certificació

Dr. Lluís Arola Ferrer

Dr. Fernando Zamora Marín

Tarragona, 13 de juny de 1997

**La present Tesi Doctoral ha estat realitzada en els laboratoris de
l'Escola d'Enologia i en el laboratori de radioisòtops del
Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat
Rovira i Virgili de Tarragona, sota el finançament de la CICYT
(subvencions nº ALI 92-0483 i nº ALI 95-0887-C04-01) .**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

La present tesi no hauria estat possible si no hagués tingut al meu costat la col.laboració d'un equip extraordinari de persones que en tot moment varen confiar en la meva iniciativa; els consells, les sàvies observacions i l'experiència professional han actuat de revulsiu i m'han esperonat a tirar endavant.

El Dr. Lluís Arola em va obrir generosament les portes i ha perseverat al meu costat en el decurs d'aquests anys; la seva capacitat de treball ha estat l'estímul permanent, el seu pòsit intel.lectual m'ha donat confiança i la seva qualitat humana m'ha aportat la tranquil.litat espiritual que necessita el científic. És innegable que ell ha estat l'autèntica alma mater de la tesi i per això vull agrair-li molt sincerament tot el que ha fet.

El Dr. Fernando Zamora ha sabut estar al peu del canó, amb ell he compartit les quotidianes angoixes i alegries, li agraeixo que m'hagi acompanyat en el dia a dia i, de retruc, m'hagi encomant l'optimisme que tothora traspua.

Els amics Enric Olivé i Rosa Elies han estat com uns pares a Tarragona, m'han animat, m'han aconsellat i sobretot m'han sabut escoltar. La seva companyia ha estat agràida en situacions adverses i els moments de felicitat que hem passat m'han fet oblidar els neguits que omplen l'investigador.

Un dels primers que va creure en mi va ser l'il.lustríssim Josep Gomís Martí, montblanquí fins al moll de l'os, al que agraeixo les primeres alenades d'aire fresc que mai oblida el que comença a caminar.

Tot i procedir d'una comarca puntera en la viticultura catalana, per tradició familiar em queia lluny aquest món, el mestratge del Sr Agustí Vilarroya Serafini va ser, en el seu moment, d'incalculable valor i les seves asseveracions han estat un punt de referència constant.

La Judith Fuguet ha estat la companya perfecta d'aventures i desventures, al seu costat les esgotadores hores de laboratori i d'ordinador han estat falagueres, juntes hem caminat molts dies, hem compartit i de tot plegat n'ha nascut una sòlida amistat. Sempre l'he tingut al costat i desinteressadament m'ha ofert les seves hores, el seu treball i el seu saber. Estimada Judith sàpigues que darrere de les gràcies hi ha un somriure i una mà oberta.

En arribar a l'Escola d'Enologia la primera que vaig conèixer va ser la Dra Montserrat Nadal, la qual, des del primer moment, em va oferir la seva sincera amistat, els seus consells m'han estalviat ensurts i maldecaps i la seva disponibilitat ha servit per vèncer dificultats de tota mena.

Quan els ànims han flaquejat he trobat l'esperit vivificant de la Dra Maria Cinta Bladé, la qual m'ha sabut escoltar, m'ha orientat en molts moments de desconcert i el seu esperit serè m'ha fet guanyar en seguretat.

Al laboratori vaig coincidir amb en Joan Miquel Canals, ambdós hem après a caminar plegats, el seny que el caracteritza m'ha donat molta seguretat i els seus coneixements informàtics m'han facilitat el treball.

La Xose Rius, bibliotecària exemplar i eficient, ha posat al meu abast tota la informació que he necessitat. Amb un encomiable amor a la feina ben feta a fet mans i mànigues per aconseguir el que li demanava, amb un somriure als llavis i tractant-me com a veritable amiga.

En Joan Potau va ser dels més matiners en confiar en mi, el seu caràcter obert i entusiasta ha estat, en més d'una ocasió, un punt de referència.

La Dra Paloma Sánchez-Casas m'ha ampliat la visió en molts temes i m'ha ofert els seus coneixements en múltiples ocasions. A part d'una bona companya, en ella he trobat una amiga.

El Dr Albert Mas, director de l'Escola d'Enologia, ha facilitat molt el meu treball, posant a la meva disposició els mitjans tècnics i humans que he necessitat.

Al Dr. Albert Bordons, director del nostre Departament, vull agrair-li els seus consells, ajut i el seu optimisme durant l'etapa en que posarem a punt la tècnica de captació de sucres.

Els companys Andreu Romeu i Isabel Baiges han col.laborat estretament amb mi, l'Andreu aconsellant-me en els dubtes informàtics i l'Isabel ha estat el meu puntal en les pràctiques.

Les orientacions de les Dres. Montserrat Poblet i M. Teresa Vidal han estat d'inestimable valor a l'hora de pensar en la presentació de la tesi.

Al Sr. Gonçal Barrios del Departament d'Agricultura i a la Sr. Anna Velázquez de Miguel Torres S.A., els vull agrair tota la informació que m'han facilitat.

Als Drs. Antoni Romeu, Pepa Salvadó, Josep Cano, Magda Constantí, Teresa Segué, Paco L. Bonillo i Carme Güell agraeixo l'amistat i l'experiència.

Als tècnics de laboratori Santiago, Fina, Verònica i Montse agraeixo la disponibilitat i el tracte humà.

A la Roser, l'Esther, la María José, la Gerry, la Nuria, la Cristina, la Noemí, la María Jesús, el Pep, la Marta, el Mohammed, la Miriam, la Blanca, l'Anna, la Mari Carmen, el Martí, el Gerard i el Piotr, els agraeixo les estones de companyonia i l'ajut que sempre m'han ofert.

La Imma i les becàries de la biblioteca els agraeixo que mai m'hagin regatejat res.

Al Joan Bo, al Joan Rufí i l' Helena els agraeixo la dedicació i la paciència que han tingut amb mi.

A l'equip de secretaria de l'Escola d'Enologia, a la Mireia, al German, a la Pili i a la Lourdes, els agraeixo totes les facilitats que m'han donat.

A la María, la Tere, la Carmen, la Guadalupe i la Josefa els dec les petites illes d'alegria enmig de les incerteses.

Als companys del Departament de Química Analítica de l'Escola d'Enologia els agraeixo els diversos consells.

Als alumnes de 1er. curs de les promocions 95-96 i 96-97 de l'Escola d'Enologia agraeixo la paciència en els primers anys de docència i l'amistat que m'han ofert.

D'una de les coses de les que em sento veritablement orgullosa és de pertànyer a cal Nicolau. Els meus oncles pal de pallar d'una nissaga, als qui estimo desmesuradament, els agraeixo tot el suport que m'han ofert sempre; als meus cosins (que més que cosins són germans), els agraeixo la paciència i l'ajut; i als meus nebots, aquest aire fresc que donen dia a dia a casa nostra.

A la "tieta", la Sra. Teresa Busquets, li agraeixo tot el que ha fet per a mi i el suport que em donà durant els primers anys del meu matrimoni. En ella he trobat una mare i m'ha fet sentir estimada. També a la Maria Batet per haver-me ensenyat a estimar Blancafort.

Als meus oncles Josep i Josefina Mestre, els agraeixo els estius de felicitat que he passat a casa seva, els savis consells que sempre m'han donat i sobretot tot el que van fer per a mi durant el primer any que vaig estar a Barcelona. Al Josep M. i la Pilar els hi vull agrair totes les estones que hem dedicaren.

Segun i Elvira, us estimo moltíssim.

A la família Folch els vull agrair aquesta relació tant maca que tenim i l'estima que ens donen tant al pare, a la mare com a nosaltres.

Jordi i Montserrat, us he de dir que no canvieu mai, sigueu purs i espontanis com ara, i continueu omplint d'alegria als qui us envolten.

A la família Capdevila de Barberà li agraeixo sincerament que possessin a disposició meva les seves finques per a poder realitzar el treball de 9 crèdits titulat: "Estudi de la maduració de les varietats Macabeu i Parellada a la Conca de Barberà".

A la resta de família us agraeixo de tot cor, l'estima que sempre heu tingut per cal Mas Danda.

Maria Francesca

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

Al Josep Maria i als meus pares, de tot cor.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

ÍNDIX

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

PLANTEJAMENT INICIAL	3
INTRODUCCIÓ	7
1. PROBLEMÀTICA DELS RETARDAMENTS I ATURADES DE FERMENTACIÓ	7
1.1. FACTORS LIMITANTS	9
1.1.1. Nitrogen assimilable	9
1.1.2. Oxigen	12
1.1.3. Vitamines	14
1.1.4. Contingut mineral	14
1.2. SUBSTÀNCIES INHIBIDORES	15
1.2.1. Sucres	15
1.2.2. Etanol	15
1.2.3. Àcids grassos	17
1.2.4. Àcid acètic	18
1.2.5. Anhídrid sulfurós	19
1.2.6. Residus de productes fitosanitaris	20
1.3. CONDICIONS MICROBIOLÒGIQUES	21
1.3.1. Interaccions dels llevats fermentatius amb altres microorganismes	21
1.3.2. Toxines "Killer"	22
1.4. PRÀCTIQUES ENOLÒGIQUES	24
1.4.1. Desfangat	24
1.4.2. Temperatura	25
2. MECANISMES BIOQUÍMIC / CEL·LULARS POSSIBLEMENT IMPLICATS EN ELS ALENTIMENTS I ATURADES DE FERMENTACIÓ	28
2.1. METABOLISME GLUCÍDIC	30
2.1.1. Incorporació de sucres	30
2.1.2. Catabolisme glucídic	34
2.2. METABOLISME NITROGENAT	36
2.2.1. Captació i transport	37
3. ELS RESIDUS DELS PRODUCTES FITOSANITARIS	40
3.1. FACTORS QUE AFAVOREIXEN LA PRESÈNCIA DE RESIDUS DELS PRODUCTES FITOSANITARIS EN EL RAÏM I EN EL MOST	42
3.2. LEGISLACIÓ	42
3.3. ELS PRODUCTES DE DEGRADACIÓ DELS PRINCIPIS ACTIUS DELS PESTICIDES	45
3.4. INCIDÈNCIES ENOLÒGIQUES DELS TRACTAMENTS FITOSANITÀRIS	47
3.4.1. Possible incidència dels residus sobre les fermentacions	48
3.4.2. Possible incidència dels residus en l'aparició de mals gustos en els vins	52

3.5. ELIMINACIÓ DELS RESIDUS DE PRODUCTES FITOSANITARIS MITJANÇANT LES TÈCNiques HABITUALS DE LA VINIFICACIÓ	55
3.6. SOLUCIONS PREVENTIVES PER EVITAR LES ATURADES I ALENTIMENTS DE LA FERMENTACIÓ	57
4. PRODUCTES FINALS DEL METABOLISME	58
4.1. PRODUCTES MAJORITARIS DE LA FERMENTACIÓ	59
4.2. PRODUCTES MINORITARIS	62
4.2.1. Els alcohols superiors	62
4.2.2. Els esters	64
4.2.3. Substàncies acetoíniques	66
4.3. PRODUCTES VOLÀTILS INDESITJABLES O NEGATius PER A LA COMPOSICIÓ AROMÀTICA	67
 BIBLIOGRAFIA	 71
 OBJECTIUS	 105
 RESULTATS I DISCUSSIÓ	
CAPÍTOL 1	
Influència dels tractaments fitosanitaris, sense respectar els períodes de seguretat, sobre la presència de pesticides en el most. Efecte de la vinificació sobre l'evolució dels nivells de pesticides	109
CAPÍTOL 2	
Efecte de la presència de diferents pesticides sobre la cinètica fermentativa	127
CAPÍTOL 3	
Efecte de la presència de coure i diclofluanida sobre les activitats hexoquinasa, alcohol deshidrogenasa i H ⁺ -ATPasa	151
CAPÍTOL 4	
Estudi de la incorporació de glucosa	179
CAPÍTOL 5	
Comportament del transportador de sucres en presència de coure i de diclofluanida	209
CAPÍTOL 6	
Influència de les diferents dosis de coure i de diclofluanida sobre la composició del vi	227
 CONCLUSIONS	 245

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

PLANTEJAMENT INICIAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

La gran superfície de conreu ocupada per la vinya i sobretot les peculiars característiques climàtiques de determinades regions, propicien un hàbitat adequat pel desenvolupament d'un gran nombre de plagues (Otero i col., 1993), que en molts casos són les responsables de la disminució del rendiment i de la qualitat d'una collita, mentre que en altres poden arribar a provocar la pèrdua total de la mateixa amb les conseqüents pèrdues econòmiques que això comporta.

Les vinyes es poden veure afectades pel desenvolupament de malalties endèmiques, especialment les provocades per l'oïdium (*Uncinula necator*), pel mildiu (*Plasmopara viticola*) i la podridura grisa (*Botrytis cinerea*) (García-Cazorla i col., 1994; Domínguez i col., 1995). Per protegir la producció, el viticultor està obligat a aplicar a la vinya successius tractaments amb substàncies anti-fungiques poguent controlar amb certa eficiència el mildiu i l'oïdium, no obstant en el cas de *Botrytis cinerea*, els fungicides no sempre són eficaços degut a l'aparició de soques de *Botrytis cinerea* resistents (Gnaegi i col., 1983; García-Cazorla i col., 1994; Domínguez, 1995).

El problema de la utilització de pesticides sorgeix quan el viticultor els utilitza massivament i sense respectar les especificacions més elementals tals com la dosi, els terminis de seguretat, etc., perquè pensa que la seva collita està en perill sense tenir present les conseqüències que una incorrecta utilització d'aquests productes pot suposar, tant en les qualitats organolèptiques del producte obtingut mitjançant la vinificació, com en la qualitat higiènic-sanitària del mateix (Cassignard, 1980; Gnaegi, 1985).

Actualment el seguiment d'aquesta problemàtica és continu per part de la Organització Internacional per la Lluita Biològica (O.I.L.B.), que basa els seus estudis en el desenvolupament de mètodes de protecció vegetal que puguin complementar la lluita química tradicional, és a dir, el que es coneix com a "lluita integrada", encara que desafortunadament els resultats obtinguts actualment en aquest camp són encara pobres (Schmid i col., 1988; Navarro i col., 1989). Per tant sembla indispensable, avui dia, la utilització de pesticides per la defensa fitosanitària de la vinya. Per això, cal conèixer en la mesura de les nostres possibilitats, els efectes que els diversos plaguicides utilitzats poden produir en el raïm, en el most i en els processos d'elaboració i conservació del vi, així com en el propi organisme del consumidor, principal i darrer destinatari del producte obtingut (Cassignard, 1980; Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985; García-Cazorla i col., 1994; Domínguez, 1995).

De tots els problemes microbiològics que comporta una vinificació, la inhibició de l'activitat fermentativa dels llevats és sens dubte el més greu (Sapis-Domerq, 1977; Shopfer, 1978; Gnaegi i col., 1983; Conner, 1983; Gnaegi, 1985), ja que pot provocar l'aturada

prematura de la fermentació, comportar desviacions bacterianes i alterar la qualitat del vi final.

Els alentiments i les aturades de la fermentació alcohòlica no només són deguts a la presència de pesticides, sinó que poden estar relacionats amb diferents factors que de forma individual o sinèrgicament poden actuar alterant el funcionament metabòlic dels llevats. Malgrat que en els darrers anys, s'han realitzat nombrosos estudis sobre els factors que donen lloc a problemes de fermentació, hi continuen havent molts interrogants sobre quines són veritablement les causes que els provoquen.

Davant d'aquesta problemàtica que ha sorgit com a conseqüència dels episodis d'aturades fermentatives i de les irregularitats en la transformació del most, nosaltres hem iniciat un estudi sobre l'efecte que produeixen les diferents matèries actives anti-fúngiques, sobre el metabolisme glucídic de *Saccharomyces cerevisiae* en condicions reals de vinificació per tal d'esbrinar si realment aquests compostos poden ser responsables dels alentiments i aturades de fermentació, i si és així, quins mecanismes bioquímics hi estan implicats.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

1. PROBLEMÀTICA DELS RETARDAMENTS I ATURADES DE FERMENTACIÓ

La vinificació és un procés complex provocat pel desenvolupament de diferents microorganismes, especialment els llevats que són els responsables de la fase fonamental de la mateixa: la fermentació alcohòlica. No obstant en el most coexisteixen altres microorganismes junt amb els llevats, tals com els bacteris làctics i els bacteris acètics, que també poden metabolitzar els components del most i, per tant, alterar dràsticament la composició química i el perfil organolèptic del vi (Beelman i col., 1982; Joyeux i col., 1984; King i col., 1986; Drysdale i col., 1989; Huang i col., 1996). En condicions normals de vinificació, l'addició d'anhidrid sulfurós junt amb altres pràctiques enològiques limiten el desenvolupament de bacteris làctics i acètics, afavorint la imposició dels llevats durant la fermentació i evitant, d'aquesta manera, l'aparició de desviacions sensorials (Aerny, 1986; Herraiz i col., 1989; Fleet, 1994).

En certes ocasions, en un most en fermentació s'hi pot observar un retardament de la cinètica fermentativa que pot arribar a provocar una aturada de la fermentació. El fenomen anomenat "aturada de fermentació" és actualment un dels problemes que més preocupen als elaboradors de vi, ja que en el most/vi on s'hi ha produït, hi queden encara sucres per fermentar. Quan passa això, l'endleg s'ha d'enfrontar a un greu problema, d'una part el vi no està acabat i cal actuar de pressa per reiniciar altra vegada la fermentació, i d'altra banda existeix la possibilitat que apareixin (en aquest interval de temps) el que es coneix com a picat làctic, és a dir, que els bacteris làctics preguin el relleu als llevats i fermentin els sucres encara presents, donant com a productes del seu metabolisme etanol, CO₂, àcid làctic, i àcid acètic, causant aquest darrer l'aparició de l'agror característica del vinagre (Lafon-Lafourcade i col., 1983; Lafon-Lafourcade i col., 1984; Radler, 1988). Quan s'arriba a aquesta situació el vi resultant no és apte per al consum i llavors s'han de trobar altres solucions per l'aprofitament del mateix. Aquestes solucions normalment no compensen econòmicament la despesa de la inversió inicial. Per tant, els retardaments i aturades de fermentació suposaran un greu problema a resoldre, no només per l'obtenció de vins de qualitat sinó també per l'economia de les empreses del sector.

Des de que la naturalesa biològica de la fermentació va ser demostrada (Pasteur, 1866), els estudis continuats i progressius de la bioquímica i la fisiologia microbianes han estat fonamentals per ajudar-nos a entendre i a controlar el bon desenvolupament de la cinètica fermentativa. Malgrat el que s'ha avançat en aquest camp, el metabolisme dels llevats encara no ha donat a conèixer tots els punts claus de la seva regulació i per tant les causes de les aturades de fermentació no són del tot clares (Manachini i col., 1989; Strehaiano, 1993). Davant de tot això, és obvi que ens cal aprofundir encara més en els estudis de la bioquímica i la fisiologia dels llevats, darrers i únics responsables de la fermentació alcohòlica, per tal de

comprendre millor les raons per les quals es poden produir les aturades de fermentació i, de retruc, poder desenvolupar estratègies destinades a evitar-les.

Saccharomyces cerevisiae és un microorganisme anaeròbic facultatiu. Per aquest motiu pot metabolitzar els sucres de forma aeròbica (respiració) o de forma anaeròbica (fermentació alcohòlica). No obstant, en condicions d'elevades concentracions de sucres (most), l'efecte Crabtree produeix la repressió catabòlica dels enzims del transport electrònic mitocondrial i condiona un funcionament cel.lular orientat cap a una via metabòlica, la fermentació alcohòlica, que genera poca energia (2 ATP/hexosa) i produeix com a principals productes resultants, etanol i CO₂. Tot i que la riquesa de sucres del most és elevada, presenta uns nivells d'altres nutrients (vitamines, aminoàcids, nucleòtids, ...) relativament baixos. Són precisament la carència de nutrients i la presència d'etanol els principals factors que limiten el creixement dels llevats, fent-los molt sensibles a les condicions externes (Strehaiano, 1993).

Durant el desenvolupament de la fermentació alcohòlica, la població de llevats viables segueix una corba característica en la que es distingeixen 4 fases ben diferenciades:

a) Fase de latència: és el període de temps que va des que els llevats entren en contacte amb el most i el començament de la fermentació alcohòlica. En aquesta fase els llevats s'adapten al medi i sintetitzen els enzims necessaris pel seu correcte funcionament metabòlic.

b) Fase de creixement exponencial: Una cop adaptats al medi, els llevats comencen a multiplicar-se. A partir de poblacions de l'ordre de 10⁴ cèl.lules/ml (en el cas de fermentació espontània) o de l'ordre de 5x10⁶ cèl.lules/ml (en el cas d'inoculació), s'arriba a poblacions de l'ordre de 10⁸ cèl.lules/ml (Fleet, 1994). Durant aquest període els llevats utilitzen els sucres com a font d'energia i com a font de carboni per a la síntesi de les seves estructures cel.lulars. La presència en el most de compostos nitrogenats, de vitamines i d'altres nutrients serà el principal factor limitant d'aquesta multiplicació. Al conjunt de factors que augmenta la població màxima de llevats viables se'ls anomena "factors de creixement".

c) Fase quasi-estacionària: La població de llevats deixa de créixer, probablement degut a que un o varis nutrients esdevenen limitants a l'haver estat consumits durant la fase precedent. En la fase estacionària la població de llevats viables es manté més o menys estable.

d) Fase de declinació: La població de llevats viables disminueix progressivament degut a la mort cel.lular. Les causes d'aquesta mortalitat són atribuïdes a la manca de sucres i d'altres nutrients, així com a la presència de l'etanol i d'altres substàncies inhibidores produïdes

pels mateixos llevats. Al conjunt de factors que allarguen la supervivència dels llevats se'ls anomena "factors de supervivència".

L'evolució del creixement dels llevats al llarg de la fermentació alcohòlica sempre segueix una corba d'aquest tipus, si bé la importància relativa de cadascuna de les fases es pot veure afectada per nombrosos factors que influiran notablement en l'èxit de la fermentació. En condicions normals de vinificació aquestes 4 fases del desenvolupament dels llevats es succeeixen de tal manera que, la fase de declinació arriba quan queden pocs sucres per fermentar, tot i que la població de llevats supervivents és capaç de consumir-los. No obstant, quan la fase de declinació té lloc de forma prematura, el risc d'aparició d'una aturada de fermentació és molt alt. Les causes d'aquest fenomen són moltes, i es poden agrupar en quatre grans grups:

- 1.1. Factors limitants
- 1.2. Substàncies inhibidores
- 1.3. Condicions microbiològiques
- 1.4. Pràctiques enològiques

1.1. FACTORS LIMITANTS

Una de les causes dels problemes de fermentació més habitualment descrites en la bibliografia és la carència de nutrients, que implicaria una disminució de la fase de creixement exponencial dels llevats fent que les poblacions viables fossin insuficients per finalitzar la fermentació alcohòlica. Per això, analitzarem a continuació les diferents carències que poden aparèixer en condicions normals de vinificació. Al conjunt d'aquestes substàncies que poden provocar problemes carencials se les anomena "factors limitants".

1.1.1. Nitrogen assimilable

L'esgotament de nitrogen assimilable pels llevats sembla ser una de les causes més importants dels problemes de la fermentació alcohòlica (Lagunas i col. 1982; Busturia i col., 1986; Salmon, 1989; Kunkee, 1991), ja que té una gran influència sobre el desenvolupament de la fermentació, afectant tant la producció de biomassa cel.lular, la cinètica fermentativa, com el temps de durada de la mateixa (Bisson, 1991).

Perquè es dugui a terme la fermentació completa d'un most, la mínima quantitat de nitrogen assimilable que es necessita, ha d'estar al voltant de 140 mg N/l (Agenbach, 1977). Concentracions de 500 mg/l aproximadament, incrementen la població de llevats i la velocitat de fermentació. I pel damunt d'aquests valors, s'eleva la velocitat de fermentació sense que augmenti la població (Agenbach, 1977; Monk, 1982). Però l'òptima velocitat de fermentació

es troba quan les concentracions de nitrogen disponible en el most assoleixen valors al voltant de 900 mg N/l, dels quals només 400-500 mg N/l seran assimilats (Vos i col., 1979, 1980).

El contingut de nitrogen del most variarà en funció de la varietat vinífera, de les variacions climàtiques, del tipus de sòl i de les pràctiques de conreu-fertilització (Ingledeu i col., 1985). La fracció nitrogenada del most agrupa bàsicament nitrogen amínic (de 10 a 146 mg/l), aminoàcids (de 14 a 182 mg/l), pèptids (de 10 a 132 mg/l) i proteïnes (de 10 a 100 mg/l), si bé també trobarem quantitats traça de purines, pirimidines, vitamines nitrogenades i fins i tot nitrats (Fleet, 1994). Els llevats únicament poden assimilar el nitrogen amínic i els aminoàcids (Kunkee, 1991), i per tant el conjunt d'aquestes dues fraccions s'anomena nitrogen assimilable.

El fet de que el contingut de nitrogen assimilable del most sigui o no suficient per a garantir un correcte desenvolupament de la fermentació, sembla estar més aviat relacionat amb les tècniques d'obtenció del most que amb les característiques del raïm. En la vinificació en negre, al fermentar conjuntament el most amb les pells i els pinyols, l'aport de nitrogen assimilable és normalment suficient per a garantir la finalització del procés. No obstant en la vinificació en blanc, al fermentar únicament el most, les carències poden aparèixer especialment quan els processos tecnològics utilitzats són molt agressius (Agenbach, 1977; Monk, 1982; Monk i Cowley, 1984; Monk i Costello, 1984; Busturia i col., 1986; Salmon, 1989; Bely i col., 1990a; Bataillon i col., 1996).

Les deficiències de nitrogen sembla que poden afectar en dos nivells:

a. limitant la velocitat de creixement de la població de llevats i la formació de biomassa, resultant com a conseqüència, un decreixement del consum dels sucres del most (Agenbach, 1977; Monk, 1982; Bely i col., 1990a).

b. afectant la reducció de l'activitat específica del catabolisme de sucres a nivell cel·lular (Busturia i col., 1986; Salmon, 1989).

El primer nivell sembla estar relacionat amb el fet de que el nitrogen assimilable és un factor de creixement indispensable, i per tant la seva manca condicionarà el creixement de les poblacions de llevats (Agenbach, 1977; Monk, 1982; Bely i col., 1990a). El segon nivell sembla estar relacionat amb les necessitats de nitrogen per al recanvi proteic. Si bé la concentració de la majoria de les proteïnes importants pel metabolisme permaneixen relativament estables en condicions de carència de nitrogen, alguns autors han trobat que els transportadors dels sucres estan molt afectats en aquestes condicions (Busturia i col., 1986; Salmon, 1989).

Busturia i Lagunas (1986) i Salmon (1989) observen que cèl.lules amb carència de nitrogen sofreixen una aturada de la seva síntesi proteica que afecta directament al recanvi dels sistemes de transport de sucres (amb una vida mitjana de 6 h en cèl.lules fermentant) i com a conseqüència d'això, hi ha una disminució del catabolisme dels sucres. La completa inactivació del transport de glucosa té lloc 50 h després de la carència de nitrogen (Salmon, 1989). En canvi en aquestes condicions, la bomba de protons que intervé en els sistemes de transport actiu dels aminoàcids i de l'amoni, té una vida mitjana una mica més llarga (11h) però al contrari del que podríem pensar, la seva velocitat màxima està estimulada, possiblement per prevenir la mort dels llevats a causa de la acidificació intracel.lular que resultaria de l'activitat glicolítica (Benito i col., 1992).

Les investigacions de Salmon (1989) han proporcionat una idea sobre la influència de la disponibilitat de nitrogen en el desenvolupament de la fermentació alcohòlica, comparant les reserves d'amoni intracel.lular, la síntesi proteica i la biomassa en relació amb el nitrogen assimilable extracel.lular. Aquest autor demostra que en presència d'una mínima quantitat de nitrogen (p.e. amoni; 150 mg N/l), la cel.lula té uns nivells d'amoni constants (1-2 mM) de cara a mantenir la síntesi proteica fins que s'esgoti la font de nitrogen. Aquesta fermentació acaba aproximadament al cap de 100 h, comparat amb les 60 h que dura una fermentació en condicions quasi òptimes (390 mg N/l). Si comparem aquestes cinètiques fermentatives amb les d'un medi amb molt poc nitrogen (23,5 mg N/l), s'observa que les reserves intracel.lular d'amoni s'incrementen fortament fins al voltant de 5,5 mM després de què la concentració extracel.lular s'hagi exhaurit, i una mica més tard baixen bruscament. En canvi la síntesi proteica continua fins que les reserves intracel.lulars s'esgotin i al mateix temps la velocitat de la fermentació disminueix significativament. Això fa pensar que el nitrogen per la síntesi proteica procedeix de les reserves vacuolars. En aquestes condicions menys de 80 g/l de sucres es consumeixen en 190 h a 24°C.

Des que la reserva intracel.lular d'amoni es presentà com a estimulador de la síntesi proteica, alguns factors que afecten la seva regeneració, a més de la seva concentració en el medi, poden comprometre en darrer terme la velocitat de fermentació. Els factors que regulen la capacitat d'utilització pels llevats dels compostos nitrogenats presents en un most són: la naturalesa química del compost, la concentració d'etanol, el pH, el O₂, la clarificació i les deficiències vitamíniques (Monteiro i col., 1991; Jiranek i col., 1995; Sablayrolles i col., 1996). Particularment l'oxigen, és necessari per a garantir la síntesi d'esterols i d'àcids grassos insaturats, indispensables per mantenir en bon estat la membrana plasmàtica. En cas de carència d'oxigen, els transportadors de membrana responsables de la captació del nitrogen assimilable, poden veure's afectats per una incorrecta composició lipídica de la mateixa (Salmon, 1989).

Davant del problema de la carència d'aquest element la solució proposada és la suplementació del most amb compostos nitrogenats. Concretament s'autoritza l'addició de sals d'amoni per afavorir el desenvolupament de la fermentació (Reglament CEE, 1988). La importàcia de l'amoni com a estimulador de la fermentació i com a estimulador de la formació de biomassa està ben documentada (Cantarelli, 1957; Agenbach, 1977; Yoshino i col., 1982; Rozes i col., 1988; Salmon, 1989; Monteiro i col., 1991). Tot i amb això, la suplementació amb sals d'amoni recupera el creixement dels llevats, la síntesi proteica i la velocitat de desprendiment de CO₂ només quan la carència s'ha donat en la fase exponencial de creixement. Més enllà d'aquesta fase, només trobem un increment transitori de la velocitat de desprendiment del CO₂ (Salmon, 1989).

L'estimulació de l'amoni en l'activitat fermentativa pot estar relacionada amb la seva preferencial acumulació en les cèl.lules i amb el seu paper central en l'anabolisme cel.lular. A part de l'estimulació proteica, de la síntesi d'àcids nucleics, del manteniment de l'elevada activitat del recanvi de proteïnes metabòliques, també se li han atribuït al nitrogen, altres funcions :

- intervenció en l'estimulacio-regulació de la glucòlisi (Lloyd i col., 1983) activant la fosfofructoquinasa i la piruvat quinasa (Yoshino i col., 1982).
- gran eficiència en la producció d'etanol i de manera residual producció d'alcohols superiors durant la fermentació de la glucosa (Slaughter i col., 1978; Devine i col., 1980).

No obstant en una fermentació que s'ha relentit o bé que s'ha aturat com a conseqüència d'una deficiència de nitrogen, la suplementació d'aquesta mancança no necessàriament restaura la dinàmica del catabolisme dels sucres, tot i que l'addició de nitrogen en els estadis inicials del problema normalment és efectiva (Salmon, 1989; Bely i col., 1990a). En casos molt greus també és fa necessària una reinoculació de llevats per reiniciar la fermentació (Amerine i col., 1980).

1.1.2. Oxigen

Encara que els llevats no necessitin oxigen pel seu metabolisme energètic en condicions de vinificació, si que el necessiten per certes reaccions de síntesi. Per aquesta raó, les condicions d'anaerobiosis estricta poden afectar negativament el desenvolupament de la fermentació alcohòlica (Strehaiano, 1993).

Els principals processos anabòlics en que l'oxigen és necessari, són la síntesi dels esterols i dels àcids grassos insaturats (Strehaiano, 1993; Fleet, 1994). Tant els esterols com

els àcids grassos insaturats són components indispensables de la membrana plasmàtica (Hunter i col., 1971). Aquests components necessiten de l'oxigen molecular com a acceptor d'hidrogen tant en la primera reacció de la biosíntesi d'esterols, catalitzada per l'esqualémono-oxigenasa (Henry, 1982), com durant la introducció dels dobles enllaços en la formació dels àcids grassos insaturats, per l'enzim desaturasa (Kirsop, 1982).

L'ergosterol és l'esterol lliure més abundant en els llevats. Tant l'ergosterol com el seu precursor 24(28)-dehidroergosterol es troben en grans quantitats (Rodríguez i col., 1985). L'ergosterol el trobem formant part de dos tipus de reserves intracel·lulars, o bé com a esterols lliures disponibles per la biosíntesi de membranes o bé en forma de gotetes lipídiques esterificats amb els àcids grassos, en el citosol. Aquestes dues formes són interconvertibles una en l'altra (Fenner i col., 1989; Mauricio i col., 1986).

En condicions aeròbiques, els llevats sintetitzen i incorporen els esterols i els àcids grassos insaturats en la seva membrana (Mauricio i col., 1986; Youngs i col., 1990). No obstant, en condicions d'anaerobiosi estricta no ho poden fer, així doncs, la multiplicació cel·lular estarà limitada per les reserves que disposin. Cal remarcar que el desprendiment de CO₂ durant la fermentació alcohòlica impedeix l'aport d'oxigen, fet que conduirà a una situació d'anaerobiosi durant la fermentació alcohòlica en condicions de vinificació reals.

Mauricio i col. (1991) ens demostren que l'efecte inhibitori de la anaerobiosi respecte al creixement dels llevats i a l'activitat fermentativa, es pot compensar per l'addició d'ergosterol i d'àcid oleic en el most. Evidentment, l'addició d'aquests lípids al most no és viable ja que podria alterar organolèpticament els vins resultants. Per això, la pràctica enològica aconsella procedir a l'aireació dels mostos durant la fase exponencial de creixement dels llevats. D'aquesta manera l'aport d'oxigen afavorirà la multiplicació cel·lular, i s'obtidran poblacions superiors (Lafon-Lafourcade i col., 1977; Dalh i col., 1985; Streaihan, 1993). Per aquesta raó, l'oxigen és un factor de creixement.

Ara bé, els esterols i els àcids grassos insaturats a més de ser indispensables per la multiplicació cel·lular, són necessaris per a garantir la fluïdesa de membrana en el manteniment de l'elevada activitat fermentativa (Larue i col., 1980; Lorezn i col., 1986), i per adaptar-se a les condicions cada vegada més agressives del medi degudes a la producció d'etanol i d'altres subproductes de la fermentació (Beavan i col., 1982; Rodriguez i col., 1985). De fet s'ha comprovat que l'oxigen no tan sols és un factor de creixement si no que també és un factor de supervivència, ja que al afavorir la síntesi d'esterols i d'àcids grassos insaturats, permet que els llevats tinguin una correcta composició lipídica de la membrana plasmàtica i mantinguin, per tant, una millor supervivència en les darreres fases de la fermentació (Ingledeu i col., 1985; Edwards i col., 1990).

1.1.3. Vitamines

En la majoria dels casos un most conté unes concentracions suficients de vitamines (inositol, tiamina, biotina, àcid pantoteic, àcid nicotínic, piridoxina, etc...) que permeten el creixement de *Saccharomyces cerevisiae* (Monk, 1982; Ough i col., 1989). Normalment els llevats utilitzen les vitamines com a requeriments per la producció de coenzims necessaris per al correcte funcionament del seu metabolisme, aquest és el cas de l'àcid pantoteic i la piridoxina que les utilitzen per la síntesis de metionina i cisteïna, respectivament (Wainwright, 1970, 1971), o el de la tiamina necessària per a la síntesi de TPP (pirofosfat de tiamina) que actua com a cofactor de la piruvat descarboxilasa (Dyke, 1965).

La pèrdua del contingut vitamínic degut a tractaments dràstics del most (clarificacions excessives, filtratges intensos) es pot solucionar mitjançant la suplementació dels mostos amb vitamines. En aquest cas tan sols s'autoritza l'addició de tiamina (Reglament CEE, 1988), i s'ha comprovat que efectivament, la seva addició incrementa la velocitat de creixement de *Saccharomyces cerevisiae* (Monk, 1984; Monk i col., 1984).

Recentment Bataillon i col. (1996), han descrit que les carències de tiamina poden influenciar la cinètica fermentativa provocant retardaments i fins i tot, aturades en la fermentació, per la qual cosa la seva addició al most en fermentació és molt recomenable.

1.1.4. Contingut mineral

En un estudi sistemàtic de la producció de biomassa i dels estimulants de la fermentació, Monteiro i col. (1991) van trobar que l'activitat fermentativa responia no tant sols a l'amoni i les vitamines, sinó que també ho feia a grans quantitats de sals i elements traça. Aquests autors, com a resultat dels seus experiments, afirmen que el fosfat i molts ions minerals (Ca^{++} i Mg^{++}) estimulen la fermentació. D'altra banda, s'ha comprovat que el magnesi estimula molt la producció de biomassa (Dombek i col., 1986).

Tot i amb això, malgrat el seu efecte activador de la fermentació, no s'ha descrit cap cas de retardament o aturada de fermentació degut a la deficiència d'ions minerals, doncs normalment els mostos solen contenir com a mínim 4 mM de Mg^{++} i 2,5 mM de Ca^{++} , quantitats suficients per dur a terme un correcte desenvolupament de l'activitat fermentativa (Dombek i col., 1986; Nabais i col., 1988; Kunkee, 1991).

De la mateixa manera que en el cas de les carències de nitrogen i les carències vitamíniques, els baixos continguts en elements minerals els trobem en mostos que han estat sotmesos a processos enològics dràstics (Fleet, 1994).

1.2. SUBSTÀNCIES INHIBIDORES

A més dels possibles problemes de fermentació deguts a les carències nutricionals, les aturades de fermentació alcohòlica també poden estar relacionades amb la presència de substàncies inhibidores d'origen exogen com l'anhídrid sulfurós i els pesticides, d'origen endogen com els sucres, o bé per substàncies que són produïdes pels mateixos llevats tals com l'etanol, els àcids grassos de cadena curta i l'àcid acètic.

1.2.1. Sucres

Les concentracions de sucres fermentables en mostos varia entre 125-275 g/l, depenent de la varietat i de les característiques edafo-climàtiques (Benda, 1982). En casos extrems en els que els raïms han estat infectats per *Botrytis cinerea* (podridura) les concentracions de sucres poden sobrepassar els 400 g/l (Lafon-Lafourcade, 1983).

Les velocitats de creixement dels llevats varien segons les concentracions de sucres (Fleet, 1992). Estudis amb cultius purs de *Saccharomyces cerevisiae* demostren que la velocitat i l'activitat fermentativa decreixen si les concentracions inicials de sucres del most sobrepassen els 200 g/l. Aquestes elevades concentracions afecten el creixement dels llevats incrementant la fase de latència, fent devaluar la velocitat de creixement i fan decreïxer la població màxima de cèl.lules (Lafon-Lafourcade, 1983; Monk i col., 1984).

Un excés de substrate pot provocar un bloqueig de l'activitat metabòlica (el cas dels mostos concentrats), però sense arribar a aquest cas extrem, podem trobar que unes concentracions crítiques, poden arribar a inhibir algunes vies metabòliques. Un dels exemples més significatius és la repressió per catabolít de la glucosa (efecte Crabtree), pel damunt d'un nivell crític de concentració de sucres (9 g/l en el cas de *Saccharomyces cerevisiae*) la via respiratòria s'inhibeix i es posa en funcionament la via fermentativa en presència d'oxigen (van Urk i col., 1989; Strehaiano, 1993).

1.2.2. Etanol

Una de les causes a les que sempre s'han atribuït els retardaments i aturades de fermentació, ha estat les elevades concentracions d'etanol produït. Fins i tot la moderna indústria cervesera ha detectat aquests tipus de problemes (Casey i col., 1984).

L'efecte inhibitori de l'etanol s'ha detectat en els estadis inicials de la fermentació, quan les velocitats de creixement dels llevats són més sensibles a l'etanol que les velocitats de fermentació (Leão i col., 1985; Navarro i col., 1978). Aquest efecte inhibitori ha estat mesurat

durant el creixement dels llevats (Aiba i col., 1968; Thomas i col., 1979; Beavan i col., 1982) i es coneix que actua a nivell d'inhibició del transport de sucres i d'aminoàcids (Kunkee i col., 1993). No obstant, en un most en fermentació, la concentració d'etanol necessària perquè es doni un efecte en el creixement dels llevats no es fa palesa fins que els llevats no es troben en fase estacionària (Boulton, 1980; Pamment, 1989) i d'una manera més òbvia la trobem en els estadis finals de la fermentació.

Quan la fermentació alcohòlica està acabant, l'efecte inhibitori de l'etanol actua canviant la permeabilitat de la membrana plasmàtica del llevat:

-conduint a una pèrdua dels constituents cel.lulars, especialment els ions metàl.lics (Mg i Ca). La suplementació d'aquests components recupera la inhibició (Dombeck i col., 1986; Nabais i col., 1988). De fet com el most és molt ric en aquests elements, la recuperació té lloc d'una manera natural (Kunkee i col., 1993).

-produint increments en la difusió passiva de protons, i com a resultat tenim una acidificació o desacidificació del medi depenent del pH inicial i de l'etanol produït (Leão i col., 1984b, Juroszek i col., 1987; Delfini i col., 1989; Malfeito-Ferreira i col., 1990).

-augmentant l'activitat de la ATPasa. L'increment de la difusió passiva de protons esmentat anteriorment, fa que hi hagi una gran despesa de ATP necessari per extreure l'excés de protons intracel.lulars, per tal de mantenir el seu pH intern dintre dels límits convenients (Kunkee i col., 1993).

-canviant la fluïdesa de la membrana plasmàtica (Kunkee i col., 1993; Sun i col., 1985; Goldstein, 1987). Els canvis en la permeabilitat de membrana i en la seva fluïdesa estan correlacionats amb la composició d'esterols i dels àcids grassos insaturats (Veieu apartat 1.1.2.).

Com a conseqüència d'això, resulta evident que l'etanol contribueix de manera important en la inhibició de l'activitat fermentativa dels llevats. Com l'etanol és un constituent indispensable del vi, les solucions per pal.liar el seu efecte tòxic sobre els llevats estan dirigides bàsicament cap a la utilització de soques seleccionades per la seva gran capacitat de resistència a l'etanol. En el cas de zones vitícoles on els vins assoleixen graus alcohòlics elevats, és especialment recomanable realitzar aireacions del most durant la fase exponencial del creixement, per afavorir la correcta composició lipídica de la membrana plasmàtica dels llevats en les darreres etapes de la fermentació.

1.2.3. Àcids grassos

Els àcids grassos de cadena curta, amb cadenes entre 6 i 12 carbonis, tenen una forta activitat contra els llevats, mostrant un fort efecte inhibitori en el creixement de *Saccharomyces cerevisiae* en cultius en condicions d'anaerobiosi. En aquestes condicions hi ha una producció més gran d'aquests àcids (Lafon-Lafourcade i col., 1984; Larue i col., 1989; Edwards i col., 1990). La toxicitat d'aquestes substàncies augmenta amb la longitud de la cadena carbonada de l'àcid (Nordström, 1964).

Durant la fermentació alcohòlica del most de raïm hi ha una producció, per part dels llevats, d'àcids octanoic i decanoic (Geneix, 1984). De la mateixa manera que l'etanol, aquests àcids s'excreten al medi i interaccionen amb la membrana insertant-se en la zona hidrofòbica interior, ja que a valors de pH al voltant de 3 (el pH del most està, en general, al voltant de 3.5) aquests àcids es troben en la seva forma no dissociada, la qual és soluble en els fosfolípids de la membrana (Viegas i col., 1988). Aquest fet produirà una disminució de l'organització espacial de la membrana, i com a resultat hi haurà un augment de la permeabilitat d'aquesta (Eliasz i col., 1976), així com també s'observarà una alteració dels enzims involucrats en el transport provocant una inhibició no competitiva de les seves activitats (Fresse i col., 1973; van Uden, 1985).

A valors de pH en els quals els àcids són solubles en els fosfolípids de la membrana, aquests àcids poden entrar cap a l'interior de la cèl·lula per difusió passiva a través de la membrana plasmàtica. Aquest fet provoca que també alguns enzims del citoplasma puguin veure's afectats negativament per una disminució del pH intern causada per la dissociació dels àcids en el citoplasma (pH citoplasmàtic \approx 7.0) (Cole i col., 1987). L'acumulació intracel·lular d'ions a pH extern baix, sembla que pot ser una de les causes de la toxicitat d'aquests àcids, a causa de la desaparició del gradient de protons necessari pel transport actiu de substàncies a través de la membrana plasmàtica.

Els àcids grassos disminueixen la velocitat màxima de creixement, el rendiment de la biomassa i també retarden l'inici del creixement de *Saccharomyces cerevisiae* (Viegas i col., 1988). S'ha pogut comprovar que l'àcid decanoic provoca uns efectes més forts que l'octanoic, i que en presència d'etanol hi ha una actuació sinèrgica d'aquest amb cada un dels àcids que fa que els efectes es vegin augmentats. Així per exemple, a pH de 3, en medis on s'ha addicionat 8 mg/l d'àcid octanoic i 4 mg/l d'àcid decanoic en presència de 6% (v/v) d'etanol, s'ha observat una reducció de la velocitat específica de creixement d'un 33,1% i un 45,3% respectivament en *Saccharomyces bayanus* (Sá-Correira i col., 1989).

Alexandre i col. (1996) han comprovat que l'àcid decanoic altera els constituents lipídics de la membrana cel.lular (modificació en la distribució dels fosfolípids i esterols) incrementant la fluïdesa de la mateixa de tal manera que provoca una activació de la H⁺-ATPasa.

Per tal de solventar aquest problema, s'ha intentat estudiar un mètode consistent en afegir en el medi escorces de llevats. Aquestes escorces són parets cel.lulars de llevat, que fixen sobre la seva superfície els àcids grassos (Sá-Correira i col., 1989; Larue i col., 1989; Munoz i col., 1989a; Edwards i col., 1990). Però segons Munoz i col. (1989b, 1990) aquestes escorces també les pot utilitzar el llevat com a font d'esterols, els quals actuen com a factors de supervivència pel seu creixement.

1.2.4. Àcid acètic

L'àcid acètic és el principal producte de l'oxidació de l'etanol pels bacteris acètics. Però l'àcid acètic també pot ser format anaeròbicament pels bacteris làctics a partir dels sucres, particularment a partir de les pentoses, així com també a partir dels àcids carboxílics. Els llevats per la seva part, el poden produir com a subproducte de la fermentació alcohòlica. La toxicitat de l'àcid acètic es prou coneguda, doncs s'utilitza com aditiu antimicrobià en els productes alimentaris (Fleet, 1994).

Tot i que alguns autors han descrit un efecte inhibitori de l'àcid acètic respecte a l'actuació dels llevats (Pinto i col., 1989), van ser Pampulha i Loureiro (1989) els que van estudiar l'efecte sinèrgic d'aquest amb l'etanol durant la fermentació alcohòlica. Aquests autors afirmen que la toxicitat de l'àcid acètic prové majoritàriament de la seva forma no dissociada, la concentració de la qual augmenta a pH baixos (pH=3,5) disminuint la velocitat de fermentació, i que aquesta resposta es veu incrementada de forma sinèrgica en presència d'etanol.

Recentment Jones i col. (1994) han suggerit que un excès d'àcid acètic (acidesa volàtil) en el most pot provocar un retardament o aturada de la fermentació.

Els nivells d'acidesa volàtil presents en vins normalment oscil.len entre 0,15 i 0,74 g/l, mentre que els que han sofert una aturada de fermentació es troben aproximadament al voltant de 3 g/l (Lafon-Lafourcade, 1980).

1.2.5. Anhídrid sulfurós

En l'elaboració del vi, la utilització de SO₂ és absolutament indispensable pel seus efectes antioxidants i antisèptics. Concretament el SO₂ és un potent inhibidor de les polifenol oxidases (tirosinasa i lacasa), i per tant els enòlegs l'utilitzen per evitar l'enfosquiment dels mostos i vins. El SO₂ també s'utilitza pel control dels microorganismes, ja que exerceix un efecte inhibidor sobre els bacteris làctics, els bacteris acètics i els llevats oxidatius (Ribéreau-Gayon i col., 1989).

Com a producte antimicrobià, el SO₂ pot tenir els següents efectes:

- incrementa la fase de latència i retarda l'inici de la fermentació
- baixa la velocitat de creixement dels llevats i prolonga la durada de la fermentació
- accelera les fases de declinació i mort cel.lular
- té efectes selectius sobre les espècies que es desenvolupen i contribueixen a la fermentació

Els seus efectes poden ser diversos, desde l'inocuitat fins a la toxicitat, depenent de la concentració de SO₂ afegit, de la composició del most (el qual afectarà la proporció de SO₂ molecular o lliure), i de la resistència de les soques o espècies de llevats respecte al SO₂ (Rose i col., 1989).

Saccharomyces cerevisiae tot i que és el principal llevat de la fermentació alcohòlica, no és l'espècie predominant en els inicis de la fermentació. La microflora d'aquests estadis està basicament formada per llevats apiculats dels gèneres *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, i altres espècies de llevats (Zambonelli i col., 1989). Quan s'afegeix SO₂ al most, l'objectiu és suprimir el creixement de les espècies pioneres per tal d'afavorir el desenvolupament de *Saccharomyces cerevisiae*. Normalment aquesta espècie es desenvolupa per si sola, però actualment és una pràctica habitual, incorporar-la per inoculació, fet que afavoreix la seva ràpida imposició (Fleet, 1994).

L'addició de 50 mg/l o més de sulfurós (total) al most, fa que baixi 10 vegades la població inicial de llevats, donant una fase de latència d'un o dos dies de durada abans de l'inici de la fermentació (Goto, 1980; Heard i col., 1988a; Moore i col., 1988). Per tant l'addició de SO₂ als mostos és selectivament restrictiva per les espècies que no pertanyen al gènere *Saccharomyces* afavorint el desenvolupament de les que pertanyen a aquest gènere (Constantí i col., 1997). Però això, s'ha comprovat que no sempre passa. Addicionant al most concentracions habituals de SO₂ (50-100 mg/l), Fleet i col. (1984) i Heard i col. (1985, 1986) van comprovar que no hi havia efecte sobre els llevats dels gèneres *Kloeckera* i *Candida*. A similars conclusions també hi arribaren Goto (1980), Moore i col. (1988), Martinez i col. (1989) i Mora i col. (1990, 1991). Aquests resultats fan que es qüestionï l'eficàcia del SO₂ per

al control de les poblacions dels llevats que inicien la fermentació, un dels principals objectius del seu ús en enologia.

Les propietats antisèptiques del vi són degudes principalment al SO₂ molecular, la concentració del qual depèn del contingut en el vi de SO₂ lliure i del pH. El SO₂ molecular és al voltant de 50 vegades més actiu sobre els llevats que les altres formes de SO₂ lliure, ja siguin ions sulfít o bisulfít (Aerny, 1986). El SO₂ combinat, pràcticament no presenta activitat antimicrobiana. En absència de SO₂ lliure, una concentració més gran de 40 mg/l de SO₂ combinat té una acció inhibidora per al desenvolupament dels bacteris làctics, potser degut a l'atac de les combinacions bisulfítiques pels bacteris làctics, que provoca la formació de SO₂ lliure (Aerny, 1986).

King i col. (1981) descriuen les dificultats de la mesura dels efectes del SO₂ en llevats a causa de la influència del pH i de les substàncies que es lliguen al SO₂. Aquests autors observen que aproximadament concentracions entre 1 i 2 mg/l de SO₂ molecular inhibeixen l'espècie *Saccharomyces cerevisiae*, però a pH=3,5 calen aproximadament 100 mg/l de SO₂ total per aconseguir resultats similars, doncs la majoria es dissocia a io bisulfít.

Per altra part, Ough i col. (1988) observen que 50 mg/l de SO₂ lliure inhibeixen el creixement de *Saccharomyces cerevisiae* en un vi a pH=3, però no l'inhibeixen a pH=3,2. A partir d'aquests resultats conclouen que l'anió bisulfít i les formes combinades del SO₂ tenen un petit efecte inhibidor sobre els llevats (Carr i col., 1976; Schimz, 1980; Sudraud i col., 1985).

Segons Suzzi i col. (1982), el sulfitat exerceix una acció indirecta que afavoreix el creixement de les soques de *Saccharomyces* amb resistència natural, i una acció directa que promou l'aparició de soques mutants resistents.

El SO₂, apart d'afectar la microflora fermentativa també pot alterar l'activitat metabòlica dels llevats que participen en la fermentació i la composició química del vi final. En aquest sentit, vins fermentats en presència de SO₂ presenten nivells més alts d'acetaldehid (Herraiz i col., 1989).

1.2.6. Residus dels productes fitosanitaris (Veieu l'apartat 3 d'aquesta introducció, on desenvolupa detalladament l'efecte d'aquestes substàncies inhibidores)

1.3. CONDICIONS MICROBIOLÒGIQUES

Un altre factor a tenir en compte per al correcte desenvolupament de la fermentació alcohòlica, són les interaccions entre els diferents microorganismes presents en el most, que segons certs autors poden condicionar l'aparició de retardaments i aturades de fermentació.

1.3.1. Interaccions dels llevats fermentatius amb altres micoorganismes

En el raïm d'una manera natural hi conviuen diverses espècies de microorganismes tals com fongs fil.lamentosos, llevats, bacteris làctics i bacteris acètics. Les seves poblacions oscil.len segons la quantitat de pluja caiguda abans de la verema, dels danys físics de les baies, de l'ús dels fungicides i del temps transcorregut entre la verema, el premsat i la fermentació. El creixement d'algunes d'aquests espècies en els raïms o bé en el most podrà alterar la composició química del mateix i generar productes que podran afectar el creixement dels llevats (Fleet, 1994).

La micologia de les baies, fins ara, ha estat pobrement investigada. Tot i que són molt significatius els estudis de l'ecologia i l'activitat bioquímica de *Botrytis cinerea* en les baies (Ribéreau-Gayon i col., 1980), altres espècies de fongs tals com *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* i *Alternaria* també es podem trobar i poden créixer en aquests hàbitats (Davenport, 1974; Nair, 1985). Individual o col.lectivament, el creixement d'aquestes espècies pot afectar significativament la composició i les propietats del most (Bayonove, 1989). Per altra part, hi han tipus d'infeccions degudes a *Botrytis cinerea* que poden inhibir (Ribéreau-Gayon, 1985) o bé activar (Reed i col., 1988) la fementació alcohòlica, especialment en mostos que tenen elevades concentracions de sucres.

La importància dels bacteris acètics en enologia s'exten molt més enllà del seu tradicional paper com a causants del picat acètic (Lafon-Lafourcade i col., 1981; Drysdale i col., 1988). Els bacteris englobats amb el nom gènic de bacteris acètics corresponen als gèneres *Acetobacter* i *Gluconobacter*. Aquests bacteris poden desenvolupar-se en els raïms sobretot si han estat malmenats físicament pels agents climatològics o bé per altres causes, i llavors contaminen el most podent desenrotllar poblacions pel damunt de 10^6 ufc/ml.

Una davallada de l'activitat fermentativa en mostos fermentats per *Saccharomyces cerevisiae* es va detectar quan *Acetobacter aceti* i *Gluconobacter oxydans* havien crescut en el most abans de ser inoculat pels llevats (Joyeux i col., 1984). El factor que produïa aquest antagonisme entre microorganismes no era altre que l'àcid acètic (Grossman i col., 1984). Drysdale i col. (1989) fan un estudi detallat del creixement combinat entre bacteris acètics (*Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti* i *Gluconobacter oxydans*) i llevats

(*Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata* i *Candida stellata*) en el most. Les cinètiques de creixement de les diferents espècies i els canvis químics en la composició del most demostren que el creixement del conjunt llevats-bacteris limita el correcte desenvolupament de la fermentació alcohòlica.

Els principals bacteris làctics associats als vins són: *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvulus* i diverses espècies de *Lactobacillus*. Aquests bacteris es troben en les baies a baixes concentracions de població (aproximadament 10^3 ufc/ml) i generalment s'extingeixen durant la fermentació alcohòlica (Fleet i col., 1984). Per tant el seu efecte és petit o menyspreable respecte al creixement dels llevats. No obstant això, factors que endarrereixen el començament de la fermentació alcohòlica, afavoreixen el desenvolupament d'aquestes espècies de bacteris i el consum de components del most que haurien de ser utilitzats pels llevats. Per això aquest antagonisme competitiu afecta directament al creixement dels llevats i alenteix la fermentació alcohòlica (Beelman i col., 1982; King i col., 1986). A part de la competició pels nutrients, la producció d'àcid acètic i altres productes del metabolisme també poden afectar el creixement dels llevats i la cinètica fermentativa (Beelman i col., 1982; Huang i col., 1996).

1.3.2. Toxines "Killer"

L'acció "killer" és deguda a les toxines produïdes i secretades per les soques de llevats anomenades "killer". Les toxines "killer" són proteïnes (Palfree i col., 1979; Ashida i col., 1983; Bostian i col., 1984) o glucoproteïnes (Bussey i col., 1975; Middelbeek i col., 1979; Pfeiffer i col., 1982; Sugisaki i col., 1984; Yokomori i col., 1988a) les quals són letals pels llevats sensibles a elles. No obstant, les soques "killer" són immunes a les toxines que elles mateixes produeixen.

El fenomen "killer" ha estat observat en molts gèneres de llevats, incloent soques de laboratori i industrials, així com també en llevats aïllats d'hàbitats naturals i clínics.

Les propietats conferides pel factor "killer" en *Saccharomyces cerevisiae* estan associades als plàsmids citoplasmàtics de ARN (dsARN) de doble cadena (Mitchell i col., 1973) els quals són encapsulats en partícules víriques (Herring i col., 1974) que codifiquen els precursors de les toxines (Bostian i col., 1980). El caràcter "killer" en la majoria dels altres gèneres de llevats està determinat per gens cromosòmics (Stamer i col., 1987; Yokomori i col., 1988b) tot i que també pot estar determinat per plàsmids de ADN (Gunge i col., 1981) o plàsmids de ARN (Kitano i col., 1987; Zorg i col. 1988).

Un gran nombre de llevats "killer" salvatges de diferents gèneres han estat aïllats en most, i algunes d'aquestes soques han produït retardaments o aturades de fermentació (Kitano i col., 1984; Shimizu i col., 1985; van Vuuren i col., 1986; Heard i col., 1987; Benda, 1989; van Vuuren i col., 1992). També s'ha observat el caràcter "killer" en algunes soques de llevats comercials utilitzats en fermentacions víniques (Barre i col., 1982; Shimizu i col., 1985; Thornton, 1986).

Els alentiments i aturades de fermentació causats pels llevats productors de toxines "killer", provoquen en els vins finals resultants un increment dels nivells d'acetaldehid, àcid làctic, àcid acètic i altres defectes sensorials (Van Vuuren i col., 1986).

A part del gènere *Saccharomyces* hi han altres soques de llevats amb aquesta característica que també poden causar alentiments i aturades de fermentació, aquest és el cas de les toxines produïdes per la soca *Hanseniaspora uvarum* que al actuar sobre les soques sensibles de *Saccharomyces cerevisiae*, retarden l'inici de la fermentació de 10 a 20 dies (Radler i col., 1988).

Per solucionar els problemes provocats per les toxines "killer" en les fermentacions, Radler i col. (1987) proposen afegir al most substàncies que segrestin proteïnes, tals com la bentonita o les escorces de llevats. Tot i que, en segons quins casos, també es poden inocular llevats resistents a les esmentades toxines (pot ser que sigui la millor solució).

Els llevats productors de toxines "killer" poden oferir aventatges respecte als llevats convencionals a l'hora de fermentar un most (Fleet, 1994):

-es poden seleccionar per eliminar certes soques que causen problemes d'alentiments o aturades de fermentació, i que per tant poden produir males olors i mals gustos.

-es poden seleccionar adquirint immunitat contra algunes toxines d'altres soques de llevats, i d'aquesta manera es poden imposar sobre l'altra soca conduint una fermentació en bones condicions.

-es poden seleccionar per produir toxines "killer" estables, que protegeixin el vi de les infeccions per altres llevats que podrien malmenar el producte final.

1.4. PRÀCTIQUES ENOLÒGIQUES

Les pràctiques enològiques tenen un paper fonamental per al bon desenvolupament de la fermentació alcohòlica. Concretament la pràctica del desfangat condiciona de manera important la disponibilitat de nutrients pels llevats. D'altra banda, el control tèrmic de la fermentació té una gran influència sobre la cinètica fermentativa i sobre la taxa de mortalitat dels llevats en les darreres etapes de la fermentació

1.4.1. Desfangat

El procés de neteja dels mostos s'ha convertit en un dels punts principals del progrés qualitatiu per l'obtenció de vins blancs i rosats.

Els fangs del most estan constituïts per fragments de les parts sòlides del raïm, membranes cel·lulars, mucíl·lags, grànols terrosos, insectes etc., que representen sempre una font d'inconvenients, com el lliurament de substàncies fenòliques i de metalls pesants. En els fangs també hi podem trobar una forta activitat tirosinasa (polifenol oxidasa de la pell del raïm), principalment lligada als sòlids en suspensió i que oxidarà els polifenols, i per tant són responsables de l'augment de l'activitat oxidàsica. Conseqüentment sinó s'eliminen del most, es descomposen lentament en un ambient fortament reductor creat per la fermentació, originant productes volàtils d'olors desagradables (sobretot derivats dels compostos sulfurats) (Giacomini i col., 1994).

El desfangat que consisteix en obtenir una clarificació del most abans de la fermentació, és una manera d'eliminar aquestes partícules sòlides susceptibles de comunicar mals olors i mals gustos als vins. El desfangat pròpiament dit, es basa en una sedimentació, però també es pot efectuar mitjançant les tècniques de centrifugació, de filtratge i de flotació. Els resultats seran òptims quan aquestes tècniques s'utilitzen integrades junt amb substàncies coadjuvants i clarificants (enzims pectolítics, bentonita, gel de silici + gelatina) (Giacomini i col., 1994).

L'efecte favorable del desfangat sobre la qualitat dels vins es manifesta per la superioritat gustativa dels mostos en els que s'ha practicat aquesta tècnica, sobretot en el seu caràcter aromàtic i en la major estabilitat dels mateixos. No obstant, un desfangat excessiu pot fer disminuir la qualitat del most. S'ha comprovat que també afavoreix l'eliminació del gas carbònic, aireja el most (augmenta la taxa d'oxigen a disposició dels llevats) i cedeix al most certs elements químics que activen el creixement dels llevats (Ribéreau-Gayon i col., 1975).

Tot i amb això, el desfangat actuarà afectant a dos nivells:

-influençant la composició del vi. S'observarà una disminució de la taxa de ferro, una disminució dels compostos fenòlics i de les oxidases responsables de la seva oxidació, donant un vi d'un color groc pà.lid molt estable. D'altra banda la finor i la intensitat dels caràcters aromàtics de vins procedents de mostos desfangats fan suposar una modificació de la cinètica fermentativa dels mateixos. Està confirmat que el desfangat augmenta els nivells de molts esters i disminueix els nivells dels alcohols superiors (Giacomini i col., 1994).

-alentint la velocitat de fermentació a causa de: 1) la davallada de la població de llevats, que dependrà de cada espècie, sembla ser que les més afectades són *Issatchenkia terricola*, *Hansenula anomala* i *Saccharomyces cerevisiae* (Mora i col 1991), i a causa de la pèrdua d'elements nutritius tals com el nitrogen i les vitamines (Agenbach, 1977; Monk, 1982; Monk, 1984; Monk i col., 1984; Busturia i col., 1986; Salmon, 1989; Bely i col., 1990a; Bataillon i col., 1996).

Per restablir una fermentació d'un most desfangat, l'inoculació per una soca de llevats seleccionats amb elevat poder alcoholigen, no sempre és l'única solució, normalment cal també suplementar simultàniament aquest most amb sals d'amoni i amb tiamina que afavoriran el desenvolupament dels llevats a l'inici de la fermentació. En aquestes situacions l'inòcul de llevats millorarà molt les condicions de partida, tot i que la seva acció no es manifesta fins passat un temps de latència, degut a l'adaptació del llevat al medi (Ribéreau-Gayon i col., 1975).

1.4.2. Temperatura

La temperatura a la qual es desenvolupa la fermentació alcohòlica influeix en:

- a- la velocitat de creixement dels llevats i com a conseqüència afectarà la durada de la fermentació.
- b- la contribució de les diferents espècies de llevats en la fermentació.
- c- la bioquímica de les reaccions metabòliques dels llevats, que determinarà la composició química i qualitat sensorial del vi final.

a- velocitat de creixement dels llevats

La velocitat de creixement dels llevats i de la fermentació alcohòlica estan fortament influenciades per la temperatura. Així, la velocitat de consum de sucres augmenta amb la temperatura, mentre que la velocitat de multiplicació cel.lular presenta valors màxims entre 20-25 °C (Amerine i col., 1980; Ough, 1964, 1966 a i b; Ough i col., 1978), si bé les poblacions màximes s'assoleixen a temperatures més baixes (Ribereau-Gayon i col., 1989)

Els vins negres generalment fermenten a temperatures compreses entre 25-30°C per afavorir l'extracció dels compostos fenòlics, mentre que els vins blancs ho fan a temperatures compreses entre 15-20°C, per augmentar la producció i la retenció dels aromes (Killian i col., 1979; Kunkee, 1984). Aquestes tendències en la vinificació en blanc han requerit la selecció i ús de soques seleccionades de *Saccharomyces cerevisiae* amb un bon creixement a baixes temperatures.

Durant la fermentació la temperatura no es manté constant, doncs aquest procés metabòlic genera i lliura calor, els increments oscil·len entre 5-10°C des del principi de la fermentació fins al final (Sablayrolles i col., 1987; Sablayrolles i col., 1989). Per tant, controlar la temperatura amb un equip de fred és particularment important quan hi ha la possibilitat de que durant la fermentació aquesta pugi pel damunt de 30°C, temperatura a la qual la sensibilitat de *Saccharomyces cerevisiae* respecte a l'etanol és força pronunciada i pot provocar una aturada prematura de la fermentació (van Uden, 1989).

b- contribució de les diferents espècies de llevats en la fermentació.

El concepte que la temperatura pot afectar l'ecologia de la fermentació és relativament recent. Tant és així que a partir de diversos estudis (Sharf i col., 1983; Casey i col., 1986; D'Amore i col., 1987; Heard i col., 1988b; Gao i col., 1988) es pot afirmar que a baixes temperatures les espècies amb millor capacitat de creixement són *Kloeckera apiculata* i *Candida stellata* amb poblacions de 10^7 a 10^8 ufc/ml, espècies que també incrementen la seva capacitat de tolerància a l'etanol entre 10 i 15°C, confirmant d'aquesta manera que la tolerància a l'etanol està molt influenciada per la temperatura. Per tant a temperatures pel davall de 20°C hi ha una contribució més important d'aquestes espècies en la fermentació alcohòlica mentre que pel damunt d'aquesta temperatura, aquestes espècies queden afectades i es desenvolupa en bones condicions *Saccharomyces cerevisiae*.

Cabrera i col. (1988), Herraiz i col. (1990) i Mateo i col. (1991), a partir dels seus experiments, afirmen que les quantitats de productes volàtils tals com els alcohols superiors, àcid acètic, esters i acetaldehid poden ser variables en funció de la participació en la fermentació de les espècies que no pertanyen al gènere *Saccharomyces* o bé de *Saccharomyces cerevisiae*.

c- bioquímica de les reaccions metabòliques dels llevats.

La temperatura també afectarà l'activitat metabòlica dels llevats i la producció de metabolits secundaris. Com abans hem dit, les baixes temperatures provocaran un gran desenvolupament de les espècies que no pertanyen al gènere *Saccharomyces* que iniciaran la fermentació, i com a conseqüència hi haurà una menor producció d'etanol. Els sucres

metabolitzats per aquestes espècies no produeixen grans quantitats d'etanol, com en el cas de *Saccharomyces cerevisiae* (Heard i col., 1988b; Mateo i col., 1991).

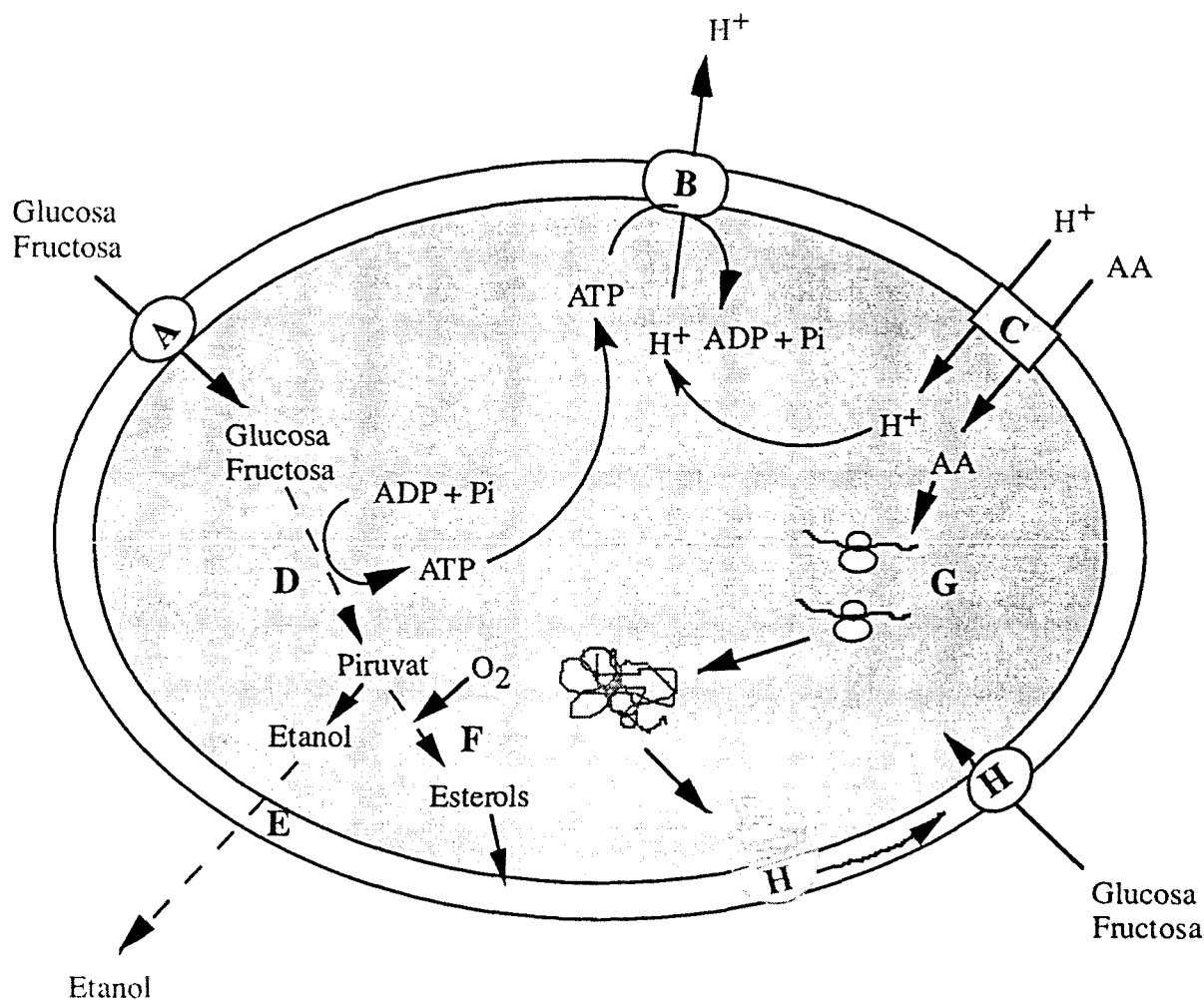
Una temperatura massa elevada comporta l'arrossegament de substàncies volàtils pel gas carbònic produït durant la fermentació, fet que influeix sobre el metabolisme dels llevats (Moreno, 1983; Puisais, 1983).

Quan hi ha un fort increment de la temperatura durant la fase exponencial (de 19°C a 30°C) la fermentació s'atura ràpidament i simultàniament decreix el contingut d'esterols de la membrana plasmàtica, demostrant que hi ha una correlació entre la capacitat fermentativa i el contingut de lípids de la membrana. Per altra part, quan la temperatura passa de 19°C a 12°C, òbviament la fermentació s'alenteix i el canvi en la composició lipídica no presenta variacions significatives, només s'observa una davallada dels triacilglicèrids i de la composició dels esterols esterificats (Rozes i col., 1988).

2. MECANISMES BIOQUÍMIC / CEL·LULARS POSSIBLEMENT IMPLICATS EN ELS ALENTIMENTS I ATURADES DE FERMENTACIÓ

El conjunt de mecanismes metabòlics que podrien estar implicats en els alentiments i aturades de fermentació, els presentem de manera esquemàtica en la Figura 2.1 que acompanyem d'un resum introductorri per tal de centrar aquesta problemàtica. Posteriorment, es desenvoluparan amb detall alguns d'aquests mecanismes implicats, coincidint amb els objectius del nostre treball de recerca.

FIGURA 2.1 Possibles mecanismes metabòlics implicats en els alentiments i aturades de fermentació



on A correspon al transportador de sucres de baixa afinitat, actiu a altes concentracions de sucres; B és la H⁺-ATPasa; C és el transportador d'aminoàcids; D indica el metabolisme energètic; E correspon a l'excreció d'etanol; F indica la síntesi d'esterols; G correspon a la síntesi proteica; H és el transportador de sucres d'alta afinitat, actiu a baixes concentracions de sucres.

La captació de sucres pel llevat és sense dubte el primer procés implicat en la fermentació alcohòlica. Segons Fleet (1994), es tracta del factor principal de regulació de la velocitat de la fermentació i per tant es considera el mecanisme clau. En la captació intervenen dos tipus de transportadors per la captació de glucosa i fructosa, un de baixa afinitat (A), que és actiu a elevades concentracions de sucres, i un d'alta afinitat (H) que és actiu únicament a baixes concentracions de sucres. Obviament al principi de la fermentació, quan els sucres es troben a concentracions elevades, el transportador de baixa afinitat serà el que actuï, i per tant, en els estadis finals actuarà el transportador d'alta afinitat.

Un cop els sucres han entrat a l'interior de la cèl.lula, són metabolitzats donant etanol com a producte majoritari del seu metabolisme, i altres productes secundaris (D). Aquesta font de carboni també és utilitzada pels llevats per sintetitzar els elements necessaris per la multiplicació cel.lular (G i F). Es pot pensar que els problemes de la fermentació també podrien estar relacionats amb el propi mecanisme de la via de la fermentació alcohòlica, sobretot els podríem centrar en l'activitat hexoquinasa, un dels enzims reguladors de la glucòlisi, i en l'alcohol deshidrogenasa, l'enzim encarregat de reduir l'acetaldehid a etanol. Tanmateix l'etanol produït durant la fermentació alcohòlica, ha de ser expulsat a l'exterior de la cèl.lula per evitar la seva acumulació, que seria tòxica pel llevat (E). Aquesta sortida d'etanol per lliure difusió té lloc normalment, però es pot veure dificultada quan la concentració externa d'etanol és molt elevada o bé quan la velocitat de fermentació és molt alta. Per tant, aquesta podria ser la causa de les dificultats de finalització de la fermentació de vins amb un grau alcohòlic molt elevat i també de les aturades i alentiments provocades per un augment de la temperatura. Quan la temperatura puja pel damunt dels 30°C el llevat fermenta molt més de pressa i produeix més etanol del que pot eliminar, i per tant serà la seva acumulació en l'interior de la cèl.lula la que produeixi els problemes de la fermentació.

Per altra part, una anaerobiosi extrema afectarà la síntesi d'ergosterol i àcids grassos insaturats (F), de la mateixa manera que l'exauriment de les reserves d'aquestes substàncies provocarà una aturada de la biosíntesi de membrana, afectant la fluïdesa de la membrana plasmàtica, el control de la proliferació cel.lular i el manteniment de l'activitat fermentativa.

Un altre factor a tenir present és la captació d'amoni i aminoàcids (C), i també la síntesi proteica (G). La captació d'amoni i d'aminoàcids s'utilitza com a font de nitrogen necessària per la multiplicació cel.lular i pel recanvi d'estructures cel.lulars. Si aquesta captació es veu afectada, sens dubte provocarà problemes de fermentació. La captació d'aminoàcids s'alenteix mitjançant un sistema de cotransport amb protons. Aquests protons han de ser posteriorment expulsats per la cèl.lula mitjançant la H⁺-ATPasa de protons (B). Per tant un altre factor a tenir en compte és la funcionalitat de la H⁺-ATPasa de protons, ja que si aquesta quedés afectada, es produiria una acumulació de protons a l'interior de la cèl.lula,

alterant l'homeostasi de la cèl.lula, fet que afectaria la capacitat de la cèl.lula per captar aminoàcids i nutrients en general. Un altre factor que disminueix l'activitat de la H⁺-ATPasa, són les elevades concentracions intracel.lulars d'etanol (Fuguet, 1997)

Al final de la fermentació, quan les concentracions de glucosa i fructosa són relativament baixes, el transportador de baixa afinitat (A) deixa de ser funcional i s'activa el transportador d'alta afinitat (H). Si la captació d'aminoàcids es veu afectada de manera directa o bé mitjançant la H⁺-ATPasa, la cèl.lula no podrà sintetitzar aquest transportador i sorgiran dificultats per consumir tots els sucres.

2.1 METABOLISME GLUCÍDIC

2.1.1. Incorporació de sucres

Un dels aspectes més controvertits del transport de carbohidrats en llevats és la incorporació de monosacàrids en *Saccharomyces cerevisiae*. El transport de sucres sembla ser un lloc clau per al control de la glucòlisi sota condicions d'anaerobiosi (Fleet, 1994). El primer pas de la glucòlisi serà, doncs, el transport de sucres cap a l'interior de la cèl.lula. Pot ser l'únic punt de consens general sigui que *Saccharomyces cerevisiae* té com a mínim dos sistemes de transport de monosacàrids, un de constitutiu per la glucosa, fructosa, manosa i els seus anàlegs i un d'induïble per la galactosa (Eddy, 1982). De totes maneres la principal àrea de discussió és el mecanisme gràcies al qual operen aquests processos, si el transport és només per difusió facilitada (Heredia i col., 1968; Cooper, 1982; Gamo i col., 1995) o bé si a més intervé, un sistema actiu de translocació de grups que inclou la fosforilació (van Steveninck, 1969; Lobo i col., 1977; Bisson i col., 1983b; Walsh y col. 1994).

La sacarosa, que normalment es troba en el most en concentracions traça, en mostos xaptalitzats, la podem trobar en elevades quantitats. Aquest disacàrid s'hidrolitza a l'exterior de la cèl.lula gràcies a l'acció d'una invertasa donant lloc a glucosa i fructosa que són els sucres majoritaris del most. Aquests monosacàrids seran transportats cap a l'interior mitjançant un procés de difusió facilitada, és a dir, un transport a favor de gradient de concentració que no requereix despesa energètica, de manera que aquests sucres compartiran el mateix transportador (Cooper, 1982). Una altra proposta alternativa la va fer van Steveninck (1969), el qual va ser capaç de demostrar l'existència d'un transport ràpid i actiu de glucosa amb acumulació de la mateixa en forma de derivat fosforilat. El poc èxit obtingut per Meredith i Romano (1977) al buscar un sistema extracel.lular de fosforilació, l'estreta correlació existent entre l'afinitat de les hexoses com substrat per l'hexoquinasa i la gran afinitat d'aquestes pel transport, els va fer suggerir la participació de l'hexoquinasa en aquest sistema d'incorporació de glucosa. Altres estudis van posar en evidència que les

fosfotransferases que tenia *Saccharomyces cerevisiae*, eren els enzims de la glucòlisi que catalitzaven la fosforilació de la glucosa en la posició sis: l'hexoquinasa PI, l'hexoquinasa PII y la glucoquinasa (Lobo i col., 1977). Però Franzusoff i col. (1982) fent servir soques doble quinasa muntants, van demostrar que el transport associat a la fosforilació de la 2-desoxi-D-glucosa descrita per Meredith i col. (1977), no era específic per les quinases. I no va ser fins els treballs de Bisson i col. (1983a) quan es va poder relacionar d'una manera definitiva la fosforilació amb el transport, treballant amb soques salvatges, doble mutants per les quinases i triple mutants, és a dir aquestes darreres, sense activitat quinasa.

Les anàlisis cinètiques van demostrar que el transport de sucres en soques salvatges de *Saccharomyces* era bastant complexe, hom suposava que incloïa diversos transportadors (Krukeberg i col., 1990). Es creia que, com mínim, existien dos tipus de captació, una que tenia una Km baixa (1-2 mM per la glucosa; 5-7 mM per la fructosa) amb una gran afinitat pels sucres, i una altra que tenia una baixa afinitat i per tant una Km alta amb valors deu vegades superiors als anteriors (10-20 mM per la glucosa; 50-70 per la fructosa) (Serrano i col., 1974; Bisson i col., 1983a; Busturia i col., 1986; Gonçalves i col. 1994; Özcan y col. 1994; Walsh y col. 1994). Busturia i col. (1986) confirmen l'existència d'aquests dos sistemes de transport en soques salvatges de *Saccharomyces cerevisiae*, amb unes Km amb valors de 1,5 mM i 35 mM pels transportadors d'alta i baixa afinitat respectivament.

A partir de tot això, s'arriba a la conclusió que soques salvatges de *Saccharomyces cerevisiae* tenen dos mecanismes pel transport de glucosa, un per difusió facilitada relacionat amb el transportador de baixa afinitat, i un altre pel transportador d'alta afinitat relacionat amb un sistema de transport dependent de les quinases (Bisson i col., 1983a). Mutants defectius en l'activitat hexoquinasa, és a dir triple muntats, i per tant, incapaces de fosforilar sucres, només tenen activat el sistema de baixa afinitat (Km alta) (Bisson i col., 1983a; Lang i col., 1987) i no disposen del sistema de baixa Km (alta afinitat) per cap sucre. Mutants defectius en les hexoquinases PI i PII (doble mutants) perden la seva baixa Km per la captació de fructosa, però la mantenen per la glucosa. Aquestes diferències entre els paràmetres cinètics pel transport de sucres i la fosforilació, poden explicar el perquè, en la majoria de les fermentacions, la glucosa es metabolitza abans que la fructosa, podent provocar aquest fet una devallada de l'activitat de la fermentació alcohòlica (Schütz i col., 1995)

En les investigacions del transport de glucosa a partir de vesícules procedents d'espècies salvatges i de triple mutants per les quinases, es va trobar que la Km per la captació de glucosa a partir de cèl.lules salvatges era idèntica a la dels mutants (aproximadament 1 mM). A partir d'aquestes observacions s'arriba a la conclusió que l'efecte de l'activitat hexoquinasa *in vivo* era un artefacte. Evidentment aquesta conclusió era el resultat de suposar que el transport de sucres tenia un model de cinètica simple (Fuhrmann i col., 1989). No

obstant la clau va ser proposar que el paper de les quinases en el transport no era altre que el de la fosforilació de les hexoses que havien estat transportades, aquesta proposta derivava dels estudis realitzats amb un anàleg no fosforilable de la glucosa, la 6-desoxiglucosa (Bisson i col., 1983b). En aquests estudis, en les cèl.lules salvatges la captació de la 6-desoxiglucosa era bifàsica (Serrano i col., 1974), observant-se els sistemes d'alta i de baixa K_m , mentre que en les cèl.lules triple quinasa mutants només s'observava un sistema simple d'alta K_m .

Serrano i col. (1974) van demostrar que l'afinitat del transportador de la glucosa pel seu substrat, estava influenciada per l'estat metabòlic cel.lular. El valor de la K_m del sistema de transport era alta sota condicions aeròbiques i més baixa sota condicions anaeròbiques. Aquest autors van suggerir que una alteració metabòlica en l'esmentat transportador seria d'una gran importància en la regulació cel.lular, particularment en l'anomenat efecte Pasteur que només s'observa en *Saccharomyces cerevisiae* si la síntesi proteica està reprimida degut a una carència de la font de nitrogen (amoni), i que és responsable del dràstic decreixement de la fermentació (Busturia i col., 1986; Salmon, 1989; Slaughter i col., 1991). Els metabolits de la glucòlisi estan implicats com inhibidors "feed-back" del transportador de la glucosa (Becker i col., 1972). Lagunas i col. (1982) posen de manifest una relació causa-efecte entre la inactivació del transport de monosacàrids i l'increment de l'anaerobiosi induïda pel catabolisme de la glucosa.

Estudis de la cinètica de captació de la glucosa en *Saccharomyces* sota diferents condicions de creixement ens demostren que el sistema de K_m alta (baixa afinitat) és constitutiu durant la fase de creixement cel.lular, decreixent durant la fase estacionària, mentre que el sistema de baixa K_m (alta afinitat) està reprimat per l'elevada concentració de sucres en el medi (Bisson i col., 1984; Bisson, 1988). La importància de la regulació del transport de glucosa va ser àmpliament estudiada per Bisson i col. (1984). En les seves investigacions van veure que el component d'alta afinitat del transportador de la glucosa, prèviament identificat per aquests mateixos autors, i que estava reprimat per les elevades concentracions de glucosa, es desreprimia ràpidament quan la concentració de glucosa en el medi era inferior a 5 mM. Aquest procés semblava dependre del metabolisme energètic i de la síntesi proteica, però no es va relacionar amb l'increment de les quinases de la glucòlisi.

La cinètica de captació de monosacàrids també està influenciada per la combinació de tres factors (Panchal i col., 1982): (1) de la configuració mol.lecular dels sucres en solucions aquoses (most), (2) de la fosforilació diferencial de la glucosa i de la fructosa i (3) de l'acumulació intracel.lular d'etanol (Salmon i col., 1993).

Darrerament han aparegut treballs plantejant la hipòtesis de l'existència d'un possible transport de les hexoses per lliure difusió per al transportador de baixa afinitat (Walsh i col. 1994; Weusthuis i col. 1994). Gamo i col. (1995), han investigat aquesta possibilitat utilitzant la mesura del coeficient de permeabilitat dels sucres en *Saccharomyces cerevisiae*. Aquests autors han observat que l'esmentat coeficient és com a mínim dues o tres vegades més petit que el que es requereix per justificar el transport de glucosa per al component de baixa afinitat, desestimant d'aquesta manera l'hipòtesi.

També s'ha qüestionat que el transport d'alta afinitat estigui relacionat amb la presència dels enzims que fosforilen les hexoses, per dos motius: (1) perquè els anàlegs estructurals emprats no tinguin el mateix comportament que la glucosa, aquest és el cas de la 6-desoxiglucosa utilitzada per Bisson i col. (1983b) en els seus experiments per demostrar el transport associat a la fosforilació, que s'ha vist que no és reconeguda pels sistemes de transport de la mateixa manera que la glucosa. Mentre la 6-desoxiglucosa és transportada pel sistema constitutiu i pel sistema galactosa-induïble, la glucosa només ho fa pel sistema constitutiu. (2) perquè l'absència del metabolisme dels sucres en els llevats quinasa-mutants, pot influenciar les característiques de la captació de sucres. Nevado i col. (1994) a partir dels seus experiments utilitzant soques salvatges i anàlegs naturals, afirmen que el transport d'hexoses pel transportador d'alta afinitat, no inclou necessàriament la fosforilació del substrat. Resultat que també ha estat confirmat per Smits i col., (1996).

Es va identificar el gen SNF3 que codificava el transportador de glucosa, a partir d'un grup de mutants deficients en l'utilització de sacarosa (Bisson i col., 1987; Neigeborn i col., 1984). La proteïna d'aquest gen té una extensa homologia estructural amb les proteïnes transportadores de glucosa en mamífers (Celenza, 1988). Posteriorment, s'han continuat identificant un gran nombre de gens, fins formar el grup de gens coneguts com la família HXL dels transportadors de les hexoses (Reifenberger i col., 1995; André, 1995). S'han seqüenciat fins a 16 gens que pertanyen a aquesta família. El primer dels quals va ser el gen GAL2 (Tschopp i col., 1986; Nehlin i col., 1989) que codifica el transportador induïble per la galactosa, encara que estudis recents suggereixen que Gal2p també pot intervenir en el transport de la glucosa. Els gens HXT1 (Lewis i col., 1991) i HXT3 (Ko i col., 1993) codifiquen el transportador de baixa afinitat, el primer s'indueix a elevades concentracions de glucosa i la seva anàlisi va demostrar l'existència d'una gran homologia entre aquest i el transportador de glucosa en mamífers, el segon també s'indueix en presència de glucosa, però és independent de la concentració de sucres del medi. Els gens HXT2 (Kruckenberg i col., 1990), HXT6 (Reifenberger i Ciriacy, 1995; Reifenberger i col., 1995) i HXT7 (Reifenberger i col., 1995; Reifenberger i Ciriacy, 1995) codifiquen el transportador d'alta afinitat, essent el primer induït a baixes concentracions de glucosa i reprimat a elevades concentracions de la mateixa. És curiosament destacable el gen HXT4 (Theodoris i col., 1994), que codifica per un

transportador moderadament de baixa afinitat i que s'indueix a elevades concentracions de glucosa. La resta de gens fins al HXT15 recentment seqüenciat per Bargues i col. (1996), codifiquen proteïnes amb funció desconeguda però que presenten una gran similitud amb els transportadors HXT (André, 1995). També s'ha demostrat que l'expressió d'alguns d'aquest gens està regulada (Wendell i col., 1993; Özcan i col., 1994; Özcan i col., 1995).

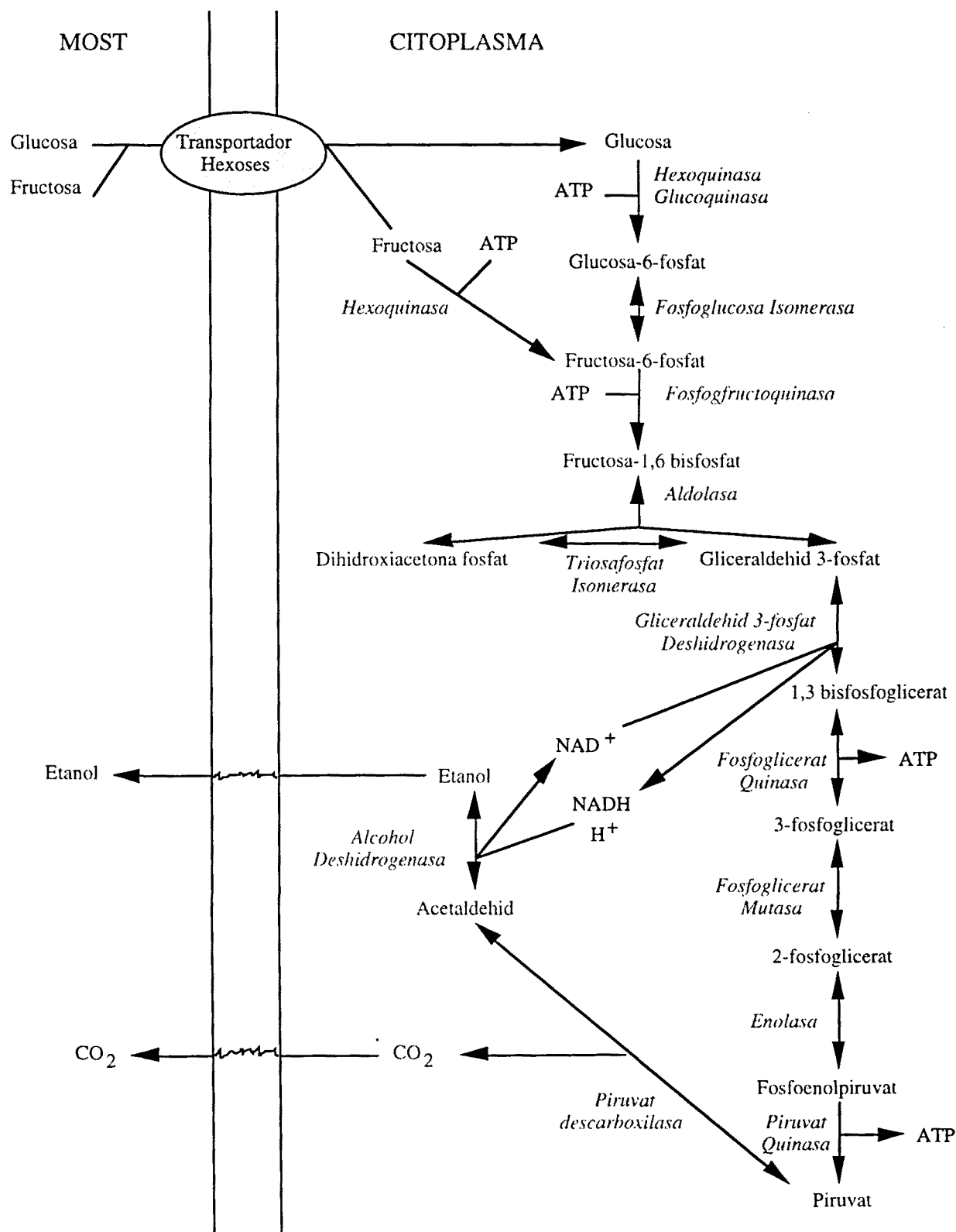
2.1.2. Catabolisme glucídic

La glucosa i la fructosa un cop han entrat en la cèl.lula, són convertides en piruvat gràcies a la via de la glucòlisi (Figura 2.2), el primer pas de la qual consisteix en la fosforilació d'aquests sucres. Per tant, la primera reacció citoplasmàtica serà la fosforilació de la glucosa i de la fructosa donant glucosa-6-fosfat, en *Saccharomyces*, catalitzada per l'hexoquinasa PI, per l'hexoquinasa PII i per la glucoquinasa, utilitzant com a donador de fosfat, ATP. L'hexoquinasa PII sembla ser constitutiva i és l'isoenzim majoritàriament expressat durant la fermentació a elevades concentracions de sucres. La relació de fosforilació de la glucosa respecte a la fructosa està al voltant de la unitat (Colowick, 1973). L'expressió de l'hexoquinasa PI està regulada per la glucosa de tal manera que aquest isoenzim no s'expressa fins que no s'ha exhaurit la glucosa del medi (Kopperschlager i col., 1969; Gancedo i col., 1977; Muratsubaki i col., 1979). L'expressió de l'isoenzim glucoquinasa no ha estat gaire estudiat en aquestes condicions.

El següent pas de la via és la conversió de la glucosa-6-fosfat a fructosa-6-fosfat, catalitzada per l'enzim fosfoglucosa isomerasa. Soques de *Saccharomyces* mutants per l'activitat d'aquest enzim van ser aïllades, i es va veure que no eren capaces de créixer en presència de glucosa, al contrari del que passava en altres llevats (Caubet i col., 1988). Aquest fet demostrava que la glucòlisi era l'única via pel catabolisme de la glucosa en aquests llevats. Per tant, la via de les pentoses fosfat, que en altres organismes podia servir com una ruta alternativa pel catabolisme de la glucosa, sembla estar relacionada només, amb la producció de pentoses fosfat com a precursors dels àcids nucleics i en la regeneració del cofactor NADPH, el qual és utilitzat per una gran quantitat de reaccions anabòliques en *Saccharomyces* (Bruinenberg i col., 1986).

La fructosa-6-fosfat sofreix una segona fosforilació donant fructosa-1,6-bisfosfat, catalitzada per la fosfofructoquinasa. Un cop més, l'ATP s'utilitza com a donador de fosfat en aquesta reacció. La fosfofructoquinasa és un enzim alostèric i irreversible (el segon d'aquesta via), la seva activitat està modulada per AMP, ADP, ATP, P_i, fructosa-6-fosfat, fructosa-1,6-bifosfat, fructosa-2,6-bifosfat i molts altres metabolits (Sols, 1981). Per tot això, es considera aquest com un punt clau per la regulació del fluxe metabòlic.

FIGURA 2.2 La glucòlisi i la fermentació alcohòlica



El següent enzim, l'aldolasa, catalitza la hidròlisi de la fructosa-1,6-bisfosfat en fosfat de dihidroxiacetona i/o gliceraldehid-3-fosfat. El gliceraldehid-3-fosfat és la molècula a partir de la qual segueix la via cap a la formació de piruvat. L'enzim triosa fosfat isomerasa interconverteix la dihidroxiacetona fosfat i el gliceraldehid-3-fosfat. La gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, la fosfoglicerat quinasa, la fosfoglicerat mutasa i l'enolasa catalitzen reaccions reversibles comuns tant en la glucòlisi com en la gluconeogènesi. Els gens estructurals d'aquests enzims comparteixen com a mínim un element de control transcripcional, codificat pel gen GCR1 (Clifton i col., 1981). Mutacions en aquests gens afecten al creixement en presència de glucosa (Fraenkel, 1986).

El darrer pas irreversible de la glucòlisi és el catalitzat per la piruvat quinasa, també sota control d'efectors al·lostèrics (Rhodes i col., 1986). Aquest enzim també està relacionat amb el control global de la via glucolítica (Den Hollander i col., 1986a; 1986b)

La fermentació genera poder reductor en forma de NADH, el qual és reoxidat a NAD⁺. En llevats i sota condicions anaeròbiques aquest fet té lloc gràcies a dues reaccions, descarboxilació del piruvat per la piruvat descarboxilasa donant acetaldehid, i reducció de l'acetaldehid a etanol per la alcohol deshidrogenasa que requereix Zn. La piruvat descarboxilasa té dos isoenzims, un majoritari (PDC1) i un minoritari (PDC5) (Hohmann i col., 1990; Seeboth i col., 1990), i l'alcohol deshidrogenasa té quatre isoenzims: la ADHI, la ADHII, la ADHIII i la ADHIV (Lutsdorf i col., 1968; Ciriacy, 1975; Paquin i col., 1986; Walton i col., 1986). La ADHI és un isoenzim constitutiu citoplasmàtic, present en la fermentació alcohòlica i responsable de la conversió de l'acetaldehid en etanol. La seva activitat depèn de la fase de creixement del llevat, de la temperatura de fermentació i de la soca de llevat en qüestió (Kunkee, 1990). La ADHII i la ADHIII són reprimides per la glucosa, és a dir no es poden expressar durant el creixement fermentatiu en presència d'elevades concentracions de glucosa, però en canvi s'expressen durant el creixement aeròbic en presència d'etanol com a font de carboni i energia. La ADHII és citoplasmàtica mentre que la ADHIII és mitocondrial. La ADHII pot compensar la pèrdua d'activitat de la ADHI a concentracions de sucres molt baixes, mentre que ADHIII no ho pot fer (Blumberg i col., 1987). La ADHIV que funciona a una activitat molt baixa, i poseeix una funció metabòlica desconeguda, té una estructura diferent i també una especificitat pel substrat diferent dels altres tres isoenzims (Drewke i col., 1988).

2.2. METABOLISME NITROGENAT

Les formes majoritàries dels compostos nitrogenats que trobem en el most són: la prolina, l'arginina, el glutamat, la glutamina, la serina i la treonina (Bisson, 1991). Els nivells d'amoni també són elevats, depenent de la varietat de *Vitis vinifera* i del temps de verema. De

tots els aminoàcids, la prolina i l'arginina són els més abundants, els elevats nivells de prolina sembla ser que estan associats amb l'estat d'estrés de la planta, i particularment amb una humitat ambiental baixa (Sponholz, 1991). Un altre compost present en altes concentracions és el γ -aminobutirat (Boulton i col., 1996). Aquests compostos poden ser utilitzats de tres maneres: 1) utilitzats directament per la biosíntesi, 2) convertits en compostos derivats i utilitzats en biosíntesi i 3) degradats lliurant nitrogen tant en forma d'ió amoni com en forma de nitrogen lligat a les reaccions de transaminació.

2.2.1. Captació i transport

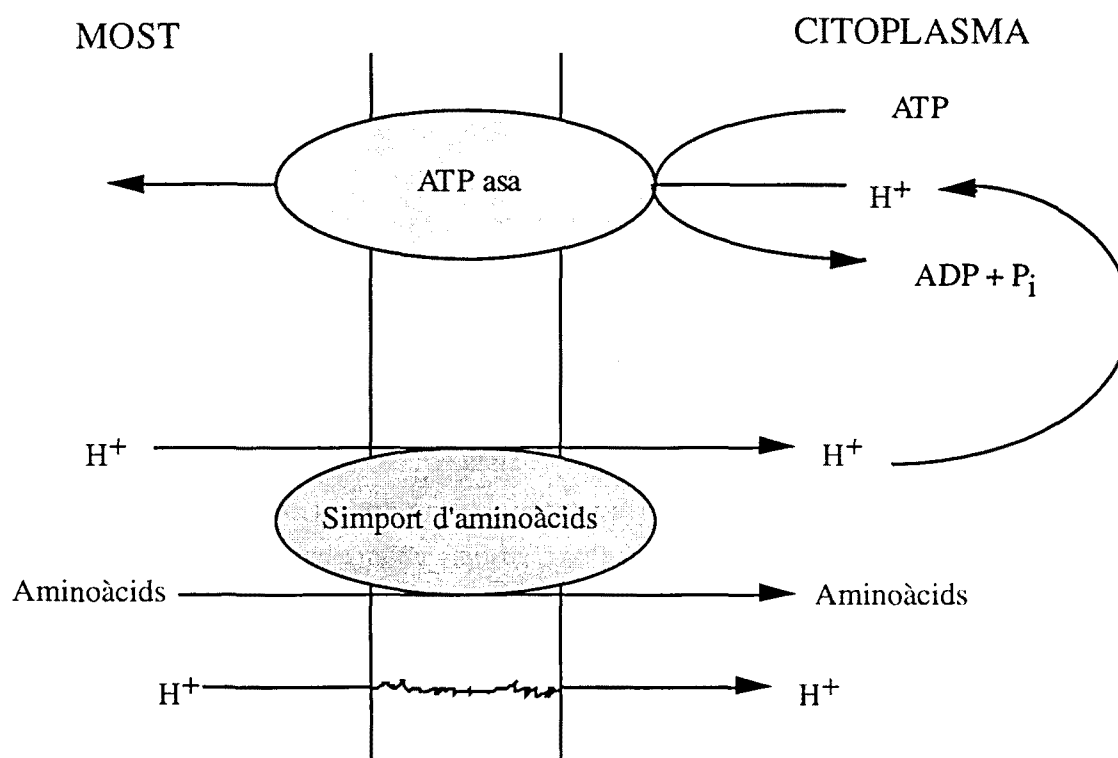
Normalment els mostos presenten un contingut en compostos nitrogenats baix per les necessitats metabòliques dels llevats. Aquests compostos són captats ràpidament durant la formació dels dos primers graus alcohòlics o bé abans de que comenci el creixement de la població de llevats. Prèviament a la degradació dels compostos nitrogenats s'omplen les reserves d'aminoàcids. Un cop ha començat el creixement, els compostos nitrogenats es capten i es degraden en un específic ordre de preferències segons: 1) la necessitat que un compost sigui captat per biosíntesi respecte a la seva concentració inicial i 2) la preferència d'aquest compost un cop les reserves cel.lulars estan plenes (Boulton i col., 1996).

L'ió amoni, el glutamat i la glutamina seran els primers compostos nitrogenats que es degradaran. El proper grup de compostos nitrogenats degradats segons l'específic ordre de preferències metabòliques inclou l'alanina, la serina, la treonina, l'aspartat, l'asparragina, l'urea i l'arginina. El següent grup el forma la prolina, que es una bona font de nitrogen en condicions d'anaerobiosi. Finalment la glicina, la lisina, la histidina i les pirimidines (timina i timidina) no podran ser utilitzades per la majoria de soques de *Saccharomyces* com a font de nitrogen. Aquest ordre de preferències pot canviar en funció de la composició del medi, de la fisiologia del llevat i dels factors genètics específics de cada soca de llevats (Bisson, 1991).

De totes maneres el pas clau pel control de l'utilització de cada metabolit és el transport de compostos nitrogenats dins la cèl.lula. La majoria dels compostos nitrogenats són transportats a l'interior de la cèl.lula per transport actiu, una excepció interessant pot ser el cas de l'urea que es transporta per difusió facilitada (Cooper i col., 1975; Cooper, 1982). En *Saccharomyces* s'han descrit nombrosos sistemes de transport d'aminoàcids, alguns específics per un sol substrat i d'altres que poden transportar diferents aminoàcids amb similituds moleculars (Cooper i col., 1982; Horak, 1986), però la majoria d'aquests sistemes de transport es realitzen per simport, una estratègia excel.lent tenint present que hi ha una diferència entre el pH del most i el pH intracel.lular, de tres unitats aproximadament (Figura 2.3). Els protons que entren en la cèl.lula de llevat per simport són excretats per prevenir l'acidificació citoplasmàtica i la mort cel.lular, per una H^+ -ATPasa de la membrana plasmàtica. Així doncs,

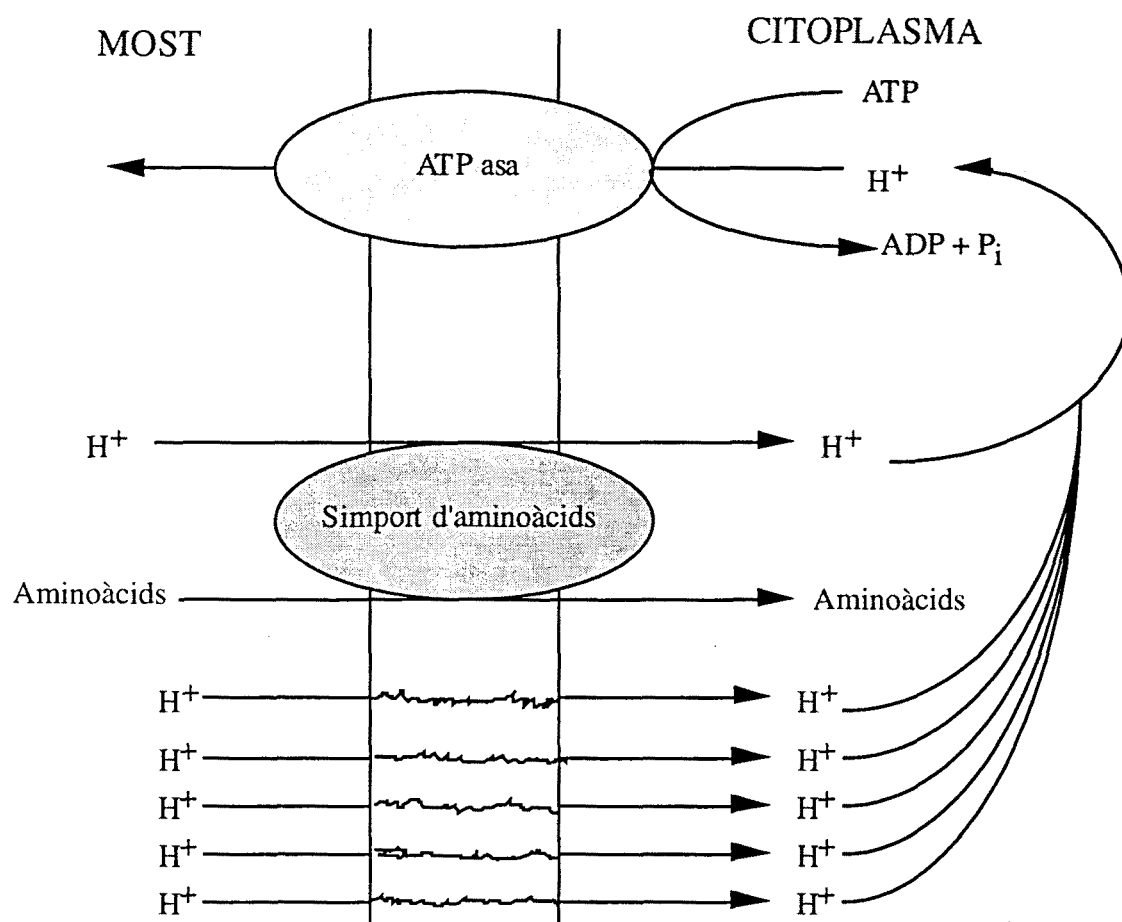
ions hidrogen o protons (H^+), s'extreuen de la cèl.lula mitjançant la hidròlisi de les molècules d'ATP (Serrano, 1978), consumint energia. Aquesta capacitat d'excretar protons serà un factor important en la regulació del transport d'aminoàcids (Roon i col., 1975, 1977a, 1977b). Mutacions en l'activitat de la H^+ -ATPasa de membrana, fan que baixi la permeabilitat dels aminoàcids i de l'ió amoni (McCusker i col., 1987; Vallejo i col. 1989) deixant a la cèl.lula molt més sensible davant els canvis de pH.

FIGURA 2.3 Transport actiu: simport



El transport d'aminoàcids és fortament inhibit per l'etanol (Ferrerias i col., 1989; Leão i col., 1984a) (Figura 2.4). Aquest incrementa l'entrada de protons per transport passiu dins la cèl.lula (Leão i col., 1984b; Cartwright i col. 1986), fent que es trobin a elevades concentracions i només se'n pugui extreure un, via ATPasa de membrana, acidificant de manera considerable el citoplasma. L'estratègia dels llevats és transportar els aminoàcids en els estadis inicials de la fermentació i emmagatzemar-los en la vacuola per les necessitats biosintètiques que puguin presentar-se posteriorment, abans de que apareixin quantitats significatives d'etanol en el medi (Boulton i col., 1996). Aquesta manera d'actuar també explica el perquè les addicions de nitrogen durant els alentiments o aturades de fermentació poden no tenir efecte.

FIGURA 2.4 Efecte de l'etanol sobre el transport passiu de protons



3. ELS RESIDUS DELS PRODUCTES FITOSANITARIS

La conseqüència directa dels diversos tractaments amb productes fitosanitaris durant el període vegetatiu de la vinya, i especialment entre el verolat i la maduració, és l'aparició de residus de plaguicides en el most, podent-se trobar en major o menor concentració depenent de diferents factors, com: el producte utilitzat, la formulació i dosi del tractament, el temps transcorregut entre l'aplicació i la verema, el termini de seguretat del producte emprat i els factors climatològics (insolació, pluviometria, etc.).

Els efectes d'aquests productes utilitzats en viticultura sobre la vinificació i la qualitat del vi són de dos tipus:

a. Influència dels residus sobre les poblacions de llevats, els fenòmens fermentatius, la composició i la qualitat òrgano-lèptica del vi.

b. Efectes sobre la qualitat higiènica del vi en relació amb la seva toxicitat a llarg termini. Les quantitats de residus eventualment presents en el producte que arriba al consumidor han de ser inferiors a les toleràncies establertes per la legislació.

En la Taula 3.1 mostrem la presència en raïm i en vi dels residus de pesticides més habituals descrits en la bibliografia (Cabras i col., 1987; Declerq, 1988; Brun, 1990), així com també la toxicitat que d'ells se'n deriva en relació a la salut humana.

TAULA 3.1 Quadre resum dels residus dels productes fitosanitaris més comuns en el raïm, en el vi i la seva toxicitat

Productes fitosanitaris	Dosi d'utilització gm.a./Ha	Residus en el raïm (mg/Kg)	Residus en el vi (mg/l)	Toxicitat
<u>Insecticides i Acaricides</u>				
Deltametrina	7,5 o 17,5	<0,05	no	nociva
Metomil	375- 500	? (LMR ^a =1)	?	^b T ₊
Organofosforats				T a T ₊ o nociu
Fenitotrión	100-150 ml/hl	<LMR	?	nociva
Metilparation	50-100 ml/hl	LMR=0,2	?	nociva
Altres				
Dicofol	50 g/hl	LMR=2	no	baixa o nociva
Propargite	dosi màxima	1er dia : <LMR (=5) 21 dia: 2 a 3	?	no

^aLMR: Límit màxim de residus descrit en la legislació.

^bToxicitat: no, baixa, nociu, (T) tòxic i (T+) molt tòxic.

Productes fitosanitaris	Dosi d'utilització gm.a./Ha	Residus en el raïm (mg/Kg)	Residus en el vi (mg/l)	Toxicitat
Fongicides				
Ditiocarbamats				
Maneb	250 g/hl	>LMR(=1) ~5 mg/Kg	no ?	baixa o nociva
Zineb	250 g/hl	~5 mg/Kg	?	baixa
Mancoceb	200-400 g/hl	sovint <1	?	baixa
Amines-Amides				
Cymoxanil	25-30 g/hl	LMR=1	?	no
Metalaxil	200 g/hl	LMR=0,5	risc (LMR=0,02 ?)	no
Ftalimides				
Captà	175 g/hl (LMR=3)	1 mostra sobre 250 (0,15)	no (LMR=0,05)	nociva
Folpet	150 g/hl LMR=4 a 8	6 mostres sobre 250 (0,01 a 3)	no (LMR=0,05)	nociva
Captafol	120 g/hl	5 mostres sobre 80 (0,03 a 0,6) (LMR=0,05)	no (LMR=0,05)	retirat de la venda
Dicarboximides				
Procimidona	750	bibliografia: 0,1 a 4 en 221 mostres: 0,9% mitjana: 0,1 màxim: 0,25 (LMR=5)	2 vins sobre 61 (0,1)	baixa o nociva
Iprodiona	750	bibliografia: 0,7 a 8 en 221 mostres: 5,4% mitjana: 0,9 màxim: 1,6 (LMR=10)	sobre 61 vins: absència bibliografia: 0,8 a 1,45	baixa
Vinclozolina	1000	bibliografia: 0,2 a 6,6 en 221 mostres: 4% mitjana: 0,1 màxim: 0,5 (LMR=10)	sobre 61 vins: absència	Retirat recentment per la casa Basf
Benzimidazols i tiofanats				
Benomil Carbenzamida	50 g/hl 50 g/hl	14 mostres sobre 23: 0,1 a 3,3 mitjana: 0,6	25 mostres sobre 43: 0,2 a 1,8 mitjana: 0,55	impureses mutàgenes
Sulfamides				
Diclofluanida	1500-2500	bibliografia: 5 en 233 mostres: 6,4% (0,02 a 0,7) mitjana: 0,3 (LMR=10)	no LMR= 0,5	baixa
Inorgànics				
Coure	150-400 ml/hl	LMR= 20	no	nociu
Triazols				
Triadimefon Triadimenol	75	0,25 a 1,4 (LMR=1) més enllà de 30 dies abans de la verema : 0,01 a 0,02	no no	baixa baixa

^aLMR: Límit màxim de residus descrit en la legislació.

^bToxicitat: no, baixa, nociu, (T) tòxic i (T+) molt tòxic.

3.1 FACTORS QUE AFAVOREIXEN LA PRESÈNCIA DE RESIDUS DE PRODUCTES FITOSANITARIS EN EL RAÏM I EN EL MOST

Un residu de pesticida és una substància química present en un producte alimentari com a conseqüència de la utilització d'un pesticida. La presència de residus en el most i en el vi és funció de nombrosos paràmetres (Bazan, 1989; Girond i col., 1989):

- la naturalesa de la matèria activa
- les condicions d'aplicació:
 - *dosi d'utilització
 - *nombre de tractaments
 - *mètode d'aplicació
- els períodes de seguretat (temps mínim transcorregut entre el darrer tractament i la verema)
- entorn bioclimàtic:
 - *les molècules més volàtils són ràpidament dispersades en l'aire
 - *les molècules hidrosolubles són més o menys rentades i difoses en l'entorn pel vent i la pluja
 - *les molècules liposolubles són fixades en les fulles i en les baies
 - *les molècules poden ser transformades pels microorganismes de les baies, l'oxigen de l'aire, les radiacions UVA (ultravioleta), donant residus estables
 - *l'absència de pluja entre el darrer tractament i la verema, afavoreix la presència de residus en el most
- influència de la fórmula del producte i la seva tipicitat (producte de contacte, producte sistèmic)
- el tipus de vinificació i les condicions fermentatives:
 - *en blanc: amb o sense desfangat
 - *en negre: amb maceració
 - *la temperatura de fermentació
 - *la clarificació, la filtració. Certs productes són totalment degradats durant la vinificació (Flori i col., 1990), per exemple la diclofluanida i el folpet.

3.2. LEGISLACIÓ

Des de 1994 formem part de la Unió Europea amb un Mercat Únic ampliat a 15 països en 1995. L'aplicació de les normes dictades per a la consecució d'aquest mercat únic ha tingut (i seguirà tinguent en el futur conforme es vagin desenvolupant) notables repercussions en el terreny fitosanitari. Dels quatre tipus d'actes jurídics que pot adoptar la Unió Europea: Reglaments, Directives, Decisions i Recomanacions, en el terreny fitosanitari predominen

notablement les Directives. Les Directives obliguen als Estats Membres en quant a l'objectiu i resultats, però li permeten reglamentar sobre els mitjans per assolir-los. Per això ha de traspasar-los a la seva legislació de la manera que estimi convenient, encara que normalment es fixa una data límit d'aplicació. Tambè amb incidència en el camp fitosanitari s'han promulgat alguns Reglaments (contenen normes generals i obligatòries sobre tot el territori de la Unió), Decisions (fòrmules per realitzar funcions etjecutives) i Recomanacions (no tenen obligació jurídica, però propicien el clima per certes mesures).

La normativa fitosanitària de la Unió Europea persegueix bàsicament els següents objectius:

1. Protegir contra la introducció en els Estats membres, d'organismes nocius per als vegetals i productes vegetals.
2. Evitar la difusió de certs organismes nocius que ja estan presents dins del territori de la Unió, convertida en un espai sense fronteres interiors, però protegint les zones que no es trobin afectades per organismes nocius específics.
3. Eliminar tots els obstacles innecessaris al lliure comerç i circulació dins de la Unió, tant vegetals i productes vegetals, com de productes fitosanitaris.
4. Evitar riscos per la salut humana, animal o del medi ambient derivats de l'ús de plaguicides, per l'altra part necessaris per protegir els vegetals i productes vegetals de plagues i malalties.
5. Harrmonitzar les normatives dels diversos Estats en aquestes matèries, que en ocasions, són molt divergents. Especialment es tracta de racionalitzar la lluita química (mesures relatives a l'homologació de plaguicides, a la prohibició de determinades matèries actives, a la fabricació i comercialització de plaguicides, etc.)
6. Fomentar la agricultura ecològica o en tot cas afavorir mètodes de producció que limitin la utilització de productes fitosanitaris.

Per aconseguir aquests objectius la Unió Europea ha adoptat una sèrie de normes molt nombroses i variades, de les quals seleccionem les més destacades.

a. Mesures per racionalitzar el comerç i l'utilització de productes fitosanitaris

La disposició bàsica al respecte és la Directiva 91/414/CEE del Consell relativa a la comercialització de productes fitosanitaris. Ha estat traslladada a la legislació espanyola pel Reial Decret 2163/1994 del 4 de novembre, per al que s'implanta el sistema harmonitzat comunitari d'autorització per comercialitzar i utilitzar productes fitosanitaris (BOE 18-11-1994). Fins a l'entrada en vigor d'aquesta Directiva, l'homologació i registre dels productes fitosanitaris es realitzava independentment en cada Estat membre, existint diferències, més o menys notables, en les dades sol.licitades al fabricant, en la metodologia d'homologació i en la interpretació de les dades. Això ocasionava un increment de treballs, de costos i les decisions no sempre estaven en concordància. Amb aquesta directiva es pretén harmonitzar

els procediments, eliminant els anteriors inconvenients i facilitant l'intercanvi de productes fitosanitaris, és a dir, s'eliminen les barreres del comerç, i, a la vegada, es persegueix una major protecció per a l'home i el medi ambient. A més també es reduiran els assaigs (a l'evitar repeticions innecessàries) i com a conseqüència els costos, i es disposarà d'una base de dades de major qualitat.

b. Normativa sobre residus de plaguicides

La Directiva 90/642/CEE ha vingut a harmonitzar, en l'àrea de la sanitat vegetal, les legislacions nacionals del Estats membres en matèria de residus de plaguicides per la majoria dels productes vegetals, això representa l'eliminació d'un important obstacle tècnic per a la consecució del Mercat Interior Únic a mesura que el Consell vagi fixant els continguts màxims de residus per cada combinació producte vegetal-pesticida. Aquesta harmonització establerta inclou dues línies fonamentals: la primera és la fixació dels límits màxims de residus comunitaris per cada plaguicida en els diferents productes o grups de productes vegetals, i la segona és l'establiment d'un sistema de vigilància dels continguts de residus de pesticida en els productes vegetals que es posin en circulació en el mercat comunitari, tant si són de producció interior com importats de tercers països, pel que responsabilitza a cada Estat membre d'executar programes d'inspecció, realitzats per mostreig, per impedir que es posin en circulació en el seu territori aquells productes vegetals amb residus de pesticida que sobrepassin els continguts màxims fixats.

TAULA 3.2 LMR (límits màxims de residus) dels pesticides més comuns

	LMR mg/Kg	Productes fitosanitaris	LMR mg/Kg
Benalaxil	0,5	Folpet	3
Benomil	5	Glifosat	0,1
Captafol	0,02	Iprodiona	10
Captà	3	Mancoceb	2
Carbaril	3	Maneb	2
Carbenzamida	5	Metalaxil	0,5
Clorpirifos	0,5	Metiram	2
Clozolinat	3	Metil-paration	0,2
Coure	20	Procimidona	5
Deltametrin	0,1	Tiodicarb	0,5
Diclofluanida	10	Tiram	3,8
Dicofol	2	Triadimefon	1
Dieldrin	0,01	Triadimenol	1
Dinocab	0,1	Vinclozolina	5
Fenitotrión	0,5	Zineb	2

El Reial Decret del 18 de febrer de 1994, nº 280/1994 en el que s'estableixen els límits màxims i el control dels residus de plaguicides, transposa les Directives del Consell 90/642/CEE, 93/57/CEE i inclou a més les anteriorment transposades en aquesta matèria, amb la finalitat de recollir en una única disposició tota la normativa relacionada amb els continguts de residus de pesticides en productes vegetals (BOE 9-3-1994). En la Taula 3.2 es donen els LMR (límits màxims de residus) dels pesticides més comuns que es poden trobar en raïms destinats a la vinificació segons el Real Decret del 18 de febrer de 1994, nº 280/1994. En l'Ordre del 27 de febrer de 1996 es modifiquen entre altres, els valors dels LMR de les següents substàncies: Benalaxil de 0,5 a 0,2 mg/Kg i Metalaxil de 0,5 a 1 mg/Kg (BOE 5-3-1996). En l'Ordre del 5 de desembre de 1996 es modifiquen entre altres, els valors dels LMR de les següents substàncies: metomil/tiodicarp de 0,5 a 3 mg/Kg (BOE 11-12-1996).

3.3. ELS PRODUCTES DE DEGRADACIÓ DELS PRINCIPIS ACTIUS DELS PESTICIDES

Al ser el most un medi bastant complex, els pesticides poden patir transformacions i aparèixer productes diferents dels originals que també cal estudiar per saber-ne exactament la seva acció i persistència tant en la fermentació com en el producte final.

Dvorak i col. 1970, en els seus estudis sobre la persistència de la diclofluanida (fungicida comercialitzat amb el nom d'Euparen) en la vinificació, afirmen que aquest compost fitosanitari es degrada per hidròlisi en medi àcid a N',N'-dimetil-N-fenilsulfodiamida, aquesta degradació segueix una corba aproximadament exponencial i que l'inici de la fermentació no es dona fins haver-hi una concentració de diclofluanida inferior a 0,3 ppm. També observen que la quantitat de diclofluanida en el most complet és més elevada que en el most centrifugat, és a dir en absència de llevats. En canvi la quantitat del seu producte de degradació (N',N'-dimetil-N-fenilsulfodiamida) és el mateix tant en el most centrifugat com en el most sencer. Per explicar aquest comportament proposen dues hipòtesis:

-o bé els llevats absorbeixen ràpidament una part de la diclofluanida, per tant la degradació es donaria en l'interior de les cèl.lules,

-o bé la diclofluanida, que és poc soluble en medi aquós, és eliminada per centrifugació.

Aquesta segona hipòtesi sembla ser bastant probable, si fos exacta, hauríem de trobar en el most centrifugat uns valors constants pels nivells de diclofluanida iguals a la solubilitat màxima d'aquesta substància en el most. Però com la corba de desaparició té un perfil aproximadament exponencial, els va fer pensar que possiblement es donaven les dues hipòtesis simultàniament.

El producte de degradació N',N'-dimetil-N-fenilsulfodiamida queda en forma soluble en el vi i no pot ser destruït ni es pot eliminar per les tècniques de vinificació (Schopfer, 1978; Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985).

Encuriosits per saber fins a quin punt la degradació de residus de pesticides era deguda a l'acció dels llevats, Faticenti i col. (1983) van estudiar la degradació d'alguns plaguicides en mostos inoculats i en mostos sense inocular. D'aquests experiments se'n desprèn que fermentacions en presència de folpel i metalaxil no produïen productes de degradació, en canvi la degradació de la vinclozolina i de dos insecticides (carbaril i tetraclorvinfos) no es va atribuir a l'acció dels llevats. Tantmateix en la degradació de l'insecticida deltametrina sí que hi estava implícita una acció microbiològica deguda als llevats.

La degradació del benomilo a temperatura ambient i sota diferents condicions de pH va ser estudiada per Chiba i col. (1986). A pH=7 en aigua, el Benomilo es transforma lentament en carbendazima i àcid N-butil-carbàmic que es degrada ràpidament a gas carbònic i butil-amina.

La degradació espontània dels diposits foliars dels productes fitosanitaris, es pot produir sota condicions seques i humides. Per exemple la vinclozolina, matèria activa del Ronilan, es degrada bastant fàcilment en aigua de l'aixeta (pH=8). En 23 dies, el 93% de la vinclozolina desapareix per donar dos compostos identificats com l'àcid carbàmic corresponent i el seu derivat dicarboxilat. En solucions etanòliques, el 25% de la vinclozolina es descomposa en 24 hores generant l'ester d'etil d'aquest àcid carbàmic, metabolit qualificat d'alt risc pels seus efectes carcinògens i que s'ha de trobar a dosis inferiors a 0,01 ppm (Clark, 1983; Cabanis, 1991). En canvi, en solucions etanòliques pures, la iprodiona no és estable (Cabras i col., 1984) així doncs, passats deu dies, s'ha comprovat que la molècula pateix una reconfiguració estructural per donar un compost isòmer (Cooke i col., 1979).

La velocitat de degradació del clozolinat (C), l'iprodiona (I), la procimidona (P) i la vinclozolina (V) en vins, es pot classificar de la següent manera: C>>V>P>>I, éssent la degradació més intensa a pH=4 que a pH=3. La diclor-3,5 anilina no es va detectar en els vins procedents de vinyes tractades amb aquests productes fitosanitaris, llavors es dedueix que no és un producte de degradació estable de cap d'ells. La desaparició del clozolinat i de la vinclozolina s'acompanya per l'aparició de dos compostos ben identificats, el 3-(3,5diclorfenil)-5metiloxazolidina-2,4-diona i el 3',5'-diclor-2dioxi-2metilbut-3-enanilida respectivament. S'ha comprovat que la iprodiona continua estable fins al cap de tres mesos (Cabras i col., 1984).

Pirisi i col (1986) afirmen que els metabolits de la vinclozolina i del clozolinat són dues anilines estables fins al cap de 150 dies i que la vinclozolina és degradada a la seva corresponent anilina per l'obertura del seu anell d'oxazolidina. Aquests mateixos experiments també ens demostren que la procimidona, que es mantindrà constant entre 5 i 150 dies, es degrada en el vi en diclor-3,5 anilina i aquesta a la vegada ho fa en un percentatge elevat de productes desconeguts. La velocitat de desaparició de la diclor-3,5 anilina per combinació amb els constituents del vi, és idèntica a la de la seva formació. Des del punt de vista pràctic, es pot afirmar que la presència d'elevades concentracions de clozolinat en raïms, només pot provocar un reduït risc toxicològic perquè és un producte que es degrada ràpidament. La procimidona i la vinclozolina, malgrat la seva gran estabilitat, tenen una degradació igual a la durada del procés de vinificació, per tant, el consum de vins procedents de vinyes tractades amb aquests productes tampoc implicarà riscos toxicològics. Però amb l'iprodiona s'hauran de vigilar les seves concentracions en la verema de cara a evitar una elevada presència de la mateixa en vins, doncs com hem apuntat anteriorment, és molt més estable que les altres (Cabras i col., 1984).

Marshall (1977) i Chovancova (1985) van examinar les dosis d'etilè-tiourea (ETU), producte de degradació del ditan M45 (mancozeb). La velocitat de degradació dels ditiocarbamats en ETU, van comprovar, que estava influenciada per la temperatura, l'oxigen disponible i el pH del medi. L'ETU és un compost tòxic classificat dins les substàncies de risc, tot i que Casanova i col. (1988) afirmen que la seva presència és casual en vins, ells no la van detectar en 63 de 68 vins, i en la resta s'hi trobava en concentracions traça inferiors a 35 µg/l.

En general, els mecanismes de degradació, així com els productes obtinguts, són en cada cas diferents i depenen en gran manera de la composició i naturalesa del medi.

3.4. INCIDÈNCIES ENOLÒGIQUES DELS TRACTAMENTS FITOSANITARIS

Els residus de plaguicides en el raïm poden provocar una sèrie d'efectes, la majoria de les vegades indesitjables, i que poden alterar la qualitat del vi en moltes ocasions. Aquests efectes poden ser directes, degut a la naturalesa química del producte, introduint en el most i vi mals gustos i males olors, o bé indirectes, modificant principalment la flora microbiana o l'activitat dels llevats.

3.4.1 Possible incidència dels residus fitosanitaris sobre les poblacions de llevats i les fermentacions

Els principals efectes que poden exercir els productes fitosanitaris sobre els llevats, es poden classificar de la següent manera:

a. Efecte nul, el trobem quan la utilització d'un pesticida no comporta cap modificació en els nivells de creixement dels llevats, ni en el metabolisme de la fermentació alcohòlica en particular.

b. Efecte de selecció, es manifesta quan els plaguicides canvien la proporció de les poblacions de microorganismes i alenteixen i aturen el creixement dels llevats tant en el raïm com en el most. Això comporta un decreixement de la cinètica fermentativa o bé que tingui una difícil finalització, produïnt-se alteracions ja siguin químiques o microbianes (domini de les espècies oxidatives tals com *Torulopsis bacillaria*, *Candida stellata* etc. respecte a les espècies fermentatives tals com *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* i *Hanseniaspora uvarum*, que són les que trobem en condicions normals de vinificació).

c. Efecte sobre el metabolisme dels llevats, apareix quan l'actuació del pesticida afecta directament al metabolisme dels llevats, llavors la fermentació alcohòlica es pot aturar o endarrerir.

En aquest apartat iniciarem un estudi dels efectes de diferents plaguicides agrupats per la seva funció (herbicides, insecticides i fongicides), a nivell de poblacions de llevats i a nivell de la cinètica fermentativa:

Herbicides

Els herbicides (glifosat, simazina, oxadiazon, terbutilazina+terbumeton, dinoseb, diquat, etc.) normalment no es troben en la verema, degut a què el període d'aplicació d'aquestes substàncies queda molt allunyat del moment de la recolecció. Es per això que no s'han descrit efectes negatius sobre la fermentació alcohòlica. Si han existit alguns problemes amb aquests productes, sempre han estat deguts a accidents provocats per la seva mala utilització (Foulonneau, 1977; Declerq, 1988; Rouzaud i col., 1988).

Insecticides

Es pot afirmar que si no fem un tractament excessiu amb insecticides (dicofol, metomil, dieton, metidation, fenitotrion, metilparation, clorpirifos etc.) la fermentació alcohòlica no es veurà alterada per les dosis de residus d'aquests productes en el most, que normalment no excedeixen els 10 ppm (Foulonneau, 1977; Girond i col., 1989).

Fungicides

Fungicides anti-mildiu sistèmics com el metalaxil (Ridomil), l'etilfosfit d'alumini (Mikal) i el curzat o cymoxanil, tot i que no presenten problemes en la vinificació trobant-se a dosis de 0,1 a 0,4; 0,2 i 0,04 ppm respectivament (Klopping i col., 1980; Bertrand, 1980), les seves matèries actives es poden comercialitzar formant part de formulacions mixtes amb altres compostos, i de manera particular amb el folpet (antifúngic) que si afectarà la fermentació alcohòlica (Gnaegi i col., 1983).

En les sals de coure utilitzades com antimildiu i també com antibotrítics, no s'han descrit efectes negatius sobre els llevats ni tampoc sobre la cinètica fermentativa (Minarik i col., 1975; Minarik, 1979; Girond i col., 1989). Fins i tot les dosis normals de coure en el most exerceixen una acció positiva afavorint el desenvolupament de les espècies de *Saccharomyces* (Bureau i col., 1982) així com també facilitant el desenvolupament de la fermentació. El coure es lliga a l'àcid sulfhídric que resulta de la reducció dels sulfats i dels sulfits durant la fase tumultuosa de la fermentació, així el sulfur de coure que és poc soluble, precipita i és eliminat amb els baixos quan es fan els trasbalsos. D'aquesta manera no només desapareix del most el coure sinó que també ho fa un part de l'àcid sulfhídric (Gartel, 1967; Wenzel i col., 1980; Bureau i col., 1982). Quan aquestes sals formen part d'altres formulacions químiques (p.e. Cuprosan i Acilon blau), segons els autors i les condicions de camp poden ser inòcues o bé afectar molt lleugerament la fermentació (Sapis-Domerq i col., 1978; Sapis-Domerq, 1980; Minarik, 1979; Cassignard, 1980; Conner, 1983; Monteil i col., 1986; Girond i col., 1989).

Les matèries actives dels fungicides anti-oïdium sistèmics, fenarimol i trimorfamida, en condicions de semi-anaerobiosi i a la dosi de 1 mg/l no exerceixen cap tipus d'influència sobre la fermentació alcohòlica (Gnaegi i col., 1983).

Un antioïdium inorgànic del que tampoc s'han descrit anomalies fermentatives, és el sofre (Cassignard, 1980; Monteil i col., 1986; Girond i col., 1989)

El triadimenol, el CGA 71818 i el triadimefon (Bayleton) són les matèries actives de fungicides anti-oïdium sistèmics que pertanyen a la família dels derivats triazòlics (Barberà 1989) coneguts sobretot per la seva acció sobre la biosíntesis d'esterols (Gnaegi i col., 1983; Ganegi, 1985). En condicions anaeròbiques els esterols són necessaris pel creixement dels llevats. Aquests es localitzen a nivell de membrana cel.lular que és la responsable de regular els intercanvis de l'interior cel.lular amb el medi extern: el most. Lafon-Lafourcade i col. (1977) van proposar el terme "factor de supervivència" per caracteritzar l'acció dels esterols sobre els llevats, perquè es manifesta sobretot mantenint una millor viabilitat cel.lular en la fase de declive quan particularment estem en condicions anaeròbiques. Gnaegi i Aerny (1984)

van demostrar que l'addició de petites quantitats de triadimefon, de l'ordre de 0,5 ppm, influència la velocitat de la fermentació alcohòlica sobretot en condicions de semi-anaerobiosi comparables a les d'un dipòsit de fermentació (Cassignard, 1980). Aquesta acció no es manifesta com un endarreriment en l'inici de la fermentació sinó que ho fa com un marcat alentiment al final de la mateixa, amb el risc de que quedin sucres residuals. En experiments en condicions de semi-anaerobiosi i a dosis de 1ppm, el triadimenol i el CGA 71818 van donar un efecte més marcat que el triadimefon (Gnaegi i col., 1984).

Les dicarboximides de contacte, captà (antimildiu) i folpet (antimildiu i antibotrític) que formen part de moltes formulacions comercials, perturben la fermentació alcohòlica endarrerint-la a partir de dosis compreses entre 1-2 ppm. Els llindars d'inhibició de la fermentació per ambdós principis actius oscil·la entre 10 i 20 ppm. (Schopper, 1978; Minarik, 1979; Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985; Monteil i col., 1986; Freydier i col., 1989). Tant el captà com el folpet inhibeixen el creixement *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* i *Hanseniaspora uvarum*, afavorint en canvi, el desenvolupament d'espècies com *Torulopsis bacillaria* i *Candida stellata*, es a dir, l'increment de les dosis de residus indueix a un domini i accentuació de les espècies oxidatives (Minarick i col., 1975; Sapis-Domerq, 1980; Conner, 1983; Gnaegi, 1985; Monteil i col., 1986; Girond i col., 1989; Iñiguez, 1993; Otero i col., 1993; Dominguez i col., 1995). El foltpet actua inhibint els enzims, lliurant tiofosgen (substància tòxica pels fongs) amb un fort poder penetrant, actua per contacte i en profunditat (Dominguez i col., 1995). Dins d'aquest mateix grup de dicarboximides hem de resaltar tres antibotrítics sistèmics, procimidona (Sumisclex), iprodiona (Rovral) i vinclozolina (Ronilan) com a més utilitzats. A dosis normals no s'ha detectat cap efecte ni sobre els llevats ni sobre la dinàmica fermentativa, només a vegades un feble alentiment de la fermentació depenent de les dosis i/o de les condicions edafo-climàtiques (Minarik, 1979; Sapis-Domerq i col., 1976, 1977, 1978, 1980; Cassignard, 1980; Zironi i col., 1981; Conner, 1983; Monteil i col., 1986; Cabras i col., 1987; Freydier i col., 1989; Iñiguez, 1993; Otero i col., 1993; Dominguez i col., 1995).

El benomil (Benlate) de la família dels bencimidazols, utilitzat com antioïdium i com antibotrític, és un dels fungicides sistèmics més usats del que no s'han descrit influències negatives en cap sentit a dosis normals (Sapis-Domerq i col., 1976; Cuinier, 1979; Foulonneau i col., 1980), tot i que Monteil i col. (1986) precisa que el benomil a qualsevol concentració inhibeix totalment 3 soques de llevats: *Rhodotórula glutinis*, *Zygosaccharomyces fermentati* i *Metschnikowia pulcherrima* llavors ja no podem parlar de l'inoquitat total d'aquest producte.

El fungicida de contacte antimildiu, antioïdium i antibotritis, diclofluanida (Euparen) de la família de les sulfamides, exerceix una acció fortament negativa sobre els llevats



(Gartel, 1967; Gnaegi, 1985), de tal manera que a dosis de 0,3 ppm ja pot actuar sobre soques de llevats fermentatius com *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* i *Hanseniaspora uvarum* podent-se produir fenòmens d'inhibició total. A aquesta dosi els alentiments en l'inici de la fermentació són de 11 dies per *Saccharomyces cerevisiae* i de 14 dies per *Hanseniaspora uvarum*. Les toleràncies més grans es troben per les espècies minoritàries de poc poder fermentatiu i poc poder alcoholigen, en general incapaces de poder dur a terme la fermentació. Els alentiments a l'inici de la fermentació s'atribueixen a la possible mort de les cèl.lules viables i al període necessari per reconstruir una densitat poblacional suficient per reiniciar el procés (Sapis-Domerq, 1980; Girond i col., 1989; Dominguez i col., 1995). En presència d'aquest pesticida la fermentació alcohòlica no pot començar fins que la matèria activa de l'Euparen no es degradi assolint nivells inferiors a 0,1-0,3 ppm (Dvorak i col., 1970), fet que comportarà l'aparició de retardaments en l'inici de la fermentació alcohòlica (Minarick i col., 1975; Schopfer, 1978; Sapis-Domerq, 1977, 1980; Cuinier, 1979; Cassignard, 1980; Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985; Monteil i col., 1986; Freydier i col., 1989; Iñiguez, 1993; Otero i col., 1993; Dominguez i col., 1995).

En la Taula 3.3 (Rouzaud i col., 1988) resumim els efectes dels principals fungicides sobre els llevats i la fermentació alcohòlica:

TAULA 3.3 Efecte d'alguns fungicides més comuns sobre els llevats i la fermentació

Fungicides	Cap efecte	Relentiment de la fermentació	Selecció desfavorable sobre els llevats
Coure	*		
Benomilo	*		
Carbendazima	*		
Metil-tiofanat	*		
Tiabendazol	*		
Zineb	*		
Maneb	*		
Mancozeb	*		
Propineb	*		
Tirame (TMDT)		*	*
Metirame-zinc	*		
Captà		*	*
Folpel		*	*
Captafol		*	
Procimidona	*		
Iprodiona		*	
Vinclozolina		*	
Curzat	*		
Diclofluanida		*	*
Metalaxil+coure	*		
Etil-fosfit d'alumini+coure	*		

El mecanisme d'acció de la diclofluanida ha estat descrit actuant a nivell de sistemes enzimàtics i a dosis molt fortes per un bloqueig complert dels llevats, que condueix a la seva mort (Dittrich i col., 1969). Cabras i col. (1987) apunta cap a la possibilitat de que l'activitat biològica de la diclofluanida sigui deguda al grup metiltiotriològenic de les seves molècules. L'efecte inhibidor contra els llevats és atribuïble a l'acció antagònica del complex SH-fungicida, per això aquest compost pot considerar-se com SH-bloquejador. Però actualment sembla que la teoria que té una major acceptació és la de Wood o de la competició inhibidora. Segons ella, les sulfamides sustraent als microorganismes l'àcid para-amino-benzoic, factor necessari per la síntesi d'àcid fòlic (vitamina). La carència d'aquesta vitamina necessària per la síntesi de purines i pirimidines serà el que pot justificar els retardaments en el creixement cel·lular dels llevats (Dominguez i col., 1995).

3.4.2 Possible incidència dels residus fitosanitaris en l'aparició de mals gustos i males olors en els vins

La incidència organolèptica dels productes de tractament fitosanitari de la vinya pot provocar dos tipus d'efectes:

I. aparició de gustos i olors característics d'aquests productes, evidentment lligats a la naturalesa del producte en qüestió (principi actiu i formulació).

Les causes que produeixen el gust reduït són conseqüència dels tractaments retardats a la vinya amb fungicides rics en sofre i pobres en coure. Els gustos reduïts poden evolucionar cap a olors més violentes i molt desagradables: olors de sulfur, d'ous podrits, olors fètds, pútrids i de descomposició (Freydier i col., 1989; Glories, 1988; Maujean, 1989; Cuenat i col., 1990). Els llindars de percepció d'aquests productes volàtils són particularment baixos (de 1 a 60 µg/l) i la resposta dels degustadors respecte aquests productes derivats del sofre, és proporcional al logaritme de les seves concentracions en els vins (Colagrande i col., 1988; Maujean, 1989; Rauhut, 1989)

La reducció és d'origen enzimàtic, d'origen químic (sota l'acció de la temperatura, del ferro o resultant dels catalitzadors d'oxido-reducció), o d'origen fotoquímic. Aquest és el cas d'alguns insecticides (Acefat, Metomyl) així com alguns fungicides (folpel, maneb, zineb, mancozeb, diclofluanida, sofre i diferents associacions amb la procimidona). El metomyl pot donar metanotiol si la temperatura del vi sobrepassa els 37°C i si està exposat a la llum. Els ditiocarbamats en mitjà reduït condueixen a la formació de sulfur de carboni i tiourea d'etilè, aquesta reacció evoluciona seguidament cap a la formació de metanotiol i de disulfur de dimetil. El sofre dissolt (mullat) sota l'acció dels llevats dona àcid sulfhídric, tiols i disulfurs (Glories, 1988; Maujean, 1989; Cuenat i col., 1990).

Les anomalies d'origen fermentatiu i la formació de compostos sulfurats que d'elles se'n deriva, no només estan provocades per un sol compost sinó que també poden estar provocades pel sinergisme de substàncies de naturalesa diferent. Les temperatures de fermentació, les composicions dels mostos, les soques de llevats, l'estat de la cèl.lula i el temps de permanència amb els baixos poden influenciar la formació del metabolisme del sofre.

L'àcid sulfhídric, certs tiols i disulfurs orgànics es poden formar en els processos fermentatius a partir de la reducció del sofre elemental, dels sulfats, dels sulfits i amb la intervenció dels aminoàcids que contenen sofre. Diverses substàncies són les responsables del gust reduït: sulfur de dimetil, disulfur de dimetil, sulfur de metil i àcid sulfhídric. La majoria d'elles es formen per oxidació dels aminoàcids que contenen sofre (metionina i cisteïna). El sulfur de metil és un precursor dels tioesters i del disulfur (Colagrande i col., 1988; Freydier i col., 1989). Segons Zambonelli i col. (1988), els llevats són capaços d'utilitzar els sulfats per la biosíntesi d'aminoàcids tals com cisteïna i metionina. En aquest procés, l'àcid sulfhídric és un intermediari que, si és produït en excés amb relació a les seves necessitats, és excretat per les cèl.lules.

En els vins embotellats, les olors sulfuroses (ous podrits, col i olors fecals) es poden desenvolupar lentament, per exemple l'acefat (Orten), a pH del vi s'hidrolitza a metanotiol (MeSH) que té un llindar de percepció en aigua molt baix (de 0,02 a 2 µg/l). En presència d'agents oxidants, 2 mol.lècules de MeSH s'oxiden a disulfur de dimetil (DMDS) substància que fa mala olor i que té un llindar de percepció en aigua de 0,16 a 12µg/l. Existeix una correlació positiva entre la intensitat del defecte i la concentració en el DMDS, el defecte apareix igualment quan ens trobem amb taxes febles de residus d'Acefat (0,1 mg/l). Un altre exemple el trobem en el metomil (Lannate), és un insecticida que conté sofre en la seva molècula. El seu producte de degradació, un tioacetat, s'hidrolitza també a metanotiol. S'ha comprovat que a vegades l'hidròlisi del metomil és més lenta que la de l'acefat (Rauhut, 1989).

La disminució de sofre molecular entre el darrer tractament fitosanitari i la verema és del 68%. Un 60% d'aquesta quantitat es troba en el most, i solsament en trobem un 10% després de l'aplicació d'un desfangat de 24 h. Els valors de residus de sofre en els mostos no clarificats varia entre 0,3 i 8,9 mg/l. La quantitat d'àcid sulfhídric augmenta en els vins, més enllà de 1 mg/l i fins hi tot pot arribar a ser 20 vegades més gran del valor del llindar de percepció olfativa (Wenzel i col., 1980).

Quan els nivells de coure sobrepassen els 5 mg/l en el most, l'aparició d'àcid sulfhídric disminueix i fins i tot pot arribar a desaparèixer (Gartel, 1967; Wenzel, i col., 1980).

II. les modificacions organolèptiques i dels paràmetres analítics del vi provocades pels pesticides, ja sigui per perturbacions dels equilibris naturals entre les diferents espècies microbianes (llevats i bacteris), o bé per la influència sobre l'activitat dels llevats responsables de la formació dels aromes fermentatius.

En herbicides tals com el glifosate, simazina, oxidiazon i terbutilazina + terbumeton, no s'ha descrit cap efecte sobre els caràcters sensorials dels vins (Rouzaud i col., 1988).

El coure, ja sigui en forma de sal (oxiclorur de coure o sulfat de coure) o bé formant part d'un producte comercial (Cuprosan, Cupagrex, etc.) no altera les característiques gustatives dels vins procedents de vinyes tractades amb aquests pesticides inorgànics (Monteil i col., 1986; Cassignard, 1980).

Les alteracions degudes al folpet provoquen una lleugera acidificació del medi, destaca la tendència cap a l'increment de l'acidesa total, del l'àcid succínic i els alts valors d'àcid tartàric. L'acidesa volàtil en canvi, queda pràcticament constant, cosa que fa intuir que el folpet inhibeix la flora acetificant. En conjunt, la composició àcida del vi no experimenta variacions substancials i manté una estructura correcta des del punt de vista físico-químic. S'ha de resaltar però que la constitució àcida del vi es deu en la seva major part a l'àcid tartàric. A diferents dosis creixents de folpet, s'obtenen vins amb densitats finals i matèries reductores més grans, que donaran un grau alcohòlic més elevat. També s'observa un desequilibri entre grau/glicerol, suposadament degut a desviacions metabòliques (Otero i col., 1993; Dominguez i col., 1995).

Respecte als paràmetres analítics del vi, l'addició de dosis creixents de diclofluanida produeixen una acidificació general del medi amb increments de l'acidesa volàtil, de la densitat, disminució del grau alcohòlic i com a conseqüència, un increment de la matèria reductora. Pugen els valors dels àcids cítric i làctic, i baixen paral·lelament els valors dels àcids tartàric i succínic. També existeix una descompensació de la relació grau alcohòlic/glicerol suposadament degut a desviacions metabòliques (Otero i col., 1993; Dominguez i col., 1995). Els nivells d'alcohols superiors són baixos, tot al contrari del que passa amb els esters (sobretot l'acetat d'etil), que amb l'esmentat plaguicida els trobem més abundants que en mostres no tractades, sempre i quan el percentatge de l'espècie *Hanseniaspora sp.* sigui més elevat. La presència de la matèria activa de l'Euparen en un vi provoca mals gustos essencialment deguts a la formació de compostos reduïts (d'àcid sulfhídric o mercaptans), i es tradueixen en una acusada amargor dels vins. Aquests mals

gustos, són més elevats en el cas del folpet que en cas de la diclofluanida. Tot i que no apareixen sistemàticament, són força freqüents i es consideren com a molestos (Dvorak i col., 1970; Schopfer, 1978). Pel que fa al seu producte de descomposició (N',N'-dimetil-N-fenilsulfodiamida), no provoca la formació de cap mal gust ni de cap mala olor (Dvorak i col., 1970).

No hi ha efectes en l'analítica de vins procedents de vinyes tractades amb anti-botrítics tals com procimidona, vinclozolina i iprodiona. Les anàlisis no mostren cap anomalia a nivell de sucres, de polifenols, d'acidesa total així com tampoc a nivell d'àcid tartàric. Tampoc tenen cap efecte sobre la conservació del vi (Zironi i col., 1981). Tot i que el vi obtingut en presència de procimidona té un comportament similar al d'un vi no tractat, cal destacar que manté valors d'acidesa total relativament constants, valors d'àcid tartàric una mica alts i contràriament al que esperem pels valors de pH, s'observa un lleuger increment dels àcids succínic i làctic en funció de la dosi (Otero i col., 1993; Dominguez i col., 1995). Per tots tres pesticides s'obtenen graus alcohòlics lleugerament superiors, mantenint nivells alts en matèries reductores i densitats (Zironi i col., 1981; Otero i col., 1993) També es troben elevats nivells d'alcohols superiors en vins procedents de vinyes tractades, particularment en el cas de la procimidona, que pot ser tres vegades superior (Zironi i col., 1981).

El triadimefon (Bayleton) al provocar retardaments al final de la fermentació, hi ha el risc que quedin sucres residuals i la formació creixent de l'acidesa volàtil (Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985). Cabras i col., (1987) no descriuen cap defecte organolèptic en vins procedents de vinyes tractades amb zineb, maneb, mancozeb i benomilo.

3.5. ELIMINACIÓ DELS RESIDUS DE PRODUCTES FITOSANITARIS MITJANÇANT LES TÈCNiques HABITUALS DE LA VINIFICACIÓ

El pas de residus de pesticida de la verema al vi dependrà de les propietats físiques de les seves matèries actives, i en primer lloc de la seva solubilitat en l'aigua i en la mescla aigua-etanol. Això explica que, generalment, una gran part d'aquests residus passin al vi per extracció després de la maceració en la vinificació en negre, més que per la premsada en vins blancs.

Sense tenir la necessitat d'utilitzar cap tècnica particular, trobem que els processos habituals en enologia s'acompanyen, per la major part de matèries actives, d'una eliminació important de residus. La influència del desfangat (vinificació en blanc) per l'eliminació de residus és molt important tot i que depèn igualment de la solubilitat de la substància en qüestió en el medi (Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985). En els cassos on els fungicides han presentat efectes nefastos, es poden baixar els seus nivells en el most per la utilització de

bentonita durant la fermentació (Monteil i col., 1986). També, trasbalsos ràpids un cop acabada la fermentació així com la centrifugació i filtratge dels mostos, disminueixen considerablement la concentració de residus presents. I finalment la clarificació dels vins abans de l'embotellament té algun efecte encara, que mínim, en l'eliminació d'aquestes substàncies (Navarro i col., 1989).

L'eliminació és més del 70% per les ftalimides (captà i folpet) i per la diclofluanida, per l'efecte combinat del desfangat i de la hidròlisi de les seves matèries actives (Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985). El desfangat i la centrifugació permeten eliminar una quantitat apreciable de diclofluanida encara present en el most en aquest moment. El seu producte de degradació N',N'-dimetil-N-fenilsulfodiamida queda en forma soluble en el vi i no pot ser destruït ni es pot eliminar per les tècniques de vinificació (Dvorak i col., 1970; Schopfer, 1978; Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985). Pels residus de foncicides sistèmics solubles en aigua aquesta operació no té efecte (Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985).

La clarificació dels mostos procedents de vinyes tractades amb plaguicides insolubles com el sofre, elimina al voltant del 90% de residus. Aquest fet evita la formació de compostos reduïts com l'àcid sulfhídric (Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985).

El cas del benomilo i dels pesticides que tenen com a principi actiu el bencimidazol carbamat de metil (BCM), el desfangat no té cap efecte, doncs el compost és estable i soluble en medi àcid. La presència d'aquests compost és molt més acusada en vins negres, degut al procés de maceració. Sembla però, que els tractaments amb bentonita (50 g/hl o més) permeten baixar els seus nivells del 90% al 40% (Gnaegi i col., 1983; Cabras i col., 1987). Pels vins negres, el tractament s'aconsella en el descubatge i pels vins blancs es pot efectuar després del premsat (Gnaegi i col., 1983).

Els residus de procimidona, iprodiona i vinclozolina (fungicides dicarboximídics) passen parcialment al vi. En la vinificació en negre, podem afirmar que la meitat d'aquests residus presents en els raïms passen al vi. En la vinificació en blanc serà menys de la meitat i encara el desfangat n'eliminarà una part (un 40%), quedant-ne solament una quarta part. En canvi la utilització de bentonita i carbó actiu no donaren resultats positius per l'eliminació d'aquest tipus de matèries actives (Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985; Garcia i col., 1994).

Cabras i col. (1984) va provar la clarificació utilitzant carbó actiu, bentonita i casseinat de potasi per tres insecticides (carbaril, dimetodat i tetraclovinfos) i per tres fungicides (diclofluanida, folpet i vinclozolina). El resultat que se'n desprèn dels seus experiments, és que per a tots els pesticides, el carbó actiu elimina entre un 80% i un 93% dels residus presents excepte per al dimetodat on la reducció va ser només del 40%, i que

l'acció del carbó actiu és més accentuada sobre el vi que sobre el most. Per altra banda Flori i col. (1990) també van demostrar l'eficàcia del carbó actiu sobre els residus de benalaxil, furalaxil, metalaxil i iprodiona, mentres que la bentonita, el casseinat de potasi, el gel de silici i la gelatina no donaren efectes positius.

3.6. SOLUCIONS PREVENTIVES PER EVITAR LES ATURADES I ALENTIMENTS DE LA FERMENTACIÓ

Tots aquests estudis ens condueixen a plantejar les següents solucions preventives:

-els tractaments fitosanitaris de les vinyes s'han de fer respectant les dosis recomanades i guardant els períodes de seguretat (Schopfer, 1978; Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985).

-en la vinificació en blanc, fer desfangats cuidadosos per tal d'eliminar el màxim possible de residus (Schopfer, 1978; Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985).

-inocular els mostos amb un peu de cuba abundant a base de llevats seleccionats (Monteil i col., 1986), per assegurar que la presència del producte fitosanitari no destrueixi totalment totes les cèl.lules, i si al cap de 2 o 3 dies la fermentació encara no ha començat, sembrar un altre cop. Pel cas de la diclofluanida les resembres amb peu de cuba s'han de fer un cop aquesta s'ha hidrolitzat (pel davall de 0,3 ppm) (Dvorak i col., 1970; Schopfer, 1978; Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985).

-fer un primer trasbals amb una retirada ràpida de baixos, en particular si la fermentació ha estat perturbada, per evitar l'aparició de mals gustos reduïts indirectes (d'àcid sulfhídric o mercaptà) (Cuenat, 1990), com és el cas de vins procedents de vinyes tractades amb diclofluanida, folpet i captà (Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985).

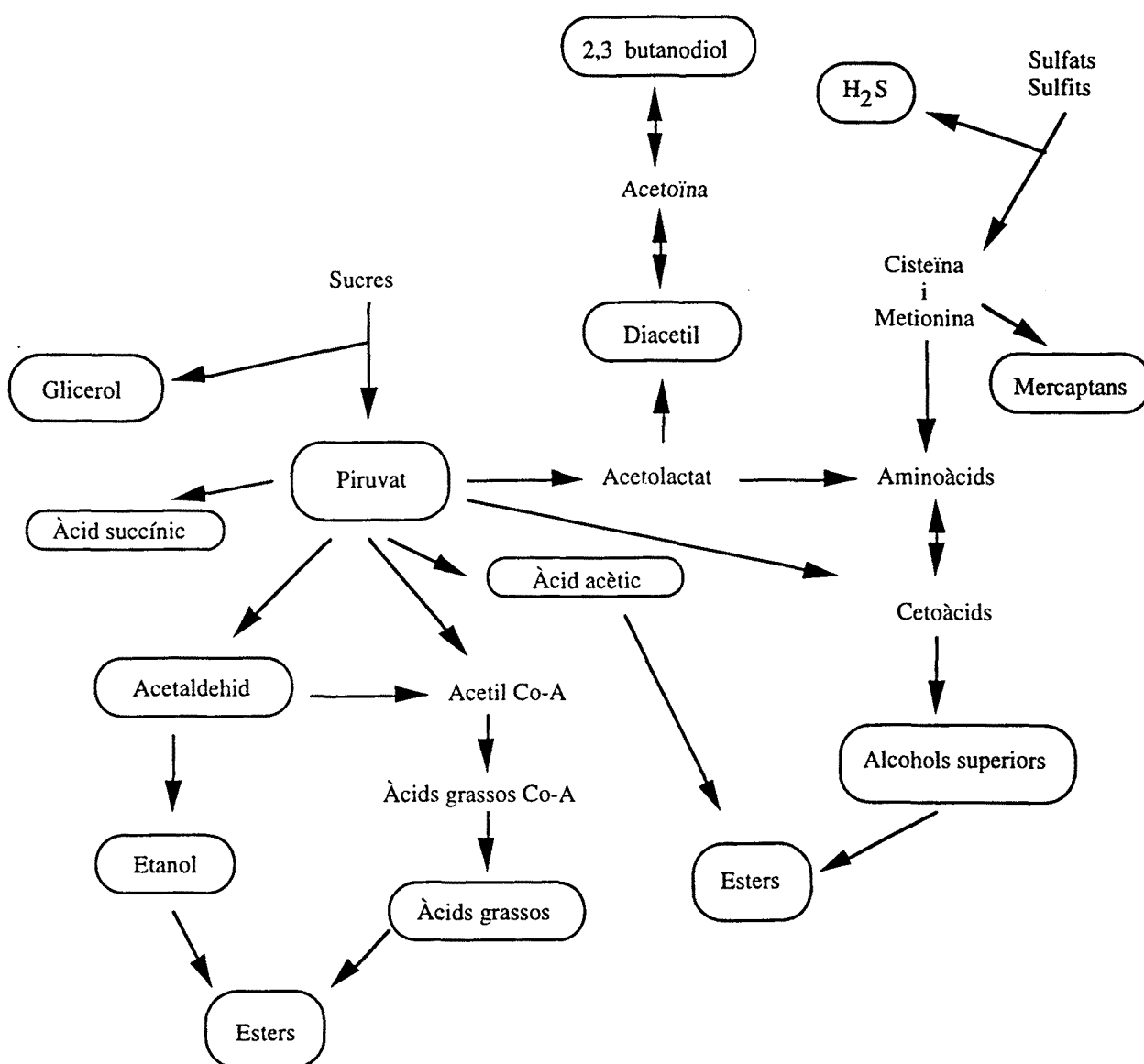
-fer una clarificació just abans de l'estabilització, amb un tractament amb bentonita a dosis baixes sobretot amb vins procedents de vinyes tractades amb diclofluanida, folpet i captà (Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985).

Pel triadimefon (Bayleton) la solució proposada és efectuar una bona sembra amb llevats precultivats en anaerobiosi, també cal efectuar una aireació al final de la fermentació alcohòlica amb la finalitat de permetre que els llevats puguin sintetitzar més esterols i així mantenir la seva viabilitat més temps, per tal de poder realitzar la fermentació completa (Gnaegi i col., 1983; Gnaegi i col., 1984; Gnaegi, 1985).

4. PRODUCTES FINALS DEL METABOLISME

Un altre aspecte important a considerar en la problemàtica dels alentiments i aturades de fermentació és la seva influència sobre la composició química i el perfil organolèptic del vi. Per aquesta raó, iniciem a continuació l'estudi dels principals productes secundaris del metabolisme dels llevats i de la seva influència sobre la qualitat sensorial del vi.

FIGURA 4.1 Esquema dels productes derivats del metabolisme dels llevats



Els metabolits secundaris del raïm són els principals responsables de la formació dels sabors en el most, i els que li confereixen un marcat caràcter varietal (Schreier, 1979, Baumes i col., 1986; Williams i col., 1989; Rapp i col., 1991). La fermentació incrementa la

complexitat química i gustativa del vi, per extracció d'aquests compostos de les parts sòlides presents en el most modificant-ne alguns d'ells, i per la producció de metabolits a partir del metabolisme dels llevats (Figura 4.1).

Els compostos produïts a partir del metabolisme dels llevats habitualment es classifiquen en tres grups:

- 4.1. Els productes majoritaris de la fermentació
- 4.2. Els productes minoritaris de la fermentació
- 4.3. Els productes indesitjables o negatius per la composició aromàtica

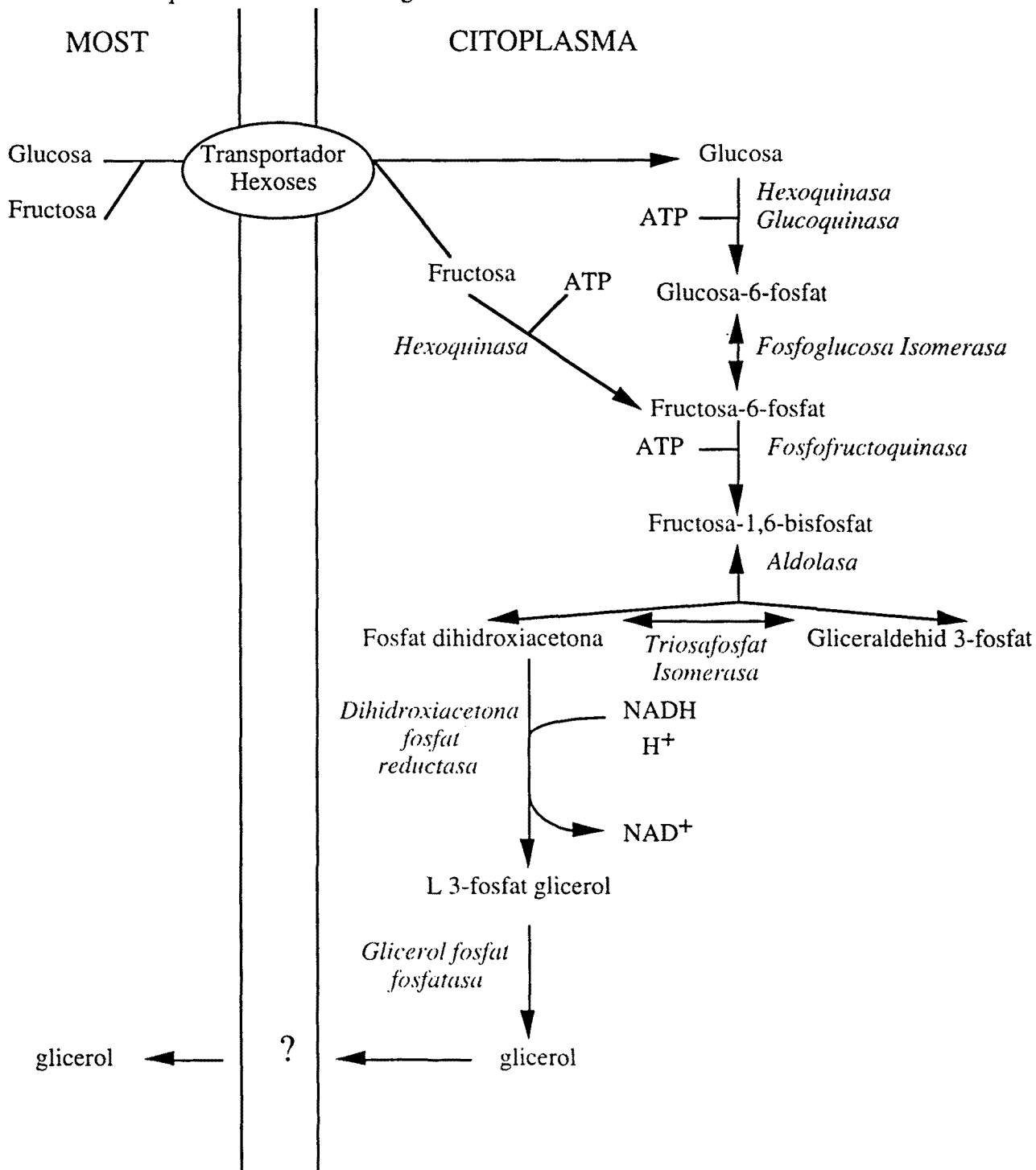
4.1. PRODUCTES MAJORITARIS DE LA FERMENTACIÓ

El principal producte final del metabolisme dels sucres en *Saccharomyces cerevisiae* i altres espècies relacionades, és òbviament l'etanol, donant entre el 92 i el 95% del total de productes resultants d'aquest tipus de metabolisme. El CO₂, el qual es forma en concentracions equimolars respecte a les del etanol, seria l'altre producte majoritari que s'escaparia a l'atmosfera durant i després de la fermentació, tot i que també es podria trobar solubilitzat en el vi (Ribéreau-Gayon i col., 1989; Fleet, 1994; Boulton, 1996). Al començament de la fermentació, els llevats passen per una fase de latència, en la qual l'etanol no es produeix immediatament (Pena i col., 1972; Whiting, 1976), doncs les activitats de la piruvat descarboxilasa i de l'alcohol deshidrogenasa (ADHI) són baixes degut a que tot just comencen a expressar-se els seus gens, que es coneix que són induïbles per la glucosa (Denis i col., 1983; Rieger i col., 1983; Schmitt i col., 1983; Sharma i col., 1986).

El segon producte en importància quantitativa és sense cap dubte el glicerol, que contribueix de forma notable a la sensació de volum del vi, conferint-li suavitat i una certa dolçor (Ribéreau-Gayon i col., 1989; Boulton, 1996). El glicerol, que es troba a concentracions compreses entre 5 i 10 g/l, es produeix de forma majoritària en els primers estadis de la fermentació alcohòlica. Això és degut al fet de que en el most, la presència d'altres concentracions de glucosa reprimeixen les cadenes respiratòries, impedingint la reoxidació del NADH obtingut en la fase oxidativa de la glucolisi. Els llevats poden pal·liar l'acumulació de NADH i el deficit de NAD⁺, mitjançant l'acció de la piruvat descarboxilasa i de l'alcohol deshidrogenasa que al transformar el piruvat en acetaldehid i posteriorment en etanol, reoxiden el NADH a NAD⁺ (Ribéreau-Gayon i col., 1989; Fleet, 1994; Boulton, 1996). No obstant durant les primeres fases de la fermentació, la multiplicació dels llevats condiciona que gran part del piruvat sigui utilitzat per a la síntesi, la qual cosa provocarà que s'acumuli NADH. En aquestes condicions, els llevats únicament poden reoxidar el NADH mitjançant la reducció del fosfat de dihidroxiacetona a glicerol fosfat per la dihidroxiacetona fosfat reductasa, (Figura 4.2) (Ribéreau-Gayon i col., 1989; Fleet, 1994; Boulton, 1996).

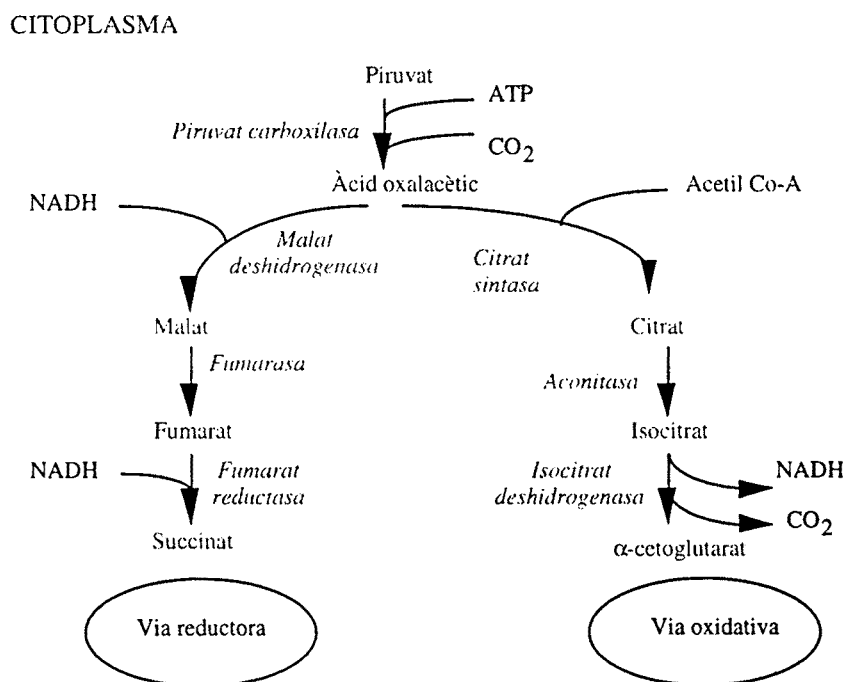
Després la glicerol fosfat fosfatasa desfosforilarà el glicerol fosfat donant glicerol com a producte d'aquesta reacció. En presència d'elevades concentracions de SO_2 té lloc una superproducció de glicerol (Neuberg, 1946; Hinze i col., 1986; Fleet, 1994), degut a què el SO_2 s'acomplexa amb l'acetaldehid fent que aquest compost no estigui disponible ni per la reducció ni per la regeneració del NAD^+ a partir de NADH .

FIGURA 4.2 Esquema de la síntesi del glicerol



Un altre producte secundari important és l'àcid succínic, que contribueix de forma notable a l'acidesa fixa del vi (Ribéreau-Gayon i col., 1989). Aquest àcid que és troba en concentracions compreses entre 0,6 i 1,5 g/l, és un intermediari del CAT (Cicle de Krebs o Cicle dels àcids tricarboxílics) i per tant la seva síntesi esta relacionada amb el funcionament del mateix. Sota condicions d'altres concentracions de glucosa, com és el cas del most, els enzims del CAT són inactius (Polakis i col., 1965; Polakis i col., 1965; Beck i col., 1968; Chapman i col., 1968; Duntze i col., 1969; Wales i col., 1980). Tanmateix sembla ésser que existeixen formes citoplasmàtiques de la majoria dels enzims del CAT que s'expressen en condicions d'anaerobiosi. Tan sols dos enzims, la 2-cetoglutarat deshidrogenasa i la succinat deshidrogenasa no presenten formes citoplasmàtiques (Boulton, 1996). Això fa que el CAT no sigui funcional com a cicle. No obstant, part de les reaccions del CAT si que ho són, i donarà lloc a dues vies (Figura 4.3): una via oxidativa que serveix per a produir 2-cetoglutarat, el qual serà necessari per a fixar el nitrogen, i una via reductora que donarà lloc a la formació de fumarat. Posteriorment el fumarat és reduït per acció de la fumarat reductasa, produint àcid succínic. Aquesta via reductora permet al llevat reciclar part de l'excés de NADH.

FIGURA 4.3 Esquema del CAT (Cicle dels àcids tricarboxílics) en condicions d'anaerobiosi



Al començament de la fermentació alcohòlica, els nivells de anhídrid sulfurós lliure són relativament elevats, es poden acomplexar amb la tiamina i d'aquesta manera s'inhibeix la síntesi de la pirofosfat de tiamina (TPP). El TPP, és cofactor de la piruvat descarboxilasa, l'enzim que catalitza la reacció de conversió del piruvat a acetaldehid. La piruvat carboxilasa,

cataliza la conversió del piruvat a àcid oxalàctic, i sembla ser que entra en competició amb la piruvat descarboxilasa pel substrat (van Urk i col., 1988; Whiting, 1976). Quan l'activitat de la piruvat descarboxilasa és reduïda per l'acció de l'anhidrid sulfurós, la piruvat carboxilasa pot desviar el metabolisme glucídic cap al CAT (Van Urk i col., 1988), la qual cosa en condicions d'un CAT parcialment funcional es traduirà en una síntesi dels àcids orgànics intermediaris del mateix, especialment d'àcid succínic. Això justifica que aquest àcid sigui sintetitzat majoritàriament al començament de la fermentació. La producció d'aquest àcid estarà fortament influenciada per la soca de llevats, la mida de l'inòcul, el pH i la composició del most (Whiting, 1976).

4.2. PRODUCTES MINORITARIS

Considerem com a productes minoritaris al conjunt de subproductes del metabolisme dels llevats, que malgrat trobar-se en concentracions relativament baixes, contribueixen notablement als aromes del vi.

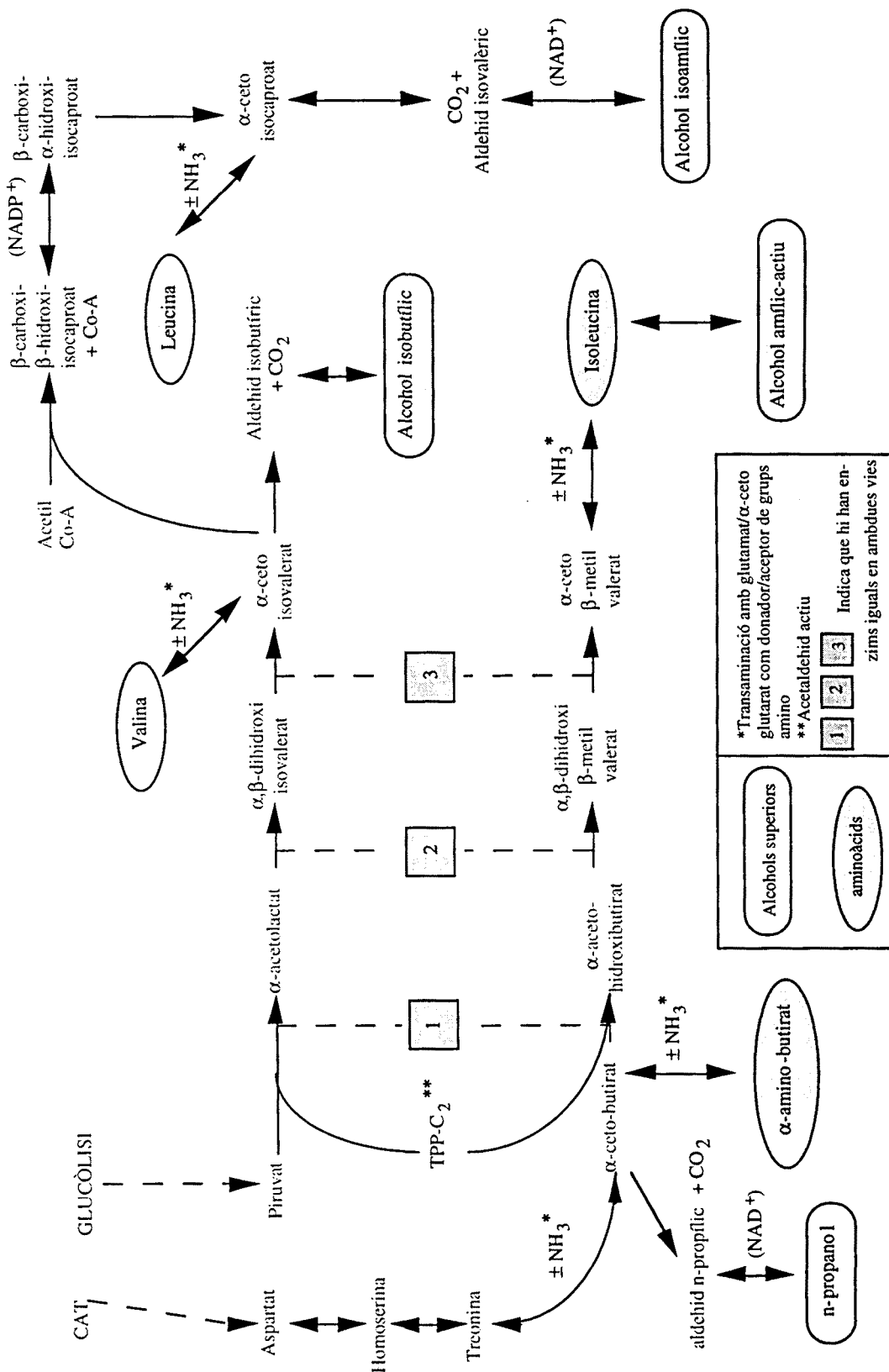
4.2.1. Els alcohols superiors

Els alcohols superiors (Taula 4.1) són subproductes del metabolisme dels aminoàcids dels llevats. La majoria d'ells presenten olors d'olis pesants i com a conseqüència, poden produir desviacions organolèptiques sempre que sobrepassin el seu llindar de percepció. Afortunadament s'acostumen a trobar en concentracions molt més baixes de les perceptibles. D'altra banda, són precursors necessaris de molts esters que presenten aromes força interessants per a la qualitat del vi.

TAULA 4.1 Els principals alcohols superiors presents en el vi

ALCOHOL SUPERIOR	Concentració habitual en el vi (mg/l)	Olor
Propanol-1	10 a 50	neutre
Metil-2-propanol-1	30 a 150	fort (olis pesants)
Metil -2-butanol-1(o amílic)	30 a 150	fort (olis pesants)
Metil-3-butanol-1(o isoamílic)	70 a 400	fort (olis pesants)
Fenil-2-etanol	20 a 200	rosa
Butanol-1	≈ 1	fort (olis pesants)
Hexanol-1	3 a 10	herbaci
Tirosol	5 a 30	fort (olis pesants)
Triptofol	≈ 2	fort (olis pesants)

FIGURA 4.4 Formació dels alcohols superiors a partir de la glucosa



La formació d'alcohols superiors tant es pot donar a partir dels sucres, a partir de la desviació de la via de síntesi dels esquelets carbonats dels aminoàcids, i també a partir dels aminoàcids, mitjançant transaminació, descaboxilació i reducció (Fleet, 1994; Boulton, 1996).

Les vies bioquímiques de formació d'alcohols superiors com el 3-metil butanol-1 (alcohol isoamílic), el 2-metil butanol-1 (alcohol amílic actiu), 2-metil butanol (alcohol isobutíric) i el 1-propanol, excepte en els darrers estadis, són idèntiques a la formació de certs aminoàcids tals com la leucina, l'isoleucina, la valina i la treonina respectivament (Thoukis, 1958; Ingraham i col., 1960) (Figura 4.4). Els darrers dos pasos de la via, la descarboxilació del α -ceto àcid i la reducció del subseqüent aldehyd per l'alcohol deshidrogenasa, amb NADH com a donador d'electrons, aparentment inclou els mateixos enzims que es necessita per la conversió de piruvat (un α -keto àcid) a alcohol etílic (SentheSanmuganathan, 1960 a i b; Webb i col., 1963; Kunkee i col., 1966 i 1972; Singh i col., 1977). Aquest procés es dona en absència d'aminoàcids, condicions que troben al principi de la fermentació, durant aquest estadi els α -ceto àcids i els seus corresponents alcohols superiors es formaran a partir del metabolisme dels sucres via piruvat (Chen, 1978; McDonald i col., 1984; Nykänen, 1986).

Els alcohols superiors com abans hem dit, també es poden formar a partir d'aminoàcids gràcies a una desaminació que formarà el α -ceto àcid corresponent, aquest més tard serà descarboxilat donant un aldehyd que finalment es reduirà a l'alcohol superior en qüestió. Sembla ser que els factors que influencien la formació dels alcohols superiors són: el contingut de nitrogen del most, la soca de llevats utilitzada, l'aireació, la temperatura i el pH, l'increment dels tres darrers tendirà a fer pujar els nivells d'alcohols superiors formats (Webb i col., 1963; Rankine, 1967).

4.2.2. Els esters

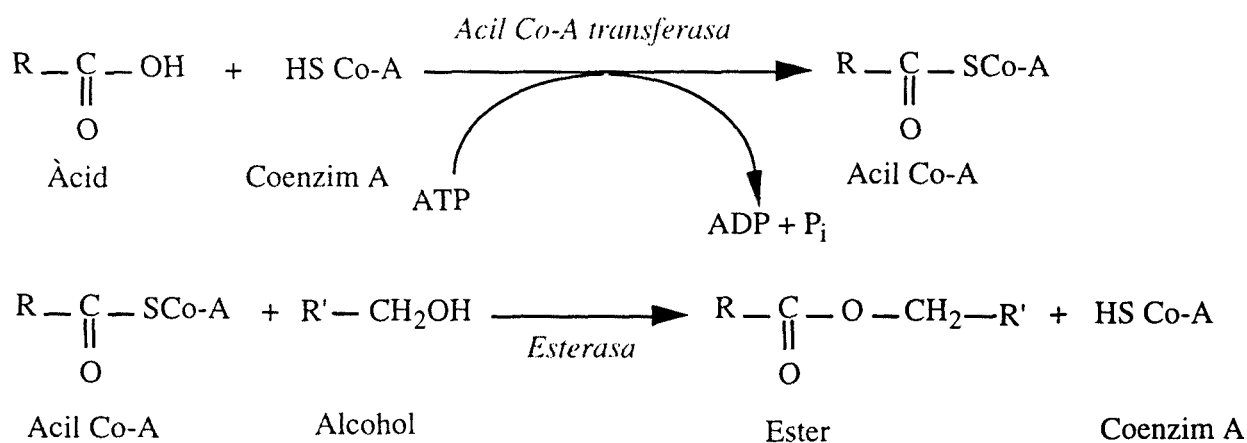
Els esters són produïts durant la fermentació alcohòlica en petites quantitats, però tot i amb això seran els principals encarregats de la formació dels aromes secundaris característics de fermentació (Taula 4.2).

Els esters es formen normalment (Nordstrom, 1962, 1963, 1965) a partir de l'àcid acètic i alcohols superiors, i a partir dels àcids grassos o bé altres àcids orgànics i l'etanol. Però també es poden produir a partir dels acil-CoA quan la biosíntesi o la degradació dels àcids grassos és interrompuda en el llevat i es fa necessària la regeneració de coenzim A lliure (Figura 4.5).

TAULA 4.2 Els principals esters de vi

ESTERS	Concentració habitual en el vi (mg/l)	Olor
Acetat d'etil	30 a 220	cola
Acetat d'isoamil	2 a 10	platan
Acetat d'hexil	1 a 2	poma
Acetat de fenil-2-etanol	≈ 2	rosa
Butirat d'etil	0,04 a 1	afruitat
Hexanoat d'etil	0,06 a ,06	afruitat
Octanoat d'etil	1 a 6	afruitat
Decanoat d'etil	1 a 4	afruitat
Dodecanoat d'etil	0,1 a 1,2	afruitat
Tetradecanoat d'etil	0,1 a 1,2	afruitat
Hexadecanoat d'etil	0,1 a 0,6	afruitat

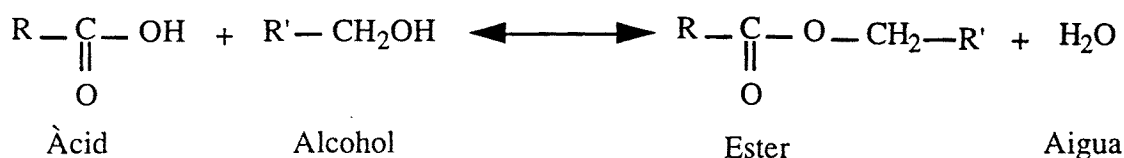
FIGURA 4.5 Síntesi enzimàtica dels esters



Les carboxilacions oxidatives que inclouen el coenzim A també poden provocar la formació d'esters. En aquest cas els esters es formen a partir dels esquelets carbonatats dels aminoàcids. L'acetat d'isoamil i el 3-metilbutirat d'etil es poden formar a partir de la leucina, el primer pas serà desaminar i descarboxilar l'esmentat aminoàcid donant un aldehid, aquest pot ser reduït a un alcohol que reaccionarà amb l'acetil Co-A donant acetat d'isoamil, o bé oxidat a un àcid monocarboxil que s'activarà i es lligarà al coenzim A en una reacció que requerirà ATP, per reaccionar posteriorment, amb l'etanol i formar 3-metilbutirat d'etil (Ribéreau-Gayon i col., 1989; Fleet, 1994; Boulton, 1996).

La síntesi química també pot ser una altra possibilitat per a la formació d'esters (Figura 4.6), però aquesta només es dóna en el cas que àcids orgànics tals com el tartàric, el màlic, el succínic i en alguns casos l'acètic i el làctic, siguin molt abundants. Per això l'esterificació química acostuma a ésser poc important.

FIGURA 4.6 Síntesi química dels esters

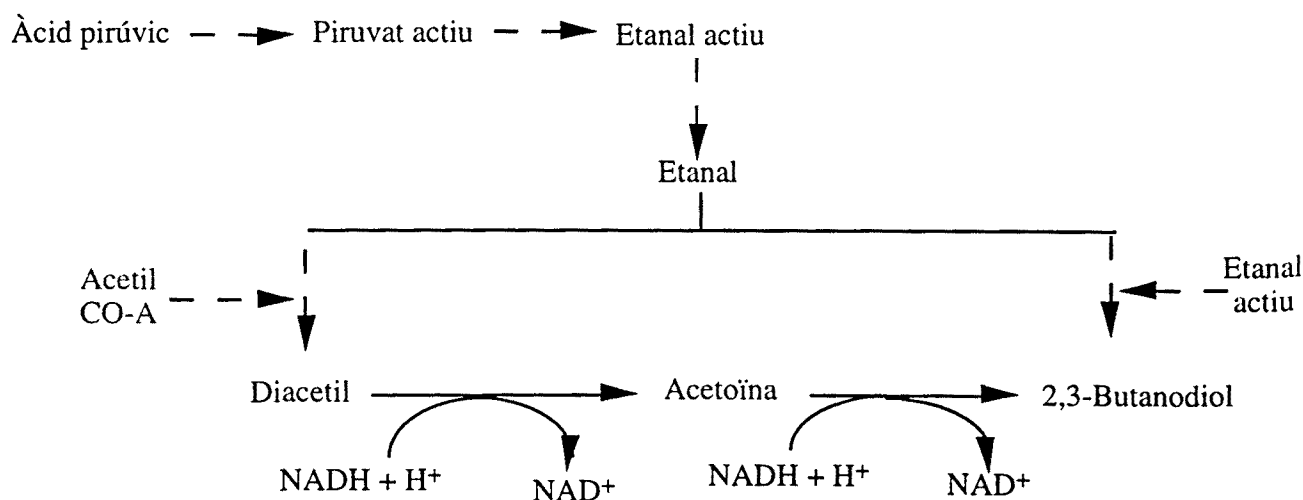


La formació dels esters està influenciada principalment per: la temperatura (Killian i col., 1979), el contingut en compostos nitrogenats del most (Vos i col., 1978; Bell i col., 1979; Ough i col., 1981), la soca de llevats (Soles i col., 1982), les aireacions i el pH del medi. Però també el poden influenciar, encara que amb un efecte secundari, el contingut de sòlids presents en el most i el requeriment de pantotenat (Oura, 1973).

4.2.3. Substàncies acetoíniques

Aquest grup el formen tres substàncies que deriven de l'etanal actiu, es tracta del diacetil, l'acetoïna i el 2,3-butanodiol (Figura 4.7). El primer i el segon confereixen gust de mantega i ametlla respectivament, el tercer no és volàtil i només si es troba en una concentració superior a 1 g/l produeix un gust amarg en el vi.

FIGURA 4.7 Síntesi de les substàncies acetoíniques



La formació d'aquests compostos en el vi, no solsament és deguda al metabolisme dels llevats, sinó a què els bacteris làctics produeixen acetoïna i sobretot diacetil en concentracions superiors als llevats (Revel i col., 1989).

4.3. PRODUCTES VOLÀTILS INDESITJABLES O NEGATIUS PER A LA COMPOSICIÓ AROMÀTICA

Majoritàriament les substàncies volatils que podríem qualificar de negatives o indesitjables per l'obtenció d'un bon vi són: l'àcid acètic, l'acetat d'etil, l'àcid sulfhídric i els mercaptans. Aquestes substàncies, que són subproductes del metabolisme dels llevats i/o dels bacteris làctics i acètics, poden alterar dràsticament la qualitat sensorial d'un vi.

El principal àcid volàtil que trobem en el vi és l'àcid acètic. El seu origen és múltiple, de tal manera que pot provindre de la transformació dels sucres pels bacteris làctics (picat làctic), per la transformació dels sucres o de l'etanol pels bacteris acètics (picat acètic) o fins i tot com a subproducte de la fermentació alcohòlica dels llevats (Ribéreau-Gayon i col., 1989). La producció d'àcid acètic pels llevats depèn principalment del gènere, de l'espècie i fins i tot de la soca. Normalment es considera que *Saccharomyces cerevisiae* produeix quantitats relativament baixes d'àcid acètic (Shimazu i col., 1981), i de fet un dels criteris bàsics de selecció de soques de *Saccharomyces cerevisiae* per a "starters" de la fermentació alcohòlica és la seva baixa producció d'aquest àcid volàtil (Suarez i col., 1990).

Jost i col. (1975) han suggerit que els mecanismes de síntesi d'àcid acètic en llevats són els següents: 1) la reacció reversible catalitzada per l'acetil Co-A sintetasa, passa l'acetil Co-A a acetil adenilat, 2) el trencament de l'àcid cítric per la citrat liasa, 3) la producció a partir de piruvat, per la piruvat deshidrogenasa, 4) la formació reversible a partir d'acetil fosfat per l'acetil quinasa i 5) l'oxidació d'acetaldehid per l'acetaldehid deshidrogenasa. De fet, s'ha comprovat que la producció d'àcid acètic per *Saccharomyces cerevisiae*, a l'igual que la de la resta de productes secundaris, té lloc majoritàriament durant els primers estadis de la fermentació (Whiting, 1976).

En condicions d'anaerobiosi Verduyn i col. (1990) van observar que dues soques de *Saccharomyces cerevisiae* no produïen les mateixes concentracions d'àcid acètic. La soca que formava poc àcid acètic, es va trobar que tenia elevats nivells d'acetil co-A sintetasa d'acord amb altres informacions precedents (Postma i col., 1989). La composició de nutrients del most (Jost i col., 1975; Ribéreau-Gayon i col., 1989) i la competència entre diferents espècies de microorganismes (Drysdale i col., 1989; Shimazu i col., 1981) són dos factors que poden incrementar els nivells d'àcid acètic del most.

L'acetat d'etil, amb un fort olor de cola, és també un altre defecte important del vi. L'acetat d'etil, pot ser sintetitzat pels llevats oxidatius, pels bacteris acètics i/o per esterificació química a partir de l'àcid acètic i de l'etanol (veieu apartat 4.2.2). Aquest compost, degut al seu baix llindar de percepció, és moltes vegades l'indicador sensorial més fiable de que un vi esta picat.

L'àcid sulfhídric i els mercaptans són unes substàncies amb olors força desagradables que alteren enormement la qualitat d'un vi. El seu origen no està clar, si bé sembla ser que esta relacionat amb el metabolisme de la cisteïna i la metionina. Alguns autors consideren que la seva formació està regulada per la disponibilitat de nitrogen (Vos i col., 1979; Monk, 1982; Henschke i col., 1991) si bé aquesta hipòtesi no esta del tot clara (Bidan i col., 1985; Maujean, 1989). Únicament es té la certesa que algunes soques de *Saccharomyces cerevisiae* el produeixen més que d'altres i que el contacte del vi acabat amb els llevats provoca la seva aparició. Per aquestes raons es considera que un dels criteris de selecció de soques (Suarez i col., 1990), és la seva baixa producció d'aquests compostos, i que és imprescindible trasbalsar els vins una vegada ha finalitzat la fermentació alcohòlica. També sembla ser que algunes varietats viníferes com l'Ull de llebre o el Syrah són més susceptibles de donar aquestes olors.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

BIBLIOGRAFIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

- Aerny, J.** (1986). Disminution de la teneur des vins en anhydride sulfureux. L'anhydride sulfureux et ses propriétés utiles en vinification. *Rev. Suis. Vitic. Arboric. Hortic.*, 18, 1, 17-21.
- Agenbach, W.A.** (1977). A study of must content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. *Proc. South African Enol. Vitic.* 66-87.
- Aiba, S., Shoda, M., i Nagatani, M.** (1968). Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotech. Bioeng.*, 10, 845-864.
- Alexandre, H., Mathieu, B. i Charpentier, C.** (1996). Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H⁺-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid. *Microbiology*, 142, 469-475.
- Alguhon, R. i Schmid, A.** (1988). La lucha integrada en viticultura. *Sem. Vitiv.*, 2017, 2351-2363.
- Amerine, M.A., Berg, H.W., Kunkee, R.E., Ough, C.S. Singleton, V.L. i Webb, A.D.** (1980). The composition of grapes and wines. En *The Technology of Winemaking*, 4a ed. Westport, Connecticut: AVI Publishing Company.
- André, B.** (1995). An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11, 1575-1611.
- Ashida, S., Shimazaki, T., Kitano, K. i Hara, S.** (1983). New killer toxin of *Hansenula mrakii*. *Agric. Biolog. Chem.*, 47, 2953-2955.
- Barberà, C.** (1989). Pesticidas agrícolas. Ed. Omega, 4a. edició, p.292-293.
- Bargues, M., Salom, D., Gómez, A., Paricio, N., Pérez-Alonso, M. i Pérez-Ortín, J.E.** (1996). Sequencing analysis of a 4.1 kb subtelomeric region from yeast chromosome IV identifies HXT15, a new member of the hexose transporter family. *Yeast*, 12, 1005-1011.
- Barre, P. i Biron, M.J.** (1982). Identification of "killer" group in 55 strains of *Saccharomyces* isolated from wine. *Science des Aliments*, 2, 125-130.
- Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J.M. i Salmon, J.M.** (1996). Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: impact on alcoholic fermentation kinetics. *J. Ferm. Bioengin.*, 82, 2, 145-150.

Baumes, R., Cordonier, R., Nitz, S. i Drawert, F. (1986). Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars. *J. Food Sci. Agric.*, 37, 927-943.

Bayonove, C. (1989). Incidences des attaques parasitaires fongiques sur la composante qualitative du raisin et des vins. *Rev. Franc. Oenol.*, 116, 29-39.

Bazan, P. (1989). Les résidus phytosanitaires dans les vins. *Vitis*. 132, Mai, 52.

Beavan, M.J., Charpentier, C. i Rose, A.H. (1982). Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *J. Gen. Microbiol.*, 128, 1447-1455.

Beck, C. i von Meyenburg, H.K. (1968) Enzyme pattern and aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various degrees of glucose limitation. *J. Bacteriol.*, 96, 479-486.

Becker, J.U. y Betz, A. (1972). Membrane transport as controlling pacemaker of glycolysis in *Saccharomyces calshbergensis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 274, 584-597.

Beelman, R.B., Kenn, R.M., Banner, M.L. i King, S.W. (1982). Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. *Devel. Indus. Microbiol.*, 23, 107-121.

Bely, M., Sablayrolles, J.M. i Barre, P. (1990a). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Ferment. Bioengineering*, 70, 246-252.

Bell, A.A., Ough, C.S. i Kliewer, W.M. (1979). Effects on must and wine composition, rates of fermentation and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* var. Thompson Seedless grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 30, 124-129.

Benda, I. (1982). Wine and brandy. En Prescott and Dunns Industrial Microbiology, 4th edition, ed. G. Reed, pp. 293-402. Wesport: AVI Publishing Company.

Benda, I. (1989). Occurrence of killer toxin-producing strains of film-forming yeasts in grape must and their influence on alcoholic fermentations. *Wein Wissenschaft*, 44, 56-60.

Benito, B., Portillo, F. i Lagunas, R. (1992). In vivo activation of the yeast plasma membrane ATPase during nitrogen starvation. *Federation of European Biochemical Societies*, 300, 271-274.

Bertrand, A. (1980). Bilan des résidus de phosphites dans le raisin, le vin et les eaux-de-vie. *Vignes et Vins*, 294, 14-19.

Bidan, P. i Collon, Y. (1985). Métabolisme du soufre chez la levure. *Bull. de l'OIV*, 652-653, 544-561.

Bisson, L.F. (1988). Hight-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is under general glucose repression control. *J. Bacteriol.*, 170, 4838-4845.

Bisson, L.F. (1991). Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. En *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines*. (Seattle, WA, 1991), edited by J. Tantz, pp. 172-184. Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture.

Bisson, L.F. i Fraenkel, D.G. (1983a). Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 80, 1730-1734.

Bisson, L.F. i Fraenkel, D.G. (1983b). Transport of 6-deoxy-D-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 155, 995-1000.

Bisson, L.F. i Fraenkel, D.G. (1984). Expression of kinase-dependent uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 159, 1013-1017.

Bisson, L.F., Neigeborn, L., Carlson, M. i Fraenkel, D.G. (1987). The SNF3 gene is required for hight-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 169, 1656-1662.

Blumberg, H., Hartshorne, T., Irani, M.H., Taguchi, A., Taylor, W.E., Yu, J. i Young, E.T. (1987). Regulation of alcohol dehydrogenase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. En *Biological Research on Industrial yeast, Volume III*, ed. G.G. Stewart, I. Russell, R.D. Klein i R.R. Heibsch, pp. 1-10, Boca Raton, Florida: CRC Press.

Bostian, K.A., Elliot, Q., Bussy, H., Burn, V., Smith, A i Tipper, D.J. (1984). Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type 1 killer yeast: multiple processing events produce a two component toxin. *Cell*, 36, 741-751.

Bostian, K.A., Hopper, J.E., Rogers, D.J. i Tipper, D.J. (1980). Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *Saccharomyces cerevisiae*: M-dsRNA encodes toxin. *Cell*, 19, 403-414.

- Boulton, R.** (1980). Prediction of fermentation behaviour by a kinetic model. *Am. J. Enol. Vitic.*, 31, 40-45.
- Boulton, R., Singleton, V.L., Bisson, L.F. i Kunkee, R.E.** (1996). Principles and practices of winemaking. Ed. Chapman & Hall, Capítol 4, 102-192.
- Bruinenberg, P.M., Waslander, G.W., van Dijken, J.P. i Scheffers, W.A.** (1986). A comparative radiorespirometric study of glucose metabolism in yeasts. *Yeast*, 2, 117-121.
- Brun, S. i Mestres, G.** (1990). Incidence qualitative de la lutte phytosanitaire en oenologie. Bulletin de l'OIV, 713-714, 571-579.
- Bureau, G., Brun, O., Vignes, A., Maujean, A., Vessells, G. i Feuillat, M.** (1982). Étude de la microflore levurienne champenoise. *Conn. Vigne Vins*, 16, 15-31.
- Bussey, H. i Skipper, N.** (1975). Membrane-mediated killing of *Saccharomyces cerevisiae* by glycoproteins from *Torulopsis glabrata*. *J. Bacteriol.*, 124, 476-483.
- Busturia, A. y Lagunas, R.** (1986). Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 132, 379-385.
- Cabanis, J.C.** (1991). Contaminants: leur teneur doit encore diminuer. *Viti*, Novembre, 110-112.
- Cabras, P.; Meloni, M. i Pirisi, F.M.** (1987). Pesticide fate from vine to wine. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*; U.S.A., 99,83, 117.
- Cabras, P.; Meloni, M., Pirisi, F.M. i Pirisi, R.** (1984). Degradation of dicarboximidic fungicides in wine. *Pestic. Sciences.*, 15, 247-252.
- Cabrera, J.M., Moreno, J., Ortega, J.M. i Medina, M.** (1988). Formation of ethanol, higher alcohols, esters and terpenes by five yeast strains in must from "Pedro Ximenez" grapes in various degrees of ripeness. *Amer.J. Enol.Vitic.*, 39, 283-289.
- Cantarelli, C.** (1957). On the activation of alcoholic fermentation in wine making. *Amer.J. Enol.Vitic.*, 8, 113-120, 167-175.
- Carr, J.G., Davies, P.A. i Sparks, A.H.** (1976). The toxicity of sulphur dioxide towards certain lactic bacteria from fermented apple juice. *J. App. Bacteriol.*, 40, 201-212.

Cartwright, C.P., Juroszek, J.R., Beavan, M.J., Ruby, F.M.S., DeMorias, S.M.F. i Rose, A.H. (1986). Ethanol dissipates the proton -motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Micro.*, 132, 369-377.

Casanova, M. i Guichon, R. (1988). Residues of EDBC fungicides and ETU in experimental and commercial beverages (beer and wine). *J. Environ. Sci. Health*, B23, 2, 103-107.

Casey, G.P. i Ingledew, W.M. (1986). Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Critic. Rev. Microbiol.*, 13, 219-280.

Casey, G.P., Magnus, C.A. i Ingledew, W.M. (1984). Hight-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition fermentative ability and alcohol production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 639-646.

Cassignard, R. (1980). Influence des produits de traitement de la vigne sur la flore microbienne des fermentations et les caractères organoleptiques des vins. *Vignes et vins*. 286, 33-36.

Caubet, R. Guerin, B. i Guerin, M. (1988). Comparative studies on the glycolytic and hexose monophosphate pathways in *Candida parapsilosis* i *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 149, 324-329.

Celenza, J.L., Marshall-Carlson, L. y Carlson, M. (1988). The yeast SNF3 gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 85, 2130-2134.

Ciriacy, M. (1975). Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and genetic analysis of *adh* mutants. *Mutation Research*, 29, 315-326.

Clark, T. (1983). The stability of Vinchlozolin in the presence of ethanol, methanol and water. *Chemosphere*. 12, 9-10, 1363-1369.

Clifton, D. i Fraenkel, D.G. (1981). The *gcr* (glycolysis regulation) mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 256, 13074-13078.

Colagrande O., Mazzoleni, V. i Silva, A. (1988). Genesi degli odori e sapori anomali dei vini. Seminario su: Odori e sapori anomali dei vini, *Rasegna Economica della provincia di Allessandria*, n°3, suplemento n°4, 10-21.

Cole, M. B. and Keenan, M. H. J. (1987). Effects of weak acids and external pH on the intracellular pH of *Zygosaccharomyces bailii*, and its implications in weak-acid resistance. *Yeast*, 3, 23-32.

Colowick, S.P. (1973). The hexokinases. En *The Enzymes*, 3rd edition, edited by P.D. Boyer, 9, 1-48, New York: Academic Press.

Conner, A.J. (1983). The comparative toxicity of vineyard pesticides to wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 34, 4, 278-279.

Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A. i Guillamon, J.M. (1997). Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and the inoculum in wine fermentation. Pendent d'acceptació en *International Journal of Food Microbiology*.

Cooke, B.K., Loeffler, R.S.T. i Pappas, A.C. (1979). The structural rearrangement of Iprodione in ethanolic solution. *Pestic. Science*, 10, 393-398.

Cooper, T.G. (1982). Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. En *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Metabolism and Gene Expression*, Editat per J.N.Strathern, E.W. Jones i J.R. Broach, pp. 399-461. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Cooper, T.G. i Sumrada, R. (1975). Urea transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 121, 571-576.

Cuenat, P., Zufferey, E. i Kobel, D. (1990). La prévention des odeurs sulphydriques des vins par la centrifugation après la fermentation alcoolique. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 22, 5, 299-303.

Cuinier, C. (1979). Influence des fongicides sur les levures. *Vignes et Vins*, 285, 42-48.

Chapman, C. i Bartley, W. (1968). The kinetics of enzyme changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria. *Biochem. J.*, 107, 455-465.

Chen, E.C.-H. (1978). The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols. *J. Amer. Socie. Brew. Chem.*, 36, 39-43.

Chiba, M. i Sing, R.P. (1986). Hight performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of Benomyl and Carbendazim in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 108-112.

Chovancová, J., Matisová, E. i Bátorá, V. (1985). Determination of Ethylenethiourea in grapes and wine. *J. Assoc. Off. Chem.*, 68, 4, 741-745.

D'Amore, T. i Stewart, G. (1987). Ethanol tolerance of yeast. *Enz. Microb. Technol.*, 9, 322-330.

Dalh, J.S. i Dahl, Ch.E. (1985). Stimulation of cell proliferation and polyphosphoinositide metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* GL7 by ergosterol. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 133, 840-850.

Davenport, R. (1974). Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. *Vitis*, 13, 290-301.

Declerq, M. (1988). Les résidus des produits phytosanitaires dans le vin. *Revue des Oenologues*, 50, 15-17.

Delfini, D. i Parvex, C. (1989). Study on pH and total acidity variations during alcoholic fermentation. Importance of ammoniacal salt added. *Riv. Vitic. Enol.*, 42, 43-56.

Den Hollander, J.A., Ugurbil, K., Brown, T.R., Bednar, M., Redfield, C. i Shulman, R.G. (1986a). Studies of anaerobic and aerobic glycolysis in *Saccharomuces cerevisiae*. *Biochemistry*, 25, 203-211.

Den Hollander, J.A., Ugurbil, K., i Shulman, R.G. (1986b). ³¹P and ¹³C NMR studies of intermediates of anaerobic and aerobic glycolysis in *Saccharomuces cerevisiae*. *Biochemistry*, 25, 212-219.

Denis, C.L., Ciriacy, M. i Young, E.T. (1983). MRNA levels for the fermentative alcohol dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* cedrease upon growth on a non-fermentative carbon source. *J. Biol. Chem.*, 258, 1165-1171.

Devine, S.J. i Slaughter, J.C. (1980). The effect of medium composition on the production of ethanol by *Saccharomuces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Letters*, 9, 19-21.

Dittrich, H.H. i Issinger, O.G. (1969). Zum wirkungsmechanismus von dichlofluanid. *Ztschr. für Pflanzenkrankh. und Pfl. Schutz*, 76, 11-12, 651-663.

Dombek, K.M. i Ingram, L.O. (1986). Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 975-981.

Dominguez, J., Hernáez, J.L., Otero, D., Pastrana, L., i Pazos, Y. (1995). Los residuos antibotróxicos en las fermentaciones vinicas. Incidencias en la calidad del vino. *Viticultura y Enologia*, 41, 111-123.

Drewke, C. i Ciriacy, M. (1988). Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. Biophys. Acta*, 950, 54-60.

Drysdale, G.S. i Fleet, G.H. (1988). Acetic acid bacteria in winemaking -a review. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 39, 143-154.

Drysdale, G.S. i Fleet, G.H. (1989). The effect of acetic acid upon the growth and metabolism of yeast during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 471-481.

Duntze, W., Neumann, D., Gancedo, J.M., Atzpodien, W. i Holzer, H. (1969). Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 10, 83-89.

Dvorak, V. i Schopfer J.F. (1970). Rémanence de l'Euparène et vinification. *Rev. Suisse Vitic. Arboric.*, 2, 5, 99-104.

Dyke, S.F. (1965). The chemistry of the Vitamins, Interscience, New York.

Eddy, A.A. (1982). Mechanisms of solute transport in selected eukaryotic microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*. 23, 1.

Edwards, C.G., Beelman, R.B., Bartley, C.E. i McConnell, A.L. (1990). Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 41, 48-56.

Elias, A. W., Chapman, D. i Ewing, D.F. (1976). Phospholipid phase transition. Effects of n-alcohols, n-monocarboxylic acids, phenylalkylalcohols and quaternary ammonium compounds. *Biochim. Biophys. Acta*, 448, 220-230.

Faticenti, F., Farris, G.A., Deiana, P., Cabras, P., Meloni, M. i Pirisi, F.M. (1983). A preliminary investigation into the effect of *Saccharomyces cerevisiae* on pesticide concentration during fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 323-325.

Fenner, G.P. i Parks, L.W. (1989). Gas chromatographic analysis of intact steryl esters in wild type *Saccharomyces cerevisiae* and in an ester accumulating mutant. *Lipids*, 24, 625-629.

Ferreras, J.M., Iglesias, R. i Girbes, T. (1989). Effect of the chronic ethanol action on the activity on the general amino-acid permease from *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 979, 375-377.

Fleet, G.H. (1992). Spoilage yeasts. *CRC Critic. Rev. Biotechnol.*, 12, 1-44.

Fleet, G.H. (1994). *Wine: Microbiology and Biotechnology*. 2nd edition. Harwood Academic Publishers.

Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S. i Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *App. Environ. Microbiol.*, 48, 1034-1038.

Flori, P. i Cabras, P. (1990). I residui di fitofarmaci nei vini. *Vignevini*. 7-8, 31-37.

Foulonneau, C. (1977). L'emploi des pesticides en viticulture, conséquences oenologiques. *Vignes et Vins*, 263, 29-39.

Foulonneau, C., Mollet, C., Durand, R., Roure, P., Bettuine, J.C. i Dufoulon, L. (1980). Conséquences oenologiques de l'emploi au vignoble de produits de lutte contre différents parasites ravageurs et accidents physiologiques de la vigne. Rapport au Comité Scientifique et Technique, Institut Technique du Vin.

Fraenkel, D.G. (1986). Mutants in glucose metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 317-337.

Franzusoff, A.J. i Cirillo, V.P. (1982). Uptake and fosforylation of 2-deoxy-D-glucose by wild-type and single kinase strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica and Biophysica Acta*. 688, 295.

Fresse, E., Sheu, C.W. i Galliers, E. (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, London. 241, 321-325.

Freydier, M., Cugier, J.P., de Cormis, L. i Foulonneau, C. (1989). Influences oenologiques éventuelles des traitements phytosanitaires et conséquences sur l'emploi des pesticides. *Progrès Agricole et Viticole*, 106, 11, 260-265.

Fuguet, J. (1997). Comunicació personal.

Fuhrmann, G.F., Volker, B., Sander, S. i Potthast, M. (1989). Kinetic analysis and simulation of glucose transport in plasma membrane vesicles of glucose-repressed and derepressed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Experientia*, 45, 1018-1023.

Gamo, F.J., Moreno, E. i Lagunas R. (1995). The low-affinity component of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* is not due to passive diffusion. *Yeast*, 11, 1393-1398.

Gancedo, J.M., Clifton, D. i Fraenkel, D.G. (1977). Yeast hexokinase mutants. *J. Biol.ogic. Chem.*, 252, 4443-4444.

Gao, C. i Fleet, G.H. (1988). The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacterio.*, 65, 405-410.

Garcia-Cazorla, J. i Xirau, M. (1994). Persistencia de residuos de fungicidas dicarboximídicos en uva, mosto y vino. *Viticultura y Enologia*, 35, 60-65.

Gartel, W. (1967). Action sur la vigne des produits chimiques utilisés dans la lutte contre les parasites et ses conséquences. *Bull. OVI* 40, 442, 1342-1351.

Geneix, C. (1984). Reserches sur la stimulation el l'inhibition de la fermentation alcoolique du mout de raisin. Thesis, Institut d'Oenologie. Université de Bordeaux II.

Giacomini, P., Ostinelli, A., de March, A., Rovira, J., Burguera, J., Sancho, M. i Andrés J.L. (1994). Innovación en los procesos de clarificación y de fermentación de los mostos de uva. *Viticultura y Enologia*, 33, 40-55.

Girond, S., Blazy-Maugen, F., Michel, G. i Bosch, M. (1989). Influence de quelques pesticides viticoles sur les levures et la fermentation. *Revue Française d'Oenologie*, 119, 14-22.

Glories, Y. (1988). Les goûts de réduit. Seminario su: Odori e sapori dei vini. Rassegna Economica della Provincia di Alessandria, 3. Supplemento 4, 32-34.

Gnaegi, F. (1985). Fongicides viticoles et fermentation. *Revue Française d'Oenologie*, 99, 9-13.

Gnaegi, F. i Aerny, J. (1984). Influence des fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stéroïdes sur la fermentation alcoolique et la qualité du vin. *Bull. Q.I.V.* **57**, 646, 995-1005.

Gnaegi, F., Aerny, J., Bolay, A. i Crettenand, J. (1983). Influence des traitements viticoles antifongiques sur la vinification et la qualité du vin. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **15**, 4, 243-250.

Goldstein, D. (1987). Ethanol-induced adaptation in biological membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **492**, 103-111.

Gonçalves, T. i Loureiro-Dias, C. (1994). Aspects of glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Bacteriology*, **176**, 1511-1513.

Goto, S. (1980). Changes in the wild yeast flora of sulphited grape musts. *J. Instit. Enol. Vitic. Yamanashi*, **15**, 29-32.

Grossman, M.K. i Becker, R. (1984). Investigations on bacterial inhibition of wine fermentation. *Keller-Wirtschaft*, **10**, 272-275.

Gunge, N. i Sakaguchi, K. (1981). Intergenic transfer of deoxyribonucleic acid killer plasmids pGKL1 and pGKL2, from *Luyveromyces lactis* into *Saccharomyces cerevisiae* by cell fusion. *J. Bacteriol.*, **147**, 155-160.

Heard, G.M. i Fleet, G.H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *App. Environ. Microbiol.*, **50**, 727-728.

Heard, G.M. i Fleet, G.H. (1986). Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. *Food Tech. in Australia*, **38**, 22-25.

Heard, G.M. i Fleet, G.H. (1987). Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2171-2174.

Heard, G.M. i Fleet, G.H. (1988a). The effect of sulfur dioxide on yeast growth during natural and inoculated wine fermentation. *The Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, **3**, 57-60.

Heard, G.M. i Fleet, G.H. (1988b). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.*, **65**, 23-28.

Henry, S.A. (1982). The membrane lipids of yeast: biochemical and genetic studies. En *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces : Metabolism and Gene Expression*. J.N. Stratern, E.N. Jones i J.R. Broach., eds., pp. 101-158. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Henschke, P.A. i Jiranek, V. (1991). Hydrogen sulfide formation during fermentation: Effects of nitrogen composition in model grape musts. En *International Nitrogen Symposium on Grapes and Wine*, J.M. Rantz, ed. Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture.

Heredia, C.F., Sols, A. i DelaFuente, G. (1968). Specificity of the constitutive hexose transport in yeast. *Europe Journal Biochemistry*, 5, 321-329.

Herraiz, T., Martin-Alvarez, P.J., Reglero, G., Herrera, M. i Cabezudo, M.D. (1989). Differences between wines fermented with and without sulphur dioxide using various selected yeasts. *J. Scien. Food Agric.*, 49, 249-258.

Herraiz, T., Reglero, G., Herrera, M., Martin-Alvarez, P.J. i Cabezudo, M.D. (1990). The influence of yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 41, 313-318.

Herring, A.J. i Bevan, E.A. (1974). Virus-like particles associated with the double-stranded RNA species found in killer and sensitive strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gener. Virol.*, 22, 387-394.

Hinze, H. i Holzer, H. (1986). Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Arch. Microbiol.*, 145, 27-31.

Hohmann, S. i Cederberg, H. (1990). Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes PDC1 and PDC5. *Europ. J. Biochem.*, 188, 615-621.

Horak, J. (1986). Amino acid transport in eucaryotic microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 864, 223-256.

Huang, Y.C., Edwards, C.G., Peterson, J.C. i Haag, K.M. (1996). Relationship between sluggish fermentations and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 47, 1, 1-10.

Hunter, K. i Rose, A.H. (1971). Yeast lipids and membranes. En *The Yeasts* (Vol. 2). A.H. Rose and J.S. Harrison (Eds.), pp 211-70. Academic Press, London.

Ingledeu, W.M. i Kunkee, R. (1985). Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 65-76.

Ingraham, J.L. i Guymon, J.F. (1960). The formation of higher aliphatic alcohols by mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 88, 157-166.

Iñiguez, M. (1993). Estudio de los residuos de pesticidas desde la uva al vino, en diversos trabajos de campo i bodega. *Vitivinicultura*, 9-10, 41-49.

Jiranek, V., Langridge, P. i Henschke, P.A. (1995). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 46, 1, 75-83.

Jones, R.S., Rasmussen, J.E., Schultz, E. i Smith, R. (1994). Acetic acid as a causative agent in producing stuck fermentations. 45th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture. Anaheim, CA.

Jost, P. i Piendl, A. (1975). Technological influences on the formation of acetate during fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 34, 31-37.

Joyeux, A. i Lafon-Lafourcade, S. (1984). Metabolisme des bactéries acetiques dans le moût de raisin. *Sci. Aliments*, 4, 247-255.

Juroszek, J.R., Raimbault, O., Feuillat, M. i Charpentier, C. (1987). A new method for determination of ethanol tolerance in vinification yeast: Measurement of glucose-induced proton movements. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38, 336-341.

Killian, R.E. i Ough, C.S. (1979). Fermentation esters-formation and retention as affected by fermentation temperature. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 30, 301-305.

King, A.D.Jr., Ponting, J.D., Sanshuck, D.W., Jackson, R. i Mihara, K. (1981). Factors affecting death of yeast by sulfur dioxide. *J. Food Protec.*, 44, 92-97.

King, S.W. i Beelman, R.B. (1986). Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 37, 53-60.

Kirsop, B.H. (1982). Developments in beer fermentation. *Top. Enzyme. Ferment. Biotechnol.*, 6, 79-131.

Kitano, K., Sato, M., Shimazaki, T. i hara, S. (1984). Occurrence of wild killer yeasts in Japanese wineries and their characteristics. *J. Ferment. Technol.*, 62, 1-6.

Kitano, K., Totsuka, A. i Goto, S. (1987). dsRNA plasmid-encoded killer phenomenon in the genus *Kloeckera*. En Proceedings of the Annual meeting of the Japanese Society of Fermentation Technology (Osaka, 1987), pp. 341.

Klopping, H.L. i Delp, H.L. (1980). 2-cyano-N-{(ethylamino)carbonyl}-2-(methoxyimino)acetamide, a new fungicide. *J. Agric. Food. Chem.*, 28, 467-468.

Ko, C.H., Liang, h. y Gaber, R.F. (1993). Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cellular Biology*, 13, 638-648.

Kopperschlager, G. i Hoffmann, E. (1969). Uber multiple formen der hexokinase in hefe. *Europ. J. Biochem.*, 9, 419-423.

Kruckeberg, A.L. i Bisson, L.F. (1990). The HXT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high affinity glucose transport. *Molecular and Cellular Biology*, 10, 5903-5913.

Kunkee, R.E. (1984). Selection and modification of yeast and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiol.*, 1, 315-332.

Kunkee, R.E. (1990). Some relationships between the strain of wine yeast and its tolerance to ethanol or to other products of alcoholic fermentation. En Actualities OEnologiques 89, P. Ribéreau-Gayon and A. Lonvaud, Eds., 238-242. Paris: Dunot.

Kunkee, R.E. (1991). Relationship between nitrogen content of must and sluggish fermentation. En *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines*. (Seattle, WA, 1991), edited by J. Tantz, pp. 148-155. Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture.

Kunkee, R.E. i Bisson, L.F. (1993). Wine-making yeasts. En *The yeasts*, 2nd ed., Vol. 5, A.H. Rose i J.S. Harrison, Eds., pp. 69-127. London: Academic Press.

Kunkee, R.E., Guymon, J.F. i Crowell, E.A. (1966). Formation of n-propyl alcohol by cell-free extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.*, 72, 530-536.

Kunkee, R.E., Guymon, J.F. i Crowell, E.A. (1972). Studies of control of higher alcohol formation by yeasts through metabolic inhibition. *1st. Specialized International Symposium on*

Yeasts, A. Kockova-Kratochivilova and E. Minarik. Eds., Bratislava, Slovakia: Publishing House of the Slovak Academy of Sciences.

Lafon-Lafourcade, S. (1980). Wine and brandy. En *Biotechnology*. Ed. H.J.Rehm i G.Reed. pp.81-163. Verlag Chemie, Weinheim, West Germanay.

Lafon-Lafourcade, S. (1983). Wine and brandy. En *Biotechnology, Volume 5. Food and Feed Production with Microorganisms*, ed. H.J. Rehm and G. Reed, pp. 81-163. Weinheim: Verlag Chemie.

Lafon-Lafourcade, S. i Joyeux, A. (1981). Les bactéries acetiques du vin. *Bull. Offic. Internat. Vin*, 54, 803-829.

Lafon-Lafourcade, S. i Ribereau-Gayon, P. (1984). Les alterations des vins par les bacteries acetiques et les bacteries lactiques. *Connaiss. Vigne Vin*, 18, 67-82.

Lafon-Lafourcade, S., Carré, E. i Ribereau-Gayon, P. (1983). Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 874-880.

Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C. i Ribereau-Gayon, P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1246-1249.

Lafon-Lafourcade, S., Larue, F., Brechot, P. i Ribereau-Gayon, P. (1977). Les stéroïdes facteurs de survie des levures au curs de la fermentation alcooliques du moût de raisin. *C.R. Acad. Sc. Paris, Série D*, 284, 1939-1942.

Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A. i Saez, M.J. (1982). Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae* : inactivation of the sugar transport systems. *J. Bacteriol.*, 152, 19-25.

Lang, J.M. i Cirillo, V.P. (1987). Glucose transport in a kinaseless *Saccharomyces cerevisiae* *J. Bacteriol.*, 169, 2932-2937.

Larue, F. i Lafon-Lafourcade, S. (1989). Survival factors in wine fermentation. En *Alcohol toxicity in yeast and bacteria*, ed. N. van Uden, pp 193-215, Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.

Larue, F., Lafon-Lafourcade, S. i Ribéreau-Gayon, P. (1980). Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 808-811.

Leão, C. i van Uden, N. (1984a). Effect of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.*, 26, 403-405.

Leão, C. i van Uden, N. (1984b). Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 774, 43-48.

Leão, C. i van Uden, N. (1985). Effects of ethanol and others alkanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 359-363.

Lewis, D.A. i Bisson, L.F. (1991). The HXT1 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is a new member of the family of hexose transporters. *Molecular and cellular Biology*, 11, 3804-3813.

Lobo, Z. i Maitra, P.K. (1977). Resistance to 2-deoxyglucose in yeast: a direct selection of mutants lacking glucose-phosphorylating enzymes. *Molecular and General Genetics*. 157, 297-300.

Lorezn, R.T., Rodriguez, R.J., Lewis, T.A. i Parks, I.W. (1986). Characteristics of sterol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacterol.*, 167, 981-985.

Lutsdorf, V. i Megnet, R. (1968). Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 126, 933-944.

Lloyd, D., Kristensen, B. i Degn, H. (1983). Glycolysis and respiration in yeasts: The effect of ammonium ions studied by mass spectroscopy. *Journal of General Microbiology*, 129, 2125-2127.

Malfeito-Ferreira, M., Miller-Guerra, J.P. i Loureiro, V. (1990). Proton extrusion as an indicator of the adaptative state of yeast starters for the continuous production of sparkling wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 219-222.

Manachini, P.L. i Spencer, J.F.T. (1989). The obscure mystery of alcoholic fermentation. 7th Int. Symp. on Yeasts. John Wiley & Sons ed.

Marshall, W.D. (1977). Thermal decomposition of Ethylenebis-dithiocarbamate fungicides to Ethylenethiourea in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 2, 357-361.

Martínez, J., Millan, C. i Ortega, J.M. (1989). Growth of natural flora during the fermentation of inoculated musts from "Pedro Ximénez" grapes. *South Afr. J. Enol. Vitic.*, 10, 31-35.

Mateo, J.L., Jiménez, M., Huerta, T. i Pastor, A. (1991). Contribution of different yeasts isolated from must of Monastrell grapes to aroma of wines. *Intern. J. Food Microbiol.*, 14, 153-160.

Maujean, A. (1989). Goûts anormaux dans les moûts et les vins en relation avec la présence de produits soufrés volatils. 4ème Symposium International des Métiers de la Vigne et du Vin: odeurs et goûts anormaux des Vins (non liés aux maladies microbiennes classiques), Forum oenologie, Macon, 25-26 Avril.

Mauricio, J.C., Guijo, S. i Ortega, J.M. (1991). Relationship between phospholipid and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 4, 301-308.

Mauricio, J.C., Moreno, J., Medina, M. i Ortega, M. (1986). Fermentation of Pedro Ximénez musts at various temperatures and different degrees of ripeness. *Belgian J. Food Chem. Biotechnol.*, 41, 71-76.

McCusker, J.H., Perlin, D.S. i Haber, J.E. (1987). Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Cell. Biol.*, 7, 4082-4088.

McDonald, J., Reeve, F.T.V., Ruddlesden, J.D. i White, F.H. (1984). Current approaches to brewery fermentations. *Prog. Indus. Microbiol.*, 19, 1-197.

Meredith, S.A. i Romano, H. (1977). Uptake and phosphorylation of 2-deoxy-D-glucose by wild type and respiration-deficient bakers' yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 497, 745-759.

Middelbeek, E.J., Hermans, J.M.H. i Stumm, C. (1979). Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antoine van Leeuwenhoek*, 45, 437-450.

Minarik, E. (1979). Les pesticides et leur influence sur la fermentation. Intl. Congress on Microbiology in Food Industries, APRIA, 7-12 oct., Comptes-rendus, 65-84.

Minarik, E. i Regala, P. (1975). L'action sélectionnante des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins de cuve. 4ème Symposium d'oenologie international Valence. 212-237.

Mitchel, D.J., Bevan, E.A. i Herring, A.J. (1973). The correlation between dsRNA in yeast and "killer character". *Heredity*, 31, 133-134.

Monk, P. i Cowley, P.J. (1984). Effect of nicotinic acid and sugar concentration of grape juice and temperature on accumulation of acetic acid during yeast fermentation. *J. Ferment. Technol.*, 62, 515-521.

Monk, P.R. (1982). Effect of nitrogen and vitamin supplements on yeast growth and rate of fermentation of Rhine Riesling grape juice. *Food Tech. Australia*, 34, 328-332.

Monk, P.R. i Costello, P.J. (1984). Effect of ammonium phosphate and vitamin mixtures on yeast growth in preserved grape juice. *Food Technol. in Australia*, 36, 25-28.

Monteil, H., Blazy-Maugen, F. i Michel, G. (1986). Influence des pesticides sur la croissance des levures des raisins et des vins. *Sciences des Aliments*, 6, 349-360.

Monteiro, F.F. i Bisson, L. (1991). Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 47-57.

Moore, K.J., Johnson, M.G. i Morris, J.R. (1988). Indigenous yeast microflora on Arkansas White Riesling (*Vitis vinifera*) grapes and in model must systems. *J. Food Science*, 53, 1725-1728.

Mora, J. i Mulet, A. (1991). Effects of some treatments of grape juice on the population and growth of yeast species during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 133-136.

Mora, J., Barbas, J.I. i Mulet, A. (1990). Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* i *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 156-159.

Moreno, J. (1983). El control de la temperatura de la fermentación. *Sem. Vitivi.*, 1903, 680-687.

Munoz, E. i Inglediew, W.M. (1989a). An additional explanation for the promotion of a more rapid complete fermentation by yeast hulls. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 40, 61-64.

Munoz, E. i Inglediew, W.M. (1989b). Effect of yeast hulls on stuck and sluggish fermentations: Importance of the lipids component. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1560-1564.

Munoz, E. i Inglediew, W.M. (1990). Yeast hulls in wine fermentations - a review. *J. Wine Research.*, 1, 197-210.

Muratsubaki, H. i Katsume, T. (1979). Distribution of hexokinase isoenzymes depending upon carbon source in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Research Commun.*, 86, 1030-1036.

Nabais, R.C., Sa-Correia, I., Viegas, C.A. i Novais, J.M. (1988). Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2439-2446.

Nair, N.G. (1985). Fungi associated with bunch rot of grapes in the Hunter Valley. *Austr. J. Agric. Research*, 36, 435-442.

Navarro, J.M. i Durand, G. (1978). Alcoholic fermentation: Effect of temperature on ethanol accumulation in yeast cells. *Ann. Microbiol.*, 129B, 215-224.

Navarro, S. i Navarro, G. (1989). Plaguicidas en enologia: problemática de sus residuos y de su control. *Viticultura y Enologia*, 5, 26-33.

Nehlin, J.O., Calberg, M. y Ronne, H. (1989). Yeast galactose permease is related to yeast and mammalian glucose transporters. *Gene*, 85, 313-319.

Neigeborn, L. y Carlson, M. (1984). Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 115, 247-253.

Neuberg, C. (1946). The biochemistry of yeast. *Ann. Rev. Biochem.*, 15, 435-474.

Nevado, J., Navarro, M.A. i Heredia, C.F. (1994). Transport of hexoses in yeast. Re-examination of the sugar phosphorylation with a new experimental approach. *Yeast*, 10, 59-65.

Nordström, K. (1962). Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. III. Participation of coenzyme A. *J. Inst. Brew.*, 68, 398-407.

- Nordström, K.** (1963). Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. IV. Metabolism of acetyl-coenzyme A. *J. Inst. Brew.*, 69, 142-153.
- Nordström, K.** (1964). Formation of esters from acids by brewer's yeast. IV.-Effect of higher fatty acids and toxicity of lower fatty acids. *J. Inst. Brew.*, 70, 233-242.
- Nordström, K.** (1965). Possible control of volatile ester formation in brewing. *Proc. Euro. Brew. Conv.* 10th. Congress, Stockholm, Sweden, pp. 195-208.
- Nykänen, L.** (1986). Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 37, 84-96.
- Otero, D., Mañas, J.L. i Dominguez, J.** (1993). Efecto de residuos antibióticos sobre poblaciones levaduriformes. Su incidencia en la calidad del vino (1). *Vitivinicultura*, 5-6, 35-39.
- Ough, C.S.** (1964). Fermentation rates of grape juice. I. Effects of temperature and composition on white juice fermentation rates. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 15, 167-177.
- Ough, C.S.** (1966a). Fermentation rates of grape juice. II. Effects of initial Brix, pH and fermentation temperature. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 17, 20-26.
- Ough, C.S.** (1966b). Fermentation rates of grape juice. III. Effects of initial ethyl alcohol, pH and fermentation temperature. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 17, 74-81.
- Ough, C.S. i Groat, M.L.** (1978). Particle nature, yeast strain and temperature interactions of the fermentation rates of grape juice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 881-885.
- Ough, C.S. i Lee, T.H.** (1981). Effect on vineyard nitrogen fertilization level on the formation of some fermentation esters. *Am. J. Enol. Vitic.*, 32, 125-127.
- Ough, C.S., Davenport, M. i Joseph, K.** (1989). Effects of certain vitamins on growth and fermentation rate of several commercial active dry wine yeasts. *Amer. J. Enol. Vitiv.*, 40, 208-213.
- Ough, C.S., Kunkee, R.E., Vilas, M., Bordeu, E. i Huang, M.C.** (1988). The interaction of sulfur dioxide, pH and dimethyl bicarbonate on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet and *Leuconostoc oenos*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39, 279-282.

Oura, E. (1973). Some aspects of the growth of baker's yeast. *Proc. 3rd. Intl. Spec. Symp. on yeast*. Helsinki, Finland, Part II, pp. 215-230.

Özcan, S. i Johnston, M. (1995). Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transport (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biology*, 15, 1564-1572.

Özcan, S., Schulte, F., Freidel, K., Weber, A. i Ciriacy, M. (1994). Glucose uptake and metabolism in *grr1/cat80* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Euro. J. Biochem.*, 224, 605-611.

Palfree, R.G.E. i Bussey, H. (1979). Yeast killer toxins: purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *Europ. J. Biochem.*, 93, 487-493.

Pamment, N.B. (1989). Overall kinetics and mathematical modeling of ethanol inhibition in yeasts. En *Alcohol Toxicity in Yeast and bacteria*, N. van Uden, Ed., pp 1-75. Boca Raton, FL: CRC Press.

Pampulha, M.E. i Loureiro, V. (1989). Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotec. Letters*, 11, 269-274.

Panchal, Ch.J. i Stewart, G.G. (1982). The influence of media conditions on the utilisation of monosaccharides by a strain of *Saccharomyces uvarum* (*Carlsbergensis*). *J. Inst. Brew.*, 88, 86-89.

Paquin, C.E. i Williamson, V.M. (1986). The insertion at two loci account for most of the spontaneous antimycin A resistance mutations during growth at 15°C of *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking ADHI. *Molec. Cell. Biol.*, 6, 70-79.

Pasteur, L. (1866). Études dur le vin. Ed. Paris. 14. Reglement C.E.E. n° 822/87. Annexe I.

Pena, A., Cinco, G., Gome-Puyon, A. i Tuena, M. (1972). Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 153, 413-425.

Pfeiffer, P. i Radler, F. (1982). Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J. General Microbiol.*, 128, 2699-2706.

- Pinto, I., Cardoso, H., Leao, C. i van Uden, N.** (1989). High enthalpy and low enthalpy death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by acetic acid. *J. Biotech. Bioeng.*, 33, 1350-1352.
- Pirisi, F.M., Meloni, M., Cabras, P., Bionducci, M.R. i Serra, A.** (1986). Degradation of dicarboximidic fungicides in wine. Part II: Isolation and identification of the major breakdown products of Chlorzolate, Vinclozolin, and Procymidone. *Pestic. Sciences.*, 17, 109-118.
- Polakis, E.S. i Bartley, W.** (1965). Changes in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. *Biochem. J.*, 97, 284-297.
- Polakis, E.S., Bartley, W. i Meek, G.A.** (1965). Changes in respiratory enzymes during the aerobic growth of yeast on different carbon sources. *Biochem. J.*, 97, 298-302.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W.A. i van Dijken, J.P.** (1989). Enzymatic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Environ. Micro.*, 55, 468-477.
- Puisais, J.** (1983). Vinification en rouge. *Rev. Franç. Enol.*, 88, 5-15.
- Radler, F.** (1988). Aspects of the metabolism of lactic bacteria. En "Application à l'oenologie des progrès récents en microbiologie et en fermentation". Ed. Office International de la Vigne et du Vin (Commission des Communautés européennes. Programme COMETT). Paris.
- Radler, F. i Knoll, C.** (1988). Formation of killer toxin by apiculate yeasts and interference with fermentation. *Vitis*, 27, 111-132.
- Radler, F. i Schmitt, M.** (1987). Killer toxins of yeasts: inhibitors of fermentation and their adsorption. *J. Food Protection*, 50, 234-238.
- Rankine, B.C.** (1967). Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste thresholds. *J. Sci. Food Agric.*, 18, 583-589.
- Rapp, A. i Versini, G.** (1991). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. En *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines*. (Seattle, WA, 1991), ed. by J. Rantz, pp. 156-164. Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture.

Rauhut, D. (1989). Trace analysis of sulphurous off-flavours in wine caused by extremely volatile S-containing metabolites of pesticides e.g. Orthene. 4ème Symposium International d'Oenologie, Bordeaux, 15-17 Juin. Comptes-rendus, DUNOD, 482-487.

Reed, G. i Nagodawithana, T.W. (1988). Technology of yeast usage in wine making. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 39, 83-90.

Reglament CEE (1988). Liste des pratiques et traitements oenologiques autorisés. R(CEE) 2253/88, Anex VI, pp. 10-13.

Reifenberger, E. i Ciriacy, M. (1995). Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters. *Mol. Microbiol.*, 16, 157-167.

Reifenberger, E., Friedel, k. i Cidaricy, M. (1995). Functions of multiple hexose transporters (HXT). *Yeast*, 11, S467.

Revel, G., Bertrand, A. i Lonvaud-Funel, A. (1989). Synthèse des substances acétoïniques par *Leuconostoc oenos*. Réduction du diacétyle. *Conn. Vigne Vin*, 1, 39-45.

Rhodes, N., Morris, C.N., Ainsworth, S. i Kinderlerer, J. (1986). The regulatory properties of yeast pyruvate kinase. *Biochem. J.*, 234, 705-715.

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E. i Lafon, M. (1956a). Investigations on the origin of sectionary products of alcoholic fermentation, Part I. *Am. J. Enol.*, 7, 53-61.

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E. i Lafon, M. (1956b). Investigations on the origin of sectionary products of alcoholic fermentation, Part II. *Am. J. Enol.*, 7, 112-118.

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. i Sudraud, P. (1989). En Ciencias y técnicas del vino. Tomo III. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.

Ribéreau-Gayon, J., Ribéreau-Gayon, P. i Seguin, G. (1980). *Botrytis cinerea* in enology. En *The Biology of Botrytis*, ed. J.R. Coley-Smith, K. Verhoeff i W.R. Jarvis, pp. 251-274. New York: Academic Press.

Ribéreau-Gayon, P. (1985). New developments in wine microbiology. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 36, 1-10.

Ribéreau-Gayon, P., Lafon-Lafourcade, S. i Bertrand, A. (1975). Le debourbage des mouts de vendange blanche. *Conn. Vigne Vin*, 2, 117-139.

Rieger, M., Kapelli, O. i Fiechter, A. (1983). The role of limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Micro.*, 129, 653-661.

Rodriguez, R.J., Low, C., Bottema, C.D.K. i Parks, W.L. (1985). Multiple functions for sterol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 837, 336-343.

Roon, R.J., Larimore, F. i Levy, J.S. (1975). Inhibition of amino acid transport by ammonium ion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 124, 325-331.

Roon, R.J., Levy, J.S. i Larimore, F. (1977a). Negative interactions between amino acid and metil amine/ammonia transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 252, 3599-3604.

Roon, R.J., Meyer, G.M. i Larimore, F.S. (1977b). Evidence for a common component in kinetically distinct transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Gen. Genetics*, 158, 185-191.

Rose, A.H. i Pilkington, B.J. (1989). Sulphite. En *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, ed. G.W. Gould, pp. 201-216. London: Elsevier.

Rouzaud, L. i Verdier, M.L. (1988). Les résidus de herbicides dans le vignoble. Notes de séance 12ème SITEVI, Causerie technique. *Progrès Agricole et Viticole*, 105, 4, 97-102.

Rozes, N., Cuzane, B., Larue, F. i Ribéreau-Gayon, P. (1988). Incidence sur la fermentation alcoolique d'une supplementation du moût de raisin en sulfate d'ammonium. *Conn. Vigne Vin*, 22, 2, 163-167.

Rozes, N., Larue, F. i Ribéreau-Gayon, P. (1988). Effect of variation of grape must temperature on the fermentative ability and the neutral lipid content of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Letters*, 10, 11, 821-824.

Sá-Correira, I, Salgueiro, S.P., Viegas, C.A. i Novais, J.M. (1989). Leakage induced by ethanol, octanoic and decanoic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast, Seventh International Symposium on yeasts*. Abril, S123-S127.

Sablayrolles, J.M. i Barre, P. (1989). Automated control of the temperature during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Scie. Aliments*, 9, 239-251.

Sablayrolles, J.M., Barre, P. i Grenier, P. (1987). Design of a laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnol. Techol.*, 1, 181-184.

Sablayrolles, J.M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.L. i Barre, P. (1996). Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 4, 377-381.

Salmon, J.M. (1989). Effect of sugar transport inactivation on sluggish and stuck oenological fermentation. *Appl. and Environ. Microbio.*, 55, 953-958.

Salmon, J.M., Vincent, O., Mauricio, J.C., Bely, M. i Barre, P. (1993). Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 1, 56-64.

Sapis-Domerq, S. (1980). Étude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vins. Experimentation 1978 - 1979. Comparaison avec les résultats de 1975, 1976 et 1977. *Conn. Vigne Vin.*, 14, 3, 155-181.

Sapis-Domerq, S., Bertrand, A., Joyeux, A., Lucmaret, V. i Sarre, C. (1978). Etude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vins. Expérimentation 1977. Comparaison avec les résultats de 1976 et 1975. *Conn. Vigne Vin*, 12, 4, 245-275.

Sapis-Domerq, S., Bertrand, A., Mur, F. i Sarre, C. (1976). Influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore levurienne. *Conn. Vigne Vin*, 10, 4, 369-389.

Sapis-Domerq, S., Bertrand, A., Mur, F. i Sarre, C. (1977). Influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore levurienne. Expérimentation 1976. *Conn. Vigne Vin*, 11, 3, 227-242.

Schimz, K.L. (1980). The effect of sulfite on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Archiv. Microbiol.*, 125, 89-95.

Schmitt, H.D., Ciriacy, M. i Zimmermann, F.K. (1983). The synthesis of yeast pyruvate decarboxylase is regulated by large variations in the messenger RNA level. *Molec. Gen. Genetics*, 192, 247-252.

Schopper, J.F. (1978). La rémanence des produits de traitement viticole antifongique et leur influence sur la vinification. *Ann. Technol. Agric.*, 27, (1), 383-393.

Schreier, P. (1979). Flavour composition of wines: a review. *CRC Critical reviews in Food Science and Nutrition*. pp. 59-111.

Schütz, M. i Gafner, J. (1995). Lower fructose uptake capacity of genetically characterized strains of *Saccharomyces bayanus* compared to strains of *Saccharomyces cerevisiae*: a likely cause of reduced alcoholic fermentation activiti. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 2, 175-180.

Seeboth, P.G., Bohnsack, K. i Hollenberg, C.P. (1990). *pdcl*⁰ Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* give evidence for an additional structural PDC gene: Cloning of PDC5, a gene homologous to PDC1. *J. Bacteriol.*, 172, 678-685.

SentheShanmuganathan, S. (1960a). The mechanism of formation of higher alcohol from amino acids by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 74, 568-576.

SentheShanmuganathan, S. (1960b). The purification and properties of the tyrosine-2-oxoglutarate transaminase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 77, 619-625.

Serrano, R. (1978). Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Cell. Biochem.*, 22, 51-63.

Serrano, R. i DelaFuente, G. (1974). Regulatory properties of the constitutive hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.*, 5, 161-171.

Sharf, R. i Margalith, P. (1983). The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 17, 311-313.

Sharma, S. i Tauro, P. (1986). Control of ethanol production by yeast: Role of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase. *Biotech. Letters*, 8, 735-738.

Shimazu, Y. i Watanabe, M. (1981). Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must fermentation. *J. Ferment. Tech.*, 59, 27-32.

Shimizu, K., Adachi, T., Kitano, K., Shimazaki, T., Totsuka, A., Hara, S. i Dittrich, H.H. (1985). Killer properties of wine yeasts and characterization of killer wine yeasts. *J. Ferment. Technol.*, 63, 421-429.

Singh, R. i Kunkee, R.E. (1977). Multiplicity and control of alcohol dehydrogenase isoenzymes in various strains of wine yeasts. *Arch. Microbiol.*, 114, 255-259.

Slaughter, J.C. i Housden, S.J. (1978). Effect of ammonium ion on the production of ethanol and higher alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, VIth International Specialised Symposium on Yeasts, Montpellier, SII 7-8.

Slaughter, J.C., Smith, J.P. i Mitchell, W.J. (1991). Glucose transport throughout fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1108. *Lett. Appl. Microbiol.*, 12, 221-223.

Smits, H.P., Smits, G.J., Postma, P.W., Walsh, M.C. i van Dam K. (1996). High-affinity glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* is not dependent on the presence of glucose-phosphorylating enzymes. *Yeast*, 12, 439-447.

Soles, R.M., Ough, C.S. i Kunkee, R.E. (1982) Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 33, 94-98.

Sols, A. (1981). Multimodulation of enzyme activity. *Curr. Topics Cell. Regul.*, 19, 77-101.

Soumalainen, H. i Keranen, A.J.A. (1967). Ketoacids formed by baker's yeast. *J. Ints. Brewing*, 73, 477-484.

Sponholz, W.R. (1991). Nitrogen compounds in grapes, must and wine. En *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines*. (Seattle, WA, 1991), edited by J. Tantz, pp. 68-77. Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture.

Stamer, W.T., Ganter, P., Aberdeen, V., Lachance, M.A. i Phaff, H.J. (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Canadian J. Microbiol.*, 33, 783-796.

Strehaiano, P. (1993). Les arrêts de fermentation: causes et facteurs. Données physiologiques. *R. F. OE.*, 140, Mars-Avril, 41-47.

Suarez, J.A. i Iñigo, B. (1990). Microbiología Enológica. Fundamentos de vinificación. Ed. Mundi-Prensa, 28001 Madrid.

Sudraud, P. i Chauvet, S. (1985). Activité antilevure de l'anhydride sulfureux moléculaire. *Conn. Vigne Vin*, 19, 31-40.

Sugisaki, Y., Gunge, N., Sakaguchi, K., Yamasali, M. i Tamura, G. (1984). Characterization of a novel killer toxin encoded by a double-stranded linear DNA plasmid of *Kluyveromyces lactis*. *Europ. J. Biochem.*, 141, 241-245.

- Sun, G.Y. i Sun A.Y.** (1985). Ethanol and membrane lipids. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 9, 164-180.
- Suzzi, G. i Romano, P.** (1982). Induced changes by SO₂ on the population of *Saccharomyces* as agents of the natural fermentation of musts. *Vini d'Italia*, 24, 138-145.
- Theodoris, G., Fong, N.M. Coons, D.M. i Bisson, L.F.** (1994). High-copy suppression of glucose transport defects by HXT4 and regulatory elements in the promoters of the HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 137, 957-966.
- Thomas, D.S. i Rose, A.H.** (1979). Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid compositions. *Arch. Microbiol.*, 122, 49-55.
- Thornton, R.J.** (1986). Genetic characterization of New Zealand and Australian wine yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 52, 97-113.
- Thoukis, G.** (1958). The mechanism of isoamyl alcohol formation using tracer techniques. *Am. J. Enol.*, 9, 161-167.
- Tschopp, J.F., Emr, S.D., Field, C. i Schekman, R.** (1986). GAL2 codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 166, 313-318.
- Vallejo, C.G. i Serrano R.** (1989). Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase. *Yeast*, 5, 307-319.
- van Steveninck, J.** (1969). The mechanism of transmembrane glucose transport in yeast: evidence for phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 130, 244.
- van Uden, N.** (1985). Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. *Ann. Rep. Ferm. Proc.*, 8, 11-58.
- van Uden, N.** (1989). Effect of alcohols on the temperature relations of growth and death in yeasts. En *Alcohol toxicity in Yeasts and Bacteria*, ed. by van Uden, pp. 77-88. Boca Raton: CRC Press Inc.
- van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W.A. i van Dijken J.P.** (1989). Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 135, 2399-2406.

van Urk, H.P., Mak, P.R., Scheffers, W.A. i van Dijken, J.P. (1988). Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 i *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess. *Yeast*, 4, 283-292.

van Vuuren, H.J.J. i Jacobs, C.J. (1992). Killer yeasts in the wine industry: a review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 2, 119-128.

van Vuuren, H.J.J. i Wingfield, B.D. (1986). Killer yeasts -cause of stuck fermentations in a wine cellar. *South Afric. J. Enol. Vitic.*, 7, 113-118.

Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A. i van Dijken, J.P. (1990). Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Micro.*, 136, 359-403.

Viegas, C.A., Rosa, M. F., Sá-Correira, I. i Novais, J. M. (1988). Inhibiton of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Appl. Env. Microbiol.*, 54, 2091-2095.

Vos, P.J.A., Crous, E. i Swart L. (1980). Fermentation and the optimal nitrogen balance of must. *Wunboer*, 582, 58-62.

Vos, P.J.A., Zeeman, W. i Heymann, H. (1978). The effect on wine quality of diammonium phosphate additions to must. *Proc. S. Afric. Soc. Enol. Vitic.*, Stellenbosch, South Africa: 87-104.

Vos, P.J.A., Zeeman, W. i Heymann, H. (1979). The effect on wine quality of di-ammonium phosphate additions to must. *Proc. South African Enol.*, 87-104.

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

Wainwright, T. (1971). Production of H₂S by wine yeast: Role of nutrients. *J. Appl. Bacteriol.*, 34, 161-171.

Wales, D.S., Cartledge, T.G. i Lloyd, D. (1980). Effects of glucose repression and anaerobiosis on the activities and subcellular distribution of tricarboxylic acid cycle and associated enzymes in *Saccharomyces calbergensis*. *J. Gen. Microbiol.*, 116, 93-98.

Walsh, M.C., Smits, H.P., Scholte, M. i van Dam, K. (1994). Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. *J. Bacteriol.*, 176, 953-958.

Walton, J.D., Paquin, C.E., Kaneko, K. i Williamson, V.M. (1986). Resistance to Antimycin A in yeast by amplification of ADH4 on a linear, 42 kb palindromic plasmid. *Cell*, 46, 857-863.

Webb, A.D. i Ingraham, J.L. (1963). Fusel oil. *Adv. App. Micro.*, 5, 317-353.

Wendell, D.L. i Bisson, L.F. (1993). Physiological characterization of putative high-affinity glucose transport protein HXT2 of *Saccharomyces cerevisiae* by use of anti-synthetic peptide antibodies. *J. Bacteriol.*, 175, 7689-7696.

Wenzel, K., Dittrich, H.H. i Bohnert, J. (1980). Schwefelrückstände auf Trauben und im Most und ihr einfluß auf die H₂S-bildung. *WeinWeis*, 35, 6, 414-420.

Weusthuis, R.A., Pronk, J.T., van den Broek P.J.A. i van Dijken, J.P. (1994). The chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. *Microbiol. Review*, 58, 616-630.

Whiting, G.C. (1976). Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages: A review. *J. Inst. Brewing*, 82, 84-92.

Williams, P.J., Sefton, M.A. i Wilson, B. (1989). Nonvolatile conjugates of secondary metabolites as precursors of varietal grape flavour components. *Flavour chemistry trends and developments*; symposium at the third chemical congress of North America (195th national meeting of the American Chemical Society, Toronto, Ontario, Canada, 5-11 June 1988) ed. by R. Teranishi, R.G. Buttery and Shahidi. pp. 35-48. Washington, DC: American Chemical Society.

Yokomori, Y., Akiyama, H. i Shimizu, K. (1988a). Toxins of wild *Candida* killer yeast with a novel killer property. *Agric. Biologic. Chem.*, 52, 2797-2801.

Yokomori, Y., Akiyama, H. i Shimizu, K. (1988b). Isolation of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer property. *Agric. Biologic. Chem.*, 52, 2791-2796.

Yoshimo, M. i Murakami, K.L. (1982). AMP deaminase reaction as a control system of glycolysis in Yeast: Activation of phosphofructokinase and pyruvate kinase by the AMP deaminase ammonia system. *J. Biol. Chem.*, 257, 2822-2828.

Youngs, A. i Rose, A.H. (1990). Sterol uptake by anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.*, 5, 459-463.

Zambonelli, C. (1988). La formazioe di idrogeno solforado nel corso della fermentazione alcolica. Seminario su: Olori e sapori dei vini. Rassegna Economica della Provincia di Alessandria, 3. Supplemento 4, 29-31.

Zambonelli, C., Romano, P. i Suzzi, G. (1989). Microorganisms of wine. En *Biotechnology Applications in Beverage Production*, Ed. C. Cantarelli i G. Lanzarini, pp. 17-30. London: Elsevier Applied Science.

Zironi, R., Marchetti, R., Flori, P., Stanzani, R. i Roberti, R. (1981). Influenza degli antibiotritici Vinchlozolin, Iprodione e Procimidone sulla maturazione delle uve e sulle caratteristiche dei vini. *La Difesa delle Piante*, 5, 281-298.

Zorg, J., Killian, S. i Radler, F. (1988). Killer toxin producing strains of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* i *Pichia kluyveri*. *Arch. Microbiol.*, 149, 261-267.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA

**ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA DEL COURE I LA
DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA
FERMENTATIVA I EL METABOLISME DE**
Saccharomyces cerevisiae



Memòria presentada per
MARIA FRANCESCA FORT MARSAL
per optar al grau de Doctora en Ciències Químiques
sota la Direcció del Dr. Lluís Arola Ferrer i del Dr. Fernando Zamora Marín

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

1. Determinar els nivells màxims dels pesticides d'ús més comú en el conreu de la vinya que podem trobar en el most, i fer un seguiment dels mateixos al llarg del procés de la vinificació.
2. Estudiar l'efecte de la presència d'aquestes concentracions màximes de plaguicides sobre la cinètica fermentativa, per seleccionar-ne aquells que veritablement poden afectar la fermentació
3. Comprovar si la via metabòlica de la fermentació alcohòlica es veu afectada per la presència dels productes fitosanitaris seleccionats.
4. Verificar si els mecanismes de transport de sucres poden estar afectats per l'acció d'aquests pesticides.
5. Analitzar els vins obtinguts en presència dels plaguicides seleccionats, amb la finalitat de comprovar si la seva composició química està alterada per l'efecte d'aquests productes fitosanitaris.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

RESULTATS I DISCUSSIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

CAPÍTOL 1

1. INFLUÈNCIA DELS TRACTAMENTS FITOSANITARIS, SENSE RESPECTAR ELS PERÍODES DE SEGURETAT, SOBRE LA PRESENCIA DE PESTICIDES EN EL MOST. EFECTE DE LA VINIFICACIÓ SOBRE L'EVOLUCIÓ DELS NIVELLS DE PESTICIDES.

1.1. INTRODUCCIÓ

La lluita contra els paràsits i les malalties de la vinya és actualment, una de les principals preocupacions dels viticultors de cara a preservar la qualitat i la quantitat de les seves collites (Carbonel-Grinbaum, 1989; Dominguez, 1993). No obstant, aquests pesticides poden romandre presents en el vi i afectar la seva qualitat organolèptica i el que és més important, poden afectar la salut dels consumidors (Gnaegi i col., 1983; Cabanis i col., 1991; Otero i col., 1994).

La presència de pesticides també pot estar associada als alentiments i aturades de fermentació (Girond i col., 1989; Larue, 1991; Otero i col., 1993) i als problemes que presenta la fermentació malolàctica (Sarpis-Domercq, 1980). En el cas particular dels tractaments amb sals cúpriques, s'ha de considerar el problema addicional de l'aparició de precipitats cúprics en el vi (Hsia i col., 1975).

Generalment s'accepta que l'ús correcte de pesticides no causa problemes, perquè els seus nivells en el vi són inferiors a les dosis legals (Garcia-Cazorla i col. 1994). No obstant, quan no es respecta el període de seguretat entre l'aplicació del darrer tractament i la verema, els trobem en elevats nivells en el most, comportant considerables pèrdues econòmiques si els nivells mesurats sobrepassen els límits permesos per la llei (Cabanis i col., 1991).

Avui en dia, la necessitat d'una legislació internacional que reguli els límits de residus de pesticides ha esperonat a la "Sub-Comissió for the Unification of Analysis Methods and Appreciaton of Wines" (Office International de la Vigne et du Vin, OIV) a estudiar la possibilitat d'establir els màxims nivells permesos d'aquestes substàncies en el vi (OIV, 1995).

L'objectiu d'aquest capítol és estudiar els nivells màxims possibles d'alguns dels pesticides d'ús més comú en viticultura -tant en most com en vi- en el cas extrem que no es respectin els períodes de seguretat, així com també estudiar la influència derivada de les diferents pràctiques enològiques sobre els esmentats nivells de productes fitosanitaris.

Els pesticides que s'utilitzarem en aquest estudi van ser el metil paration, el fenitotrión, la diclofluanida, el clorpirifos, la procimidona, la iprodiona, la vinclozolina, clozolinat i l'oxiclorur de coure, perquè són els d'ús més freqüent en els tractaments del cuc del raïm (*Lobesia botrana*), el piral (*Sparganothis pilleriana*), el mildiu (*Plasmopara viticola*), la podridura grisa (*Botrytis cinerea*) i l'oïdium (*Uncinula necator*). També es va fer un seguiment de la concentració de coure (com a indicador de la presència d'oxiclorur de coure) i d'alguns metalls relacionats metabòlicament amb ell (ferro, zinc i manganès) (Underwood, 1977; Brady i col., 1994).

Els resultats corresponents a aquest capítol han estat publicats en l'article, "Fate of some Common Pesticides during vinification process", de la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volum 44, nº 11, pàgines 3668-3671.

1.2. MATERIALS I MÈTODES

1.2.1. ELS PESTICIDES

Els pesticides que es van utilitzar en aquest experiment de camp i que es mostren en la Taula 1.4.1a i b, van ser els d'ús més habitual en el conreu de la vinya a Catalunya.

1.2.2. DISSENY EXPERIMENTAL I APLICACIÓ DELS TRACTAMENTS

El present treball es realitzà en els camps experimentals de l'Escola d'Enologia de Tarragona (Universitat Rovira i Virgili) situats en el Mas dels Frares, terme municipal de la vila de Constantí (Tarragona).

Es van utilitzar dues parcel·les, una corresponent a la varietat blanca Macabeu i la segona corresponent a la varietat negra Cabernet Sauvignon. En ambdues parcel·les es practicaren les tècniques vitícoles habituals, el tipus de poda va ser en vas, i es van dividir en quatre subparcel·les (Figura 1.4.1) amb una filera de vinya sense tractar entre cadascuna, per tal de prevenir la contaminació deguda a la superposició de tractaments. La primera subparcel·la va ser la de control, sense tractament. La segona va ser tractada amb quatre pesticides: metilparation, fenitotrión, diclofluanida i clorpirifos. La tercera subparcel·la es tractà amb oxiclorur de coure i a la darrera s'aplicà un tractament a base de vinclozolina, clozolinat, iprodiona i procimidona d'acord amb la Taula 1.4.2.

1.2.3. LA VINIFICACIÓ I PRESA DE MOSTRES

Un cop aplicats els tractaments destinats a cada subparcel·la es deixaren passar dos dies i es procedí a la verema. Les vinificacions de les varietats Macabeu i Cabernet Sauvignon es van realitzar a escala de laboratori, seguint els mètodes habituals tant per la vinificació en blanc com en negre, i s'inocularen 20 g/hl de LSA (llevats secs actius) (*Saccharomyces cerevisiae*, Levuline CHP, suministrada per l'Institute Oenolotechnique de Champagne, soca CIVC 8130).

Les vinificacions i la recollida de mostres es realitzaren d'acord amb els esquemes de les Figures 1.4.2 i 1.4.3 respectivament.

Per cada vinificació s'obtinguren 5 rèpliques a partir de 25 kg de raïm per cadascuna, i ambdues vinificacions es realitzaren a temperatura ambient. Les mostres van ser conservades a -20°C fins al final dels procés, a punt doncs, per ser analitzades. Els resultats es van expressar com la mitjana aritmètica de les 5 rèpliques \pm error tipus.

1.2.4. MÈTODES ANALÍTICS

Els patrons utilitzats van ser suministrats per la casa comercial Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanya), excepte el patró intern (dieltrin), que el suministrarà "l'Institute of Organic Industrial Chemistry" (Annopol, Polònia).

Tots els pesticides orgànics, es determinaren per cromatografia de gasos d'acord amb el mètode descrit per Sala i col., (1996). Abans de l'anàlisi cromatogràfica els compostos van ser sotmesos a una extracció líquid-líquid mitjançant *n*-hexà, utilitzant el dieltrin com a patró intern. L'equip emprat va ser un cromatògraf Hewlett-Packard 5890 sèrie II acoblat a un detector de captura d'electrons. S'utilitzà una columna capilar SPB-5 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μ m), i com a gas portador es va fer servir l'Heli d'alta puresa (pressió de columna 140 kPa). La injecció es realitzà mitjançant el mètode "split" amb una divisió de fluxe de 80 ml/min. Com a gas auxiliar s'utilitzà el nitrògen (45 ml/min). La temperatura de l'injector i el detector van ser de 250 i 350°C respectivament, mentre que la del forn fou una temperatura constant de 210°C.

Els metalls (coure, ferro, zinc i manganés) de les diferents mostres es van analitzar per espectrofotometria d'absorció atòmica de flama (Hitachi Polaritzat Zeeman Model Z-8100), prèvia digestió amb àcid nítric ultrapur (Merk, Damstadt, Alemanya) durant 24 h a 120°C (Akirida-Demertzi i col. 1988).

1.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

No hi han diferències importants entre les cinètiques fermentatives de les mostres procedents de les subparcel·les tractades amb productes fitosanitaris i les mostres procedents de les subparcel·les control, indicant d'aquesta manera que els elevats nivells inicials de pesticides no van inhibir el metabolisme dels llevats sota aquestes condicions de vinificació.

a. Vinificació en blanc

Els resultats del comportament dels pesticides orgànics (metil paration, fenitotrion, diclofluanida, clorpirifos, vinclozolina, clozolinat, procimidona i iprodiona) durant la vinificació en blanc es mostren en la Taula 1.4.3. Tots aquests pesticides decreixen contínuament durant el procés de vinificació, sobretot durant les fases de desfangat i fermentació. Els percentatges de decreixement dels plaguicides estan expressats com a disminució en la fase de vinificació corresponent, referida a la concentració inicial.

En la fase de desfangat el clorpirifos desapareix completament, mentre que els nivells de diclofluanida i de clozolinat cauen considerablement (decreixements del 85 i del 70%, respectivament). Els nivells de fenitotrion i metil paration també disminueixen (decreixements del 40 i del 25%, respectivament). No obstant, tots els pesticides antibotrítics només estan lleugerament influenciats per aquest procés: iprodiona (15%), vinclozolina (13%) i la procimidona (4%).

En la fase corresponent a la fermentació alcohòlica, també es detecta un considerable efecte sobre les concentracions de pesticides. Així doncs, la diclofluanida i el clozolinat cauen pel davall del llindar de detecció al final d'aquest procés. La resta de plaguicides també presenten una marcada caiguda al final de la fermentació alcohòlica: metil paration (77%); fenitotrion (69%); vinclozolina (52%); procimidona (36%) i la iprodiona (35%).

En la resta de fases de la vinificació: la clarificació, l'estabilització i l'esterilització-filtració, els nivells de les matèries actives dels productes fitosanitaris utilitzats, continuen la seva davallada. La diclofluanida, el clorpirifos, el clozolinat, el metil-paration i el fenitotrion, són gairebé indetectables al final de la vinificació. En canvi els ditiocarbamats (vinclozolina, procimidona i iprodiona), que són els plaguicides més estables, apareixen en el vi embotellat a la concentració de 1ppm aproximadament.

El comportament del coure, ferro, zinc i manganès el presentem en la Taula 1.4.4. Al començament del procés de vinificació en blanc, la concentració de coure en les mostres tractades amb el plaguicida inorgànic (oxiclorur de coure), és molt més elevada que en les

mostres control. El decreixement d'aquest metall durant la fase de desfangat no és gaire important (6,7%). Tanmateix, en la fase de fermentació, els alts valors de coure inicials decreixen dràsticament (92%) i al final de la fermentació, aquest metall assoleix valors similars al control.

El decreixement substancial que presenten els nivells de coure pot ser deguda a la capacitat que tenen els llevats per lligar-se i segrestar aquest metall, i sobretot per la capacitat que té el coure per combinar-se amb els compostos sofrosos derivats del metabolisme dels llevats, i posteriorment precipitar junt amb ells (Bidan i col., 1985; Cabras i col., 1995). Pel que fa a la resta de metalls (ferro, zinc i manganés) no s'observen comportaments estadísticament diferents respecte a les mostres control, fet que ens demostra que les elevades concentracions inicials de coure no influeixen les concentracions metabòliques dels esmentats metalls.

b. Vinificació en negre

En termes generals, s'observa que al principi del procés de vinificació els nivells de plaguicides són més elevats en la vinificació en negre que en la vinificació en blanc, probablement degut a la fase de maceració a la que estan sotmesos els vins negres.

En la Taula 1.4.5 presentem els nivells dels pesticides orgànics (metil paration, fenitotrion, diclofluanida, clorpirifos, vinclozolina, clozolinat, procimidona i iprodiona) obtinguts en la vinificació en negre. Tots els pesticides presenten un decreixement continuat en aquest procés de vinificació i és durant la fermentació alcohòlica, quan aquest és fa més evident. En aquest estadi el clorpirifos, la diclofluanida i el clozolinat desapareixen completament, i estan considerablement reduïts el metil paration (88%), el fenitotrion (89%), la vinclozolina (80%) i la procimidona (59%). Amb un decreixement del 17%, la iprodiona és la menys afectada per la fermentació alcohòlica.

La fermentació malolàctica, la clarificació, l'estabilització i l'esterilització-filtració, continuen reduïnt considerablement els residus de plaguicides encara presents en el vi, són especialment significatius els decreixements d'iprodiona i procimidona (del 50 i del 24%, respectivament).

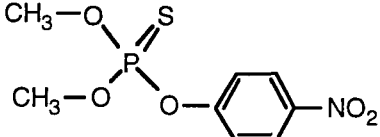
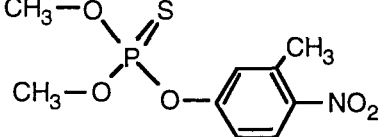

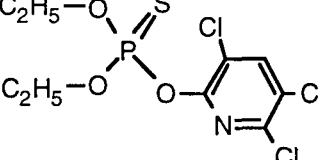
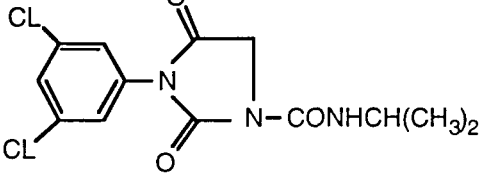
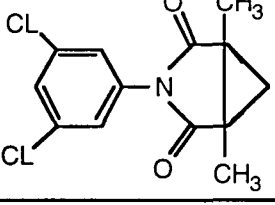
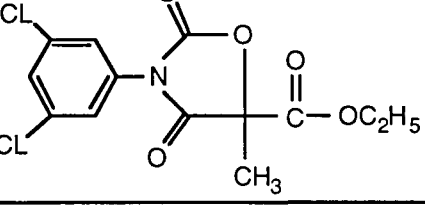
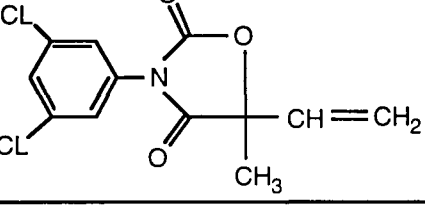
Al final d'aquest procés de vinificació els nivells de diclofluanida, clorpirifos, clozolinat, metil paration i fenitotrion són pràcticament indetectables. En canvi, la procimidona, la vinclozolina i la iprodiona, com en el cas de la vinificació en blanc, persisteixen i apareixen en ampolla a dosis d'aproximadament 1ppm.

En la Taula 1.4.6 presentem els nivells de metalls que trobem en la vinificació en negre, i es pot observar que segueixen els mateixos comportaments que en la vinificació en blanc, comportament que es pot atribuir a les mateixes raons que s'exposaren en la vinificació en blanc.

Tots aquests resultats semblen indicar que la diclofluanida, el clorpirifos, el clozolinat, el metil paration, el fenitotrion i l'oxoclorur de coure desapareixen completament tant en la vinificació en blanc com en negre, fins i tot sinó s'han respectat els períodes de seguretat entre el darrer tractament i la verema. No obstant això, els tres antibiòtics específics (vinclozolina, procimidona i iprodiona) són molt més persistents i la seva presència en vi embotellat, en alguns casos, va sobrepassar les concentracions límit permises per la llei (Cabras i col. 1983; Flori i col. 1990). És per això que amb aquests plaguicides dicarboximídics, s'han de respectar rigorosament les dosis i els períodes de seguretat indicats pel fabricant, si volem mantenir els seus nivells dins dels límits màxims de residus (LMR) permisos per la legislació comunitària.

1.4. TAULES I FIGURES

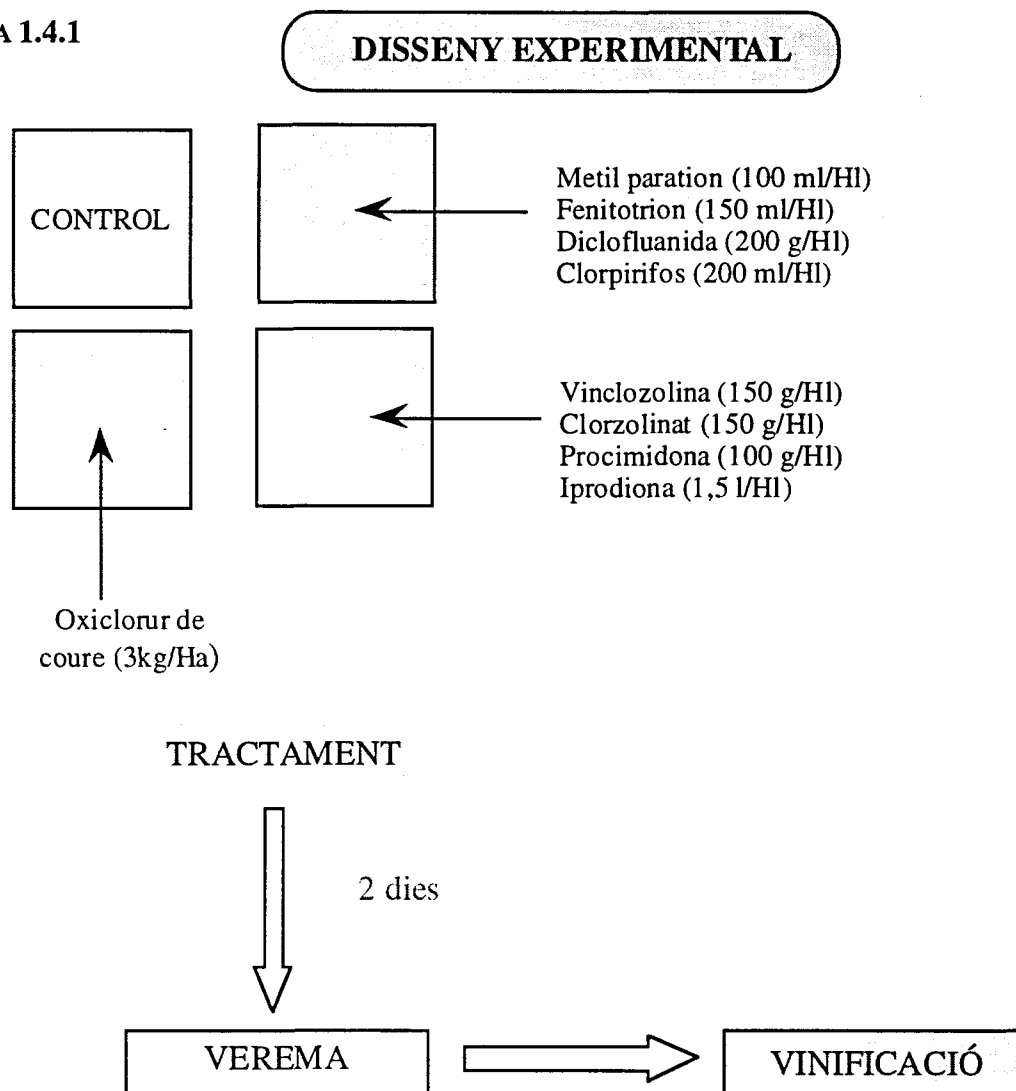
TAULA 1.4.1.a Estructura química i característiques generals dels pesticides utilitzats.

Producte fitosanitari	Fórmules químiques	Dades físico-químiques	% matèria activa	Presentació del producte
Metil paration		Pur: sòlid pf=36-37°C Pràcticament insoluble en aigua i soluble en dissolvents orgànics	35% p/v	Líquid emulsionable
Fenitotrión		Liq. pe.=95/0,01 mm. P.esp.=1,308 Insoluble en aigua i soluble en dissolvents orgànics	50% p/v	Líquid emulsionable
Diclofluanida	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{O}_2\text{S}-\text{N}-\text{S}-\text{CCL}_2\text{F}$ 	Sòlid, pf=107°C Insol. en aigua i sol. en acetona i xilol Pv=1,87*10 ⁻⁵ /25°C Sensible a la llum	50%	Pols mullable
Clorpirifos		Cristall blanc sòlid pf=41-43°C Pv=1,87*10 ⁻⁵ /25°C Soluble en aigua i dissolvents orgànics Poc sol. en metanol	48% p/v	Líquid emulsionable
Iprodiona		Cristall sòlid incolor Pv< 10 ⁻⁶ mmHg/20°C Sol. aigua=13ppm Sol.uble en acetona Menys sol. en alcohols.	50%	Líquid auto-emulsionable o Pols mullable
Procomidona		Cristall sòlid. pf=166°C Pv=1,32*10 ⁻⁴ /25°C Prac. insol. aigua i poc sol. en alcohols Soluble dissolvents orgànics	50%	Pols mullable
Vinclozolina		Cristall sòlid. pf=108°C Sol. aigua=1000ppm Sol. en cloroform, benzé, acetona Estable en medi neutre Hidròlisis en alcali	50%	Pols mullable
Clozolinat		Sòlid incolor pf=113-114°C Pv=1*10 ⁻⁷ /25°C Sol. en aigua <2ppm Soluble dissolvents orgànics Hidròlisis pH=5-9	50%	Pols mullable
Oxiclorur de coure	3 Cu(OH) ₂ Cl ₂ Cu	Líquid pf=121°C Pràcticament insoluble en aigua i soluble en dissolvents orgànics	52% p/v	Líquid auto-emulsionable

TAULA 1.4.1.b Estructura química i característiques generals dels pesticides utilitzats

Producte fitosanitari	Dosi d'aplicació recomanada	Aplicacions	Notes	Toxicitat per l'home	Període de seguretat en dies
Metil paration	50-100 ml/hl	Control de lepidòpters, alguns coleòpters, hemípters, alguns dípters, hoplocampes, psiles i altres insectes	Acció penetrant. Molt usats units a olis en tractaments hivernals. Les formulacions capsulades presenten riscos més baixos. Tòxic per a les abelles.	Nociu	21
Fenitotrion	100-150 ml/hl	Control d'orugues defoliadores, minadores i frugívores; mosca blanca, àfids, còccids, xinxes, larves de dípters i altres insectes.	Molt usats units a olis en tractaments hivernals i estiuencs. Tòxic per a les abelles.	Nociu	15
Diclofluanida	200 g/hl	Recomanat pel control de tot tipus de malalties fúngiques	En vinya, no aplicar durant el verol, aturar els tractaments 6 setmanes abans de la verema. Dóna certa consistència al fruit, sembla ser que actua sobre l'aranya roja.	Baixa	7
Clorpirifos	150-200 ml/hl	Control d'escarbats, orugues, pulgons, cotxinilles, mosca blanca i altres insectes.	Bona persistència. Acció per vapor. no usar amb atomitzadors. No aplicar massa aviat en la vinya. Tòxic per a les abelles. Corrosiu en coure i llauna.	Nociu i Tòxic	30
Iprodiona	1-1,5 l. o kg/ha	Control de botritiosi i altres malalties d'origen fúngic.	Principalment preventiu. No és absorbit per les fulles, però sí per les arrels.	Baixa	14
Procimidona	100 g/hl	Control de botritiosi i altres podridures produïdes pels fongs.	Sistèmic. Preventiu i curatiu. S'usa en pols i mesclat amb altres fungicides. No barrejar amb olis minerals.	Baixa, irritant i nociva.	30-40
Vinclozolina	300 g/hl	Control de botritiosi i altres podridures produïdes pels fongs.	Penetrant. Emprat en tractaments de llavors i sòls, i es mescla amb altres fungicides. No aplicar en trasplantaments recents	no	21
Clozolinat	150 g/hl	Control preventiu i curatiu de botritiosi. i sclerotiniosi	Sistèmic i curatiu.	no	21
Oxiclurur de Coure	300-450 ml/hl	Control de malalties produïdes per fongs endoparàsits	No aplicar durant la floració.	Tòxic	15

FIGURA 1.4.1



TAULA 1.4.2 Distribució dels tractaments en cada subparcel.la

	Principi actiu	Producte comercial	Fabricant	Dosi aplicada
Subparcel.la nº 1	-	-	-	-
subparcel.la nº 2	metil paration	Metil Parafene	Rhône-Poulenc	100 ml/hl
	fenitotrión	Sumition	Argos	150 ml/hl
	diclofluanida	Euparen	Bayer	200 g/hl
	clorpirifos	Dursban	Sandoz	200 ml/hl
Subparcel.la nº 3	oxiclorur de coure	Cupagrex 30	Sadisa	3 Kg/ha
Subparcel.la nº 4	vinclozolina	Ronilan	Basf	150 g/hl
	clozolinat	Serinal	Agrimont	150 g/hl
	procimidona	Sumisclex	Agrococ	100 g/hl
	iprodiona	Rovral	Rhône-Poulenc	1,5 l/ha

FIGURA 1.4.2 Esquema del procés de vinificació en blanc i de la recollida de mostres

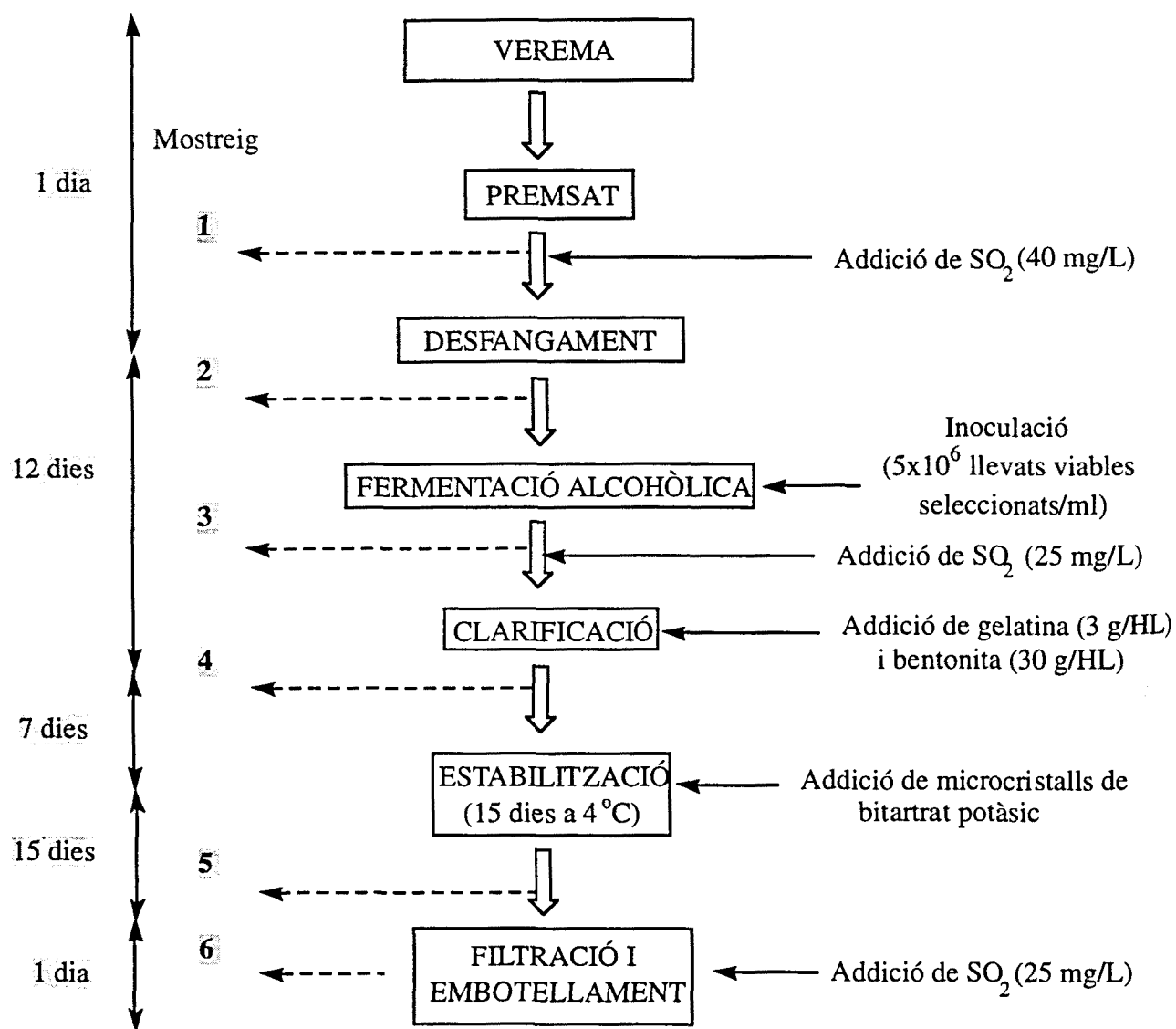
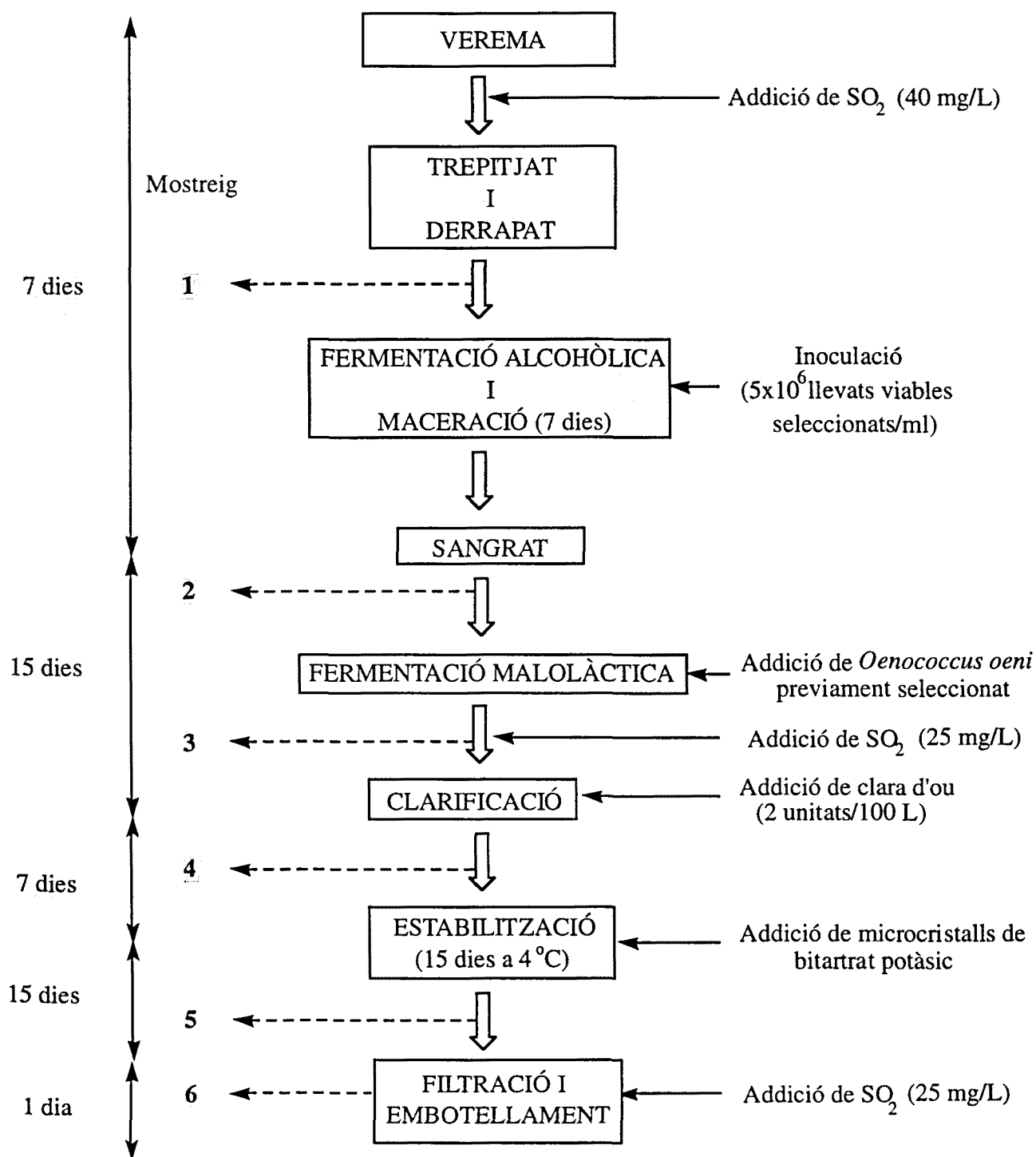


FIGURA 1.4.3 Esquema del procés de vinificació en negre i recollida de mostres



TAULA 1.4.3 Comportament dels pesticides durant el procés de vinificació en blanc^a

FV ^b	MP	FT	DF	CP	CZ	VC	PC	IP
1	60 ± 7	170 ± 32	629 ± 91	93 ± 20	890 ± 76	2218 ± 99	2043 ± 102	2510 ± 138
2	45 ± 5	103 ± 6	93 ± 22	n.d ^c	266 ± 9	1920 ± 48	1955 ± 29	2138 ± 118
3	14 ± 2	53 ± 7	n.d	n.d	n.d	1071 ± 32	1316 ± 79	1619 ± 227
4	10 ± 1	42 ± 3	n.d	n.d	n.d	830 ± 33	896 ± 36	1298 ± 123
5	8 ± 1	38 ± 4	n.d	n.d	n.d	705 ± 25	776 ± 27	1202 ± 132
6	3 ± 1	21 ± 4	n.d	n.d	n.d	585 ± 38	701 ± 39	1164 ± 111

^a Totes les dades vénen donades com el valor promig de 5 vinificacions ± error tipus. La concentració de cada pesticida s'expressa en µg/l: MP, metil-paration; FT, fenitotrión; DF, diclofluanida; CP, clorpirifos; CZ, clozolinat; VC, vinclozolina; PC, procimidona; IP, iprodiona.

^b FV, fases de la vinificació: (1) most deprés del premsatge; (2) most després del desfangat; (3) vi al final de la fermentació alcohòlica; (4) vi després de la clarificació; (5) vi després de l'estabilització; (6) vi després de l'esterilització, filtració i embotellament.

^c No detectable.

TAULA 1.4.5 Comportament dels pesticides durant el procés de vinificació en negre^a

FV ^b	MP	FT	DF	CP	CZ	VC	PC	IP
1	281 ± 11	1372 ± 130	1474 ± 176	1866 ± 299	3507 ± 228	4600 ± 207	3553 ± 266	1963 ± 79
2	33 ± 1	146 ± 7	n.d ^c	6 ± 1	n.d	912 ± 41	1442 ± 123	1632 ± 122
3	21 ± 3	122 ± 16	n.d	4 ± 1	n.d	796 ± 20	1369 ± 110	1656 ± 141
4	10 ± 1	68 ± 4	n.d	n.d	n.d	445 ± 13	720 ± 54	942 ± 75
5	9 ± 1	69 ± 8	n.d	n.d	n.d	398 ± 14	702 ± 21	714 ± 57
6	4 ± 1	39 ± 6	n.d	n.d	n.d	293 ± 19	588 ± 35	642 ± 74

^a Totes les dades vénen donades com el valor promig de 5 vinificacions ± error tipus. La concentració de cada pesticida s'expressa en µg/l: MP, metil-paration; FT, fenitotrión; DF, diclofluanida; CP, clorpirifos; CZ, clozolinat; VC, vinclozolina; PC, procimidona; IP, iprodiona.

^b FV, fases de la vinificació: (1) most deprés del premsatge; (2) most després del desfangat; (3) vi al final de la fermentació alcohòlica; (4) vi després de la clarificació; (5) vi després de l'estabilització; (6) vi després de l'esterilització, filtració i embotellament.

^c No detectable.

TAULA 1.4.4 Comportament del coure, ferro, zinc i manganès durant el procés de vinificació en blanc^a

FV	Cu (mg/l)			Fe (mg/l)			Mn (mg/l)			Zn (mg/l)		
	C	T	C	C	T	C	C	T	C	T	C	
1	1,45±0,16	46,00±2,64	1,89 ± 0,10	1,67 ± 0,49	0,26 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,59 ± 0,02	0,38 ± 0,03				
2	1,20 ± 0,11	43,00±2,51	2,71 ± 0,17	1,32 ± 0,11	0,28 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,46 ± 0,04	0,33 ± 0,01				
3	0,17 ± 0,07	0,46 ± 0,15	2,05 ± 0,14	1,78 ± 0,28	0,29 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,38 ± 0,03	0,25 ± 0,02				
4	0,17 ± 0,08	0,35 ± 0,11	2,99 ± 0,25	3,37 ± 0,33	0,38 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,52 ± 0,02	0,30 ± 0,01				
5	0,16 ± 0,08	0,28 ± 0,10	2,76 ± 0,23	2,54 ± 0,28	0,39 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,17 ± 0,01				
6	0,17 ± 0,09	0,37 ± 0,14	2,45 ± 0,24	3,26 ± 0,40	0,36 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,24 ± 0,02				

^a Totes les dades vénen donades com el valor promig de 5 vinificacions ± error tipus. C, control; T, tractament amb oxíclorur de coure.

^b FV, fases de la vinificació: (1) most després del premsatge; (2) most després del desfangat; (3) vi al final de la fermentació alcohòlica; (4) vi després de la clarificació; (5) vi després de l'estabilització; (6) vi després de l'esterilització, filtració i embotellament.

TAULA 1.4.6 Comportament del coure, ferro, zinc i manganès durant el procés de vinificació en negra^a

FV	Cu (mg/l)		Fe (mg/l)		Mn (mg/l)		Zn (mg/l)	
	C	T	C	T	C	T	C	T
1	0,39 ± 0,06	10,6 ± 0,44	4,40 ± 0,32	4,20 ± 0,51	1,01 ± 0,04	1,50 ± 0,07	0,94 ± 0,06	0,80 ± 0,07
2	0,35 ± 0,03	0,12 ± 0,06	5,57 ± 0,28	4,87 ± 0,17	0,62 ± 0,02	0,80 ± 0,03	0,06 ± 0,03	0,09 ± 0,05
3	0,17 ± 0,04	0,02 ± 0,01	6,54 ± 0,24	5,57 ± 0,12	0,67 ± 0,02	0,82 ± 0,03	0,14 ± 0,05	0,11 ± 0,05
4	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,01	7,61 ± 0,32	5,88 ± 0,14	0,62 ± 0,02	0,75 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,02
5	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	6,39 ± 0,29	5,39 ± 0,07	0,61 ± 0,02	0,78 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,02 ± 0,01
6	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,01	5,36 ± 0,28	5,74 ± 0,10	0,68 ± 0,03	0,91 ± 0,04	0,09 ± 0,05	0,02 ± 0,01

^a Totes les dades vénen donades com el valor promig de 5 vinificacions ± error tipus. C, control; T, tractament amb oxicleur de coure.

^b FV, fases de la vinificació: (1) most després del premsatge; (2) most després del desfangar; (3) vi al final de la fermentació alcohòlica;

(4) vi després de la clarificació; (5) vi després de l'estabilització, filtració i embotellament.

1.5. CONCLUSIONS

1. El tractament de la vinya amb pesticides sense respectar els períodes de seguretat provoca la seva elevada presència en els mostos. En termes generals, la vinificació en negre implica una major presència dels pesticides orgànics que la vinificació en blanc, degut probablement, a la maceració de les pells. Les concentracions detectades oscil·len entre 0,06 ppb per el metil paratió en la vinificació en blanc fins a 4,6 ppm per la vinclozolina en la vinificació en negre. Els nivells de coure en els mostos procedents dels raïms tractats, es trobaren a concentracions de 10,6 ppm en el cas de la vinificació en negre i de 46 ppm en el cas de la vinificació en blanc, tots ells molt superiors als valors trobats en el most dels raïms no tractats.

2. En la vinificació en blanc, el procés del desfangat produeix una forta disminució dels nivells de diclofluanida, clorpirifos i clozolinat, mentres que té poc efecte sobre la resta de pesticides orgànics estudiats.

3. La fermentació alcohòlica provoca importants disminucions de tots els pesticides orgànics estudiats, essent especialment significativa en el cas de diclofluanida, clorpirifos i clozolinat, que pràcticament es troben per sota dels nivells de detecció al final de la mateixa. La resta de pesticides orgànics, malgrat la important davallada dels seus nivells, són presents en el vi en rama a nivells importants.

4. La resta d'etapes de la vinificació comporten una progressiva disminució del nivells dels pesticides orgànics encara presents, de tal manera que el metil paration i el fenitrotion es troben en el vi acabat a concentracions realment molt baixes. No obstant, els tres pesticides antibotrítics: vinclozolina, iprodiona i procimidona són molt més persistents, trobant-se a nivells força alts en el vi embotellat.

5. La fermentació alcohòlica provoca una forta disminució de les concentracions de coure i arriba al final del procés a nivells semblants als del control. La presència de coure no altera de forma important els nivells de ferro, zinc i manganés.

1.6. BIBLIOGRAFIA

Akirida-Demertzi, K., Demertzis, P.G. i Koutinas, A.A. (1988). pH and trace-elements content in raisin extract industrial-scale alcoholic fermentation. *Biotechnol.Bioeng.*, 31,7, 666-669.

Bidan, P. i Collon, Y. (1985). Métabolisme du soufre chez la levure, *Bull. OIV.*, 652-653, 544-563.

Brady, D., glaum, D. i Duncan, J.R. (1994). Copper tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 18, 245-250.

Cabanis, J.C. i Cooper, J.F. (1991). Résidus de produits phytosanitaires dans les vins. Approches toxicologiques et analytiques. *R. F. OE.*, 130, 43-50.

Cabras, P., Meloni, M. i Pirisi, F.M. (1983). The effect of clarifying substances on the content of some insecticides and fungicides in white wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 34, 2, 103-107.

Cabras, P., Garau, V.L., Angioni, A., Farris, G.A., Budroni, M. i Spanedda, J. (1995). Interaction during fermentation between pesticides and oenological yeast producing H₂S and SO₂. *Appl. Micobiol. Biotechol.*, 43, 2, 370-373.

Carbonel-Grinbaum, M. (1989). Les résidus de produits agro-pharmaceutiques: leurs incidences oenologiques essentielles, comment les limiter? *Vignes et Vins.*, 4 Nov., 37-40.

Dominguez, F. (1993). Plagas y Enfermedades de la vid, In *Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas* : Mundi-Prensa, Madrid, pp 711-769.

Flori, P. i Cabras, P. (1990). I residui di fitofarmaci nei vini. *Vignevini.*, 7-8, 31-37.

Garcia-Cazorla, J. i Xirau-Vayreda, M. (1994). Persistence of dicarboximidic fungicide residues in grapes, must and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 3, 338-340.

Girond, S., Blazy-Maugen, F. i Michel, G. (1989). Influence de quelques pesticides viticoles sur les levures et la fermentation. *R. F. OE.*, 119, 14-22.

Gnaegi, F., Aerny, J., Bolay, A. i Crettenard, J. (1983). Influence des traitements viticoles antifongiques sur la vinification et la qualité du vin. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 15, 4, 243-250.

Hsia, C.L., Planck, R.W. i Nagel, C.W. (1975). Influence of must processing on iron and copper contents of experimental wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 26, 2, 57-61

Larue, F. (1991). IBS: des fongicides qui perturbent les fermentations. *Vitis.*, 139,106-108.

OIV, (1995). Compte rendu de la Sous-Commission Conventiennelle d'Unification des Méthodes d'Analyse et d'Appréciation des Vins (35 Session), *Bull. OIV.*, 777-778, 932-967.

Otero, D., Mañas, L. i Dominguez, J. (1993). Efecto de los residuos antibotróxicos sobre poblaciones levaduriformes. Su incidencia sobre la calidad del vino (I). *Vitivinicultura.*, 5-6, 35-39.

Otero, D., Mañas, L. i Dominguez, J. (1994). Efecto de la presencia de Vinclozolina e Iprodiona sobre las poblaciones levaduriformes. Su incidencia sobre la calidad del vino (IV). *Vitivinicultura.*, 1-2, 55-61.

Sala, C., Busto, O. i Guasch, J. (1996). A quick capillary gas chromatographic method for determination of usual pesticides in musts and wines. Submitted for publication in *Chromatographia*.

Sarpis-Domercq, S. (1980). Etude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vins. Expérimentation 1978-1979. Comparaison avec les résultats de 1975, 1976 et 1977. *Conn. Vigne Vin.*, 14, 155-181.

Underwood, E.J. (1977). In "Elements in human and animal nutrition". New York, Academic Press.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

CAPÍTOL 2

2. EFECTE DE LA PRESÈNCIA DE DIFERENTS PESTICIDES SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA.

2.1. INTRODUCCIÓ

La transformació de most en vi és un procés molt complexe en el que intervenen una gran quantitat de microorganismes. Els llevats responsables de la fermentació alcohòlica, tenen un paper clau en el desenvolupament de la mateixa, intervenció que ha estat reconeguda i estudiada des de les primeres investigacions de L. Pasteur, ara fa uns 150 anys (Amerine, 1985).

Durant la fermentació, els llevats utilitzen sucres i altres constituents del most com a substractes pel seu creixement, i els converteixen en etanol, CO₂ i altres productes finals del seu metabolisme que contribuiran a la composició química i a la qualitat sensorial del vi. Les concentracions de substractes utilitzats i els productes resultants, depenen del tipus de llevats present i de les seves característiques de creixement (Soufleros i col., 1979). Durant la fermentació, la població de cèl.lules viables en el most incrementa des dels valors inicials, entre 10⁴ i 10⁶ cèl.lules/ml, als valors màxims de l'ordre de 10⁸ cèl.lules/ml (Fleet i col., 1993). Aquest creixement segueix la corba típica de creixement dels microorganismes que es caracteritza per tenir:

-una primera fase de latència, en la que la taxa de creixement és nul.la. Les cèl.lules utilitzades per la inoculació han d'adaptar-se a aquest nou medi, o bé si són velles, reconstituir el seu potencial enzimàtic.

-una segona fase d'acceleració, en la que els microorganismes comencen la seva multiplicació. Aquesta fase i l'anterior, són facultatives i seran més curtes, en tant i en quant les condicions de creixement siguin més favorables.

-una tercera fase exponencial o logarítmica, en la que la taxa de creixement serà constant i màxima, per tant la mortalitat serà quasi nula i el nombre de llevats vius ha de ser significativament igual al nombre de llevats totals.

-la quarta fase o d'endarreriment es donarà quan un dels factors limitants estigui gairebé esgotat o bé es trobi a nivells crítics, llavors la taxa de creixement disminuirà.

-la cinquena fase o també coneguda com a fase estacionària, tindrà lloc quan el factor limitant s'hagi esgotat i el creixement s'aturi. En aquestes condicions la població de llevats romandrà en estat estacionari durant un temps més o menys llarg, segons les condicions del medi extern i el tipus de llevats que hi estigui implicat.

-en la sisena fase o de declinació, la població decreix, els llevats moren, es lliuren productes d'excreció, es produeixen fenòmens d'autòlisi amb la consegüent dissolució en el medi de les matèries resultants, que per altra part seran aprofitades per la resta de llevats encara vius utilitzant-los per sobreviure fins a l'extinció total (Ribéreau-Gayon i col., 1975).

Les característiques cinètiques d'aquest creixement poden ser descrites en termes de: (I) duració de la fase de latència i de la fase d'acceleració; (II) velocitat de creixement; (III) població màxima formada i (IV) duració de les fases estacionària i de declinació. I estaran afectades per: la clarificació del most, l'addició d'anhídrid sulfurós, la temperatura de fermentació, la composició del most, la inoculació amb llevats seleccionats, les substàncies químiques presents procedents dels tractaments fitosanitaris de la vinya, la interacció dels llevats amb altres microorganismes i els fenòmens d'autòlisi (Fleet i col., 1993).

En aquest capítol ens proposem estudiar la cinètica fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* en presència dels pesticides utilitzats en el treball de camp del capítol anterior. Els nostres estudis es basaran en un seguiment de la població dels llevats, estudi de poblacions totals i viables, així com també en un seguiment del decreixement de la densitat que ens donarà una idea global del desenvolupament de la fermentació alcohòlica (Strehaiano, 1993).

2.2 MATERIALS I MÈTODES

2.2.1 ELS LLEVATS

Es va utilitzar la soca comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, Levuline CHP, suministrada per L'Institut Oenotechnique de Champagne (soca CIVC 8130), que va ser rehidratada segons les condicions del fabricant.

2.2.2. EL MEDI DE CULTIU

Per tal d'aproximar al màxim possible les condicions de laboratori a les condicions reals, ens decidirem a utilitzar com a medi de cultiu, most concentrat prèviament diluït i ajustat a les condicions de verema. Els mostos concentrats es preparen a partir de mostos apagats (conservats per un fort sulfitat) eliminant una gran part de la seva aigua per escalfament, en general sota un lleuger buit. Els mostos concentrats comercials tenen densitats compreses entre 1240 a 1330 mg/ml. L'escalfament concentra en el most tots els

seus elements, tant els constituents orgànics com minerals; l'acidesa es concentrada quasi en les mateixes proporcions que els sucres, així doncs, només una part de l'àcid tartàric precipita després de la concentració en forma de bitartrat potàsic. També són rics en potasi, calci, ferro, coure etc. (Peynaud 1989).

2.2.3. ELS PESTICIDES

Els pesticides utilitzats van ser els mateixos del capítol 1 (Veieu les Taules 1.4.1a i 1.4.1b del Capítol 1).

2.2.4. PREPARACIÓ DELS FERMENTADORS I PRESA DE MOSTRES

a. Preparació del most.

El most concentrat es dilueix amb aigua destil.lada fins obtenir una densitat aproximada de 1075 mg/ml a la temperatura de 20°C, que correspon aproximadament a 187 g/l de sucres reductors. Aquesta concentració de sucres en condicions de vinificació en blanc correspondria a un grau provable de 11%. Es fa una mesura de l'acidesa total (European Community, 1990) i segons el resultat, s'ajusta amb àcid tartàric fins a obtenir un valor 6 g/l, expressat en àcid tartàric. També es rectificà el most amb metabisulfit potàsic (European Community, 1990) per obtenir uns valors de sulfurós total que ratllin els 40 mg/l. Un cop enllestit el most, es procedeix a omplir els fermentadors que tindran un volum de 1,5 l i es posaran en un bany termostatitzat a la temperatura $20\pm 1^\circ\text{C}$ per tal de que pugui iniciar-se la fermentació alcohòlica.

Per cada grup experimental es prepararen 5 fermentadors. Les dosis de pesticides, van ser escollides d'acord amb els resultats obtinguts en l'experiment de camp del Capítol 1. (aproximadament 1 ppm per cada pesticida i 5, 50 i 100 ppm de coure, segons els resultats d'aquest metall en la vinificació en blanc).

b. Preparació de l'inòcul de llevats.

Com abans hem apuntat, per a la preparació de l'inòcul de llevats es seguiran les condicions del fabricant que en el nostre cas consistiran en una rehidratació dels mateixos, doncs els rebrem liofilitzats i envasats al buit. La rehidratació consistirà en obtenir una solució d'aigua destil.lada (10 ml), glucosa (10 g/l) i llevats (1 g), aquesta es manté en agitació durant 30 minuts a una temperatura entre 30 i 35°C. Un cop ha passat el temps corresponent, es procedeix a inocular una població de 5×10^6 cèlules viables/ml en cada fermentador.

c. Presa de mostres

Un cop ha començat la fermentació es procedeix a la presa de mostres en els dies 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 de fermentació (o bé en els dies indicats en els gràfics). Prèvia agitació del fermentador durant uns 45 minuts, es procedeix a la extracció de la mostra tal com s'indica en la Figura 2.4.1, per tal d'evitar l'aireació del fermentador, factor que ens podria alterar la cinètica fermentativa (Fleet i col., 1993). Quan s'ha obtingut la mostra, s'agafaran diferents alíquotes d'aquesta per tal de determinar-ne la densitat i les poblacions.

2.2.5. COMPTATGE DE LLEVATS

a. Preparació del blau de metilè

Per preparar un volum de 100 ml de colorant, cal disoldre 5 g de citrat sòdic i 0,05 g de blau de metilè en 100 ml d'aigua destil·lada (Painting i col. 1990).

b. Comptatge de llevats

Abans d'iniciar el comptatge es dilueix la mostra, mitjançant un banc de dilucions tal com esquematitzem en la Figura 2.4.1, per tal de facilitar el recompte de les cèl·lules. Les dilucions variaran en funció de la densitat de població que trobem en un dia en concret, de tal manera que en el dia primer de fermentació es realitzarà una dilució 1:50, el segon dia de fermentació la dilució serà de 1:100 i a partir del tercer dia es ferà una dilució de 1:200. Ajudant-nos d'una cambra de Neubauer i d'un microscopi iniciarem el comptatge de llevats (Postma i col. 1989). Amb una pipeta Pasteur introduïm una alíquota de mostra diluïda amb blau de metilè entre la cambra i un cubreobjectes, aquesta s'escamparà per capil·laritat i quedarà uniformement distribuïda a punt de ser observada al microscopi. Pel recompte al microscopi seleccionem l'objectiu de 40 augments, que multiplicats pels augments de la lent ocular, donaran un total de 400 augments. El resultat obtingut en el comptatge s'haurà de multiplicar per les dilucions i pel volum de mostra corresponent a cada quadre:

$$N^{\circ} \text{ cèl.lules / ml} = (n^{\circ} \text{ CO} \times \text{FD}) / (16 \text{ quadres} \times \text{VQG})$$

$$v = 0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$$

$$\text{VQG} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 \times 25 \text{ (quadres petits)} = 6,25 \times 10^{-3} \text{ mm}^3 \times 1 \text{ ml} / 10^3 \text{ mm}^3 = 6,25 \times 10^{-6} \text{ ml}$$

On v és el volum de cada quadre petit; VQG és el volum del quadre gran; CO són les cèl·lules comptades al microscopi i FD és el factor de dilució.

Els resultats s'expressaran com la mitjana aritmètica de 5 rèpliques \pm error tipus i com a mètode estadístic per comparar els resultats s'utilitzarà l'anàlisi de la variància, amb el paquet estadístic Statview 4.0 (Abacus, USA).

La tinció amb blau de metilè s'utilitzarà per fer el recompte de les cèl.lules viables, de tal manera que aquestes al estar vives tindran intacta la seva membrana cel.lular i el colorant no podrà penetrar, això voldrà dir que les visualitzarem sense tenyir. En canvi les cèl.lules mortes tindran la seva membrana cel.lular malmesa de tal manera que sí serà possible la penetració del colorant dins la cèl.lula i per tant les observarem de color blau (Painting i col. 1990).

2.2.6. MESURA DE LA CINÈTICA FERMENTATIVA

La mesura de la cinètica fermentativa es pot efectuar mitjançant diferents tècniques: quantificant el consum de sucres, la producció d'etanol, el lliurament CO₂ així com també, realitzant un seguiment la densitat del most/vi.

La densitat en un celler es quantifica amb un densímetre tal com indiquen els mètodes d'anàlisi oficials de l'European Community (1990), aquest mètode utilitza 200 ml de mostra que han d'estar a la temperatura de 20°C, quan la temperatura és diferent de l'esmentada es fa una correcció d'acord amb unes taules que el mateix protocol proporciona. En el nostre cas però, com no disposem de grans volums, la mesura de la densitat la realitzarem per pesada de 10 ml de most mesurats amb una pipeta de doble enràs, previament centrifugats a 3000 g durant 3 minuts, controlant també la temperatura i efectuant les correccions pertinents en cada cas.

Els resultats s'expressaran com la mitjana aritmètica de 5 rèpliques \pm error tipus i com a mètode estadístic per comparar els resultats s'utilitzarà l'anàlisi de la variància, amb el paquet estadístic Statview 4.0 (Abacus, USA).

2.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

La Figura 2.4.2 ens mostra l'efecte de l'oxiolorur de coure sobre la fermentació alcohòlica. En aquestes gràfiques podem constatar que la presència d'aquest pesticida inorgànic utilitzat com antimildiu i també com antibotrític, a concentracions elevades, provoca una disminució de la velocitat de fermentació, condicions que trobaríem quan no es guarden els períodes de seguretat (Sala i col., 1996) o bé a causa de la contaminació de la maquinària del celler (premses, canonades, bombes, etc., que poden estar fabricades únicament amb coure o bé amb aleacions d'aquest metall) (Coll i col. 1992). En la Figura 4.2.2. (bis) es presenta l'estadística corresponent a la Figura 2.4.2.

Pel que fa a la població de llevats viables, s'observa també una disminució significativa a altes concentracions de coure, la qual cosa indica que hi ha un elevat grau de mortalitat provocat per la presència d'aquest metall. Aquests resultats confirmen la toxicitat

del coure pels microorganismes responsables de la fermentació alcohòlica (Akrida-Demertzi i col. 1990). No obstant, a nivells habituals (5 ppm) de coure en el most i en el vi, no s'observen efectes tòxics, per la qual cosa no es pot considerar el coure com una causa important dels problemes de fermentació. Aquest resultat concorden amb els estudis publicats per Minarik i col., (1975), Minarik, (1979) i Girond i col., (1989). Fins hi tot les dosis normals de coure en el most exerceixen una acció positiva afavorint el desenvolupament de les espècies de *Saccharomyces* (Bureau i col., 1982) així com també estimulen el desenvolupament de la fermentació.

Gartel, (1967), Wenzel i col. (1980) i Bureau i col. (1982) afirmen que el coure es lliga a l'àcid sulfhídric que resulta de la reducció dels sulfats, dels sulfits o del sofre elemental durant la fase tumultuosa de la fermentació i és així com el sulfur de coure que és poc soluble, precipita amb els baixos quan es fan els trasbalsos. D'aquesta manera no només desapareix del most el coure sinó que també ho fa un part de l'àcid sulfhídric, que a elevades concentracions provocaria l'aparició de gustos reduïts. Precisament les causes que produeixen el gust reduït en alguns cassos poden ser conseqüència dels tractaments retardats de la vinya amb fungicides rics en sofre i pobres en coure (Freydier i col., 1989; Glories, 1988; Maujean, 1989; Cuenat i col., 1990).

Els insecticides **metil paration, fenitotrion i clorpirifos** (Figures 2.4.3, 2.4.4 i 2.4.6) no presenten cap efecte ni a nivell de desenvolupament de la fermentació ni a nivell de poblacions viables, tot i que se'ls hi suministrà dosis de 1ppm que són més elevades del que normalment es sol trobar en el raïm acabat de veremar. Els nostres resultats també concorden amb les obserbacions de Foulonneau i col. (1977), Girond i col. (1989) i Iñiguez (1993).

Els antibotrítics sistèmics de la família de les dicarboximides: **vinclozolina, procimidona, iprodiona i clozolinat** (Figures 2.4.7, 2.4.8, 2.4.9 i 2.4.10) a dosis d'aplicació de 1 ppm que correspondria a una dosis elevada, tampoc van presentar cap tipus d'efecte especialment significatiu ni sobre el desenvolupament de la fermentació ni tampoc sobre la població de cèl.lules viables. Observacions concordants amb les efectuades per Minarik (1979), Sapis-Domerq i col. (1976, 1977, 1978, 1980), Cassignard (1980), Zironi i col. (1981), Conner (1983), Monteil i col. (1986), Cabras i col. (1987), Freydier i col. (1989), Iñiguez (1993), Otero i col. (1993) i Dominguez i col. (1995).

El fungicida de contacte antimildiu, antioïdium i antibotrític, **diclofluanida** (Euparen) de la família de les sulfamides, exerceix una acció fortament negativa sobre els llevats segons Gartel (1967) i Gnaegi (1985), afirmacions que subscriuim a partir dels resultats obtinguts en els nostres experiments (Figura 2.4.5), en els quals constatem que durant el segon dia de fermentació les poblacions de cèl.lules viables i totals són

significativament més baixes. Aquests alentiments a l'inici de la fermentació s'atribueixen a la mort de les cèl.lules viables i al període necessari per reconstruir una densitat poblacional suficient per reiniciar el procés (Sapis-Domerq, 1980; Girond i col. 1989; Dominguez i col., 1995). La primera gràfica d'aquesta figura ens indica un clar alentiment de la fermentació alcohòlica en els quatre primers dies (Minarick i col. 1975; Schopfer, 1978; Sapis-Domerq, 1977, 1980; Cuinier, 1979; Cassignard, 1980; Gnaegi i col. 1983; Gnaegi, 1985; Monteil i col., 1986; Freydier i col., 1989; Iñiguez, 1993; Oteroi col., 1993; Dominguez i col. 1995), en presència de 1 ppm d'aquest producte fitosanitari. Relentiment que Dvorak i col. (1970) atribüiren als nivells elevats de diclofluanida sense degradar ($>0,3$ ppm). Posteriorment, s'observa una recuperació de la dinàmica fermentativa fins assolir el mateix comportament que la corba control, aquesta recuperació s'explica a partir de la degradació d'aquest producte fitosanitari donant el seu metabolit: N',N'-dimetil-N-fenilsulfodiamida que no té cap efecte ni sobre la fermentació alcohòlica, ni sobre els llevats, ni tampoc sobre la qualitat organolèptica del vi, tot i que queda en forma soluble i no pot ser destruït ni es pot eliminar per les tècniques de vinificació (Schopfer, 1978; Gnaegi i col., 1983; Gnaegi, 1985).

A partir dels resultats obtinguts en aquests capítol, s'observa que només el coure a elevades dosis (50 ppm o superiors) i la diclofluanida (1 ppm) tenen un efecte significatiu sobre la dinàmica fermentativa i sobre les poblacions de llevats.

2.4. FIGURES

FIGURA 2.4.1 Extracció de la mostra i banc de dilucions

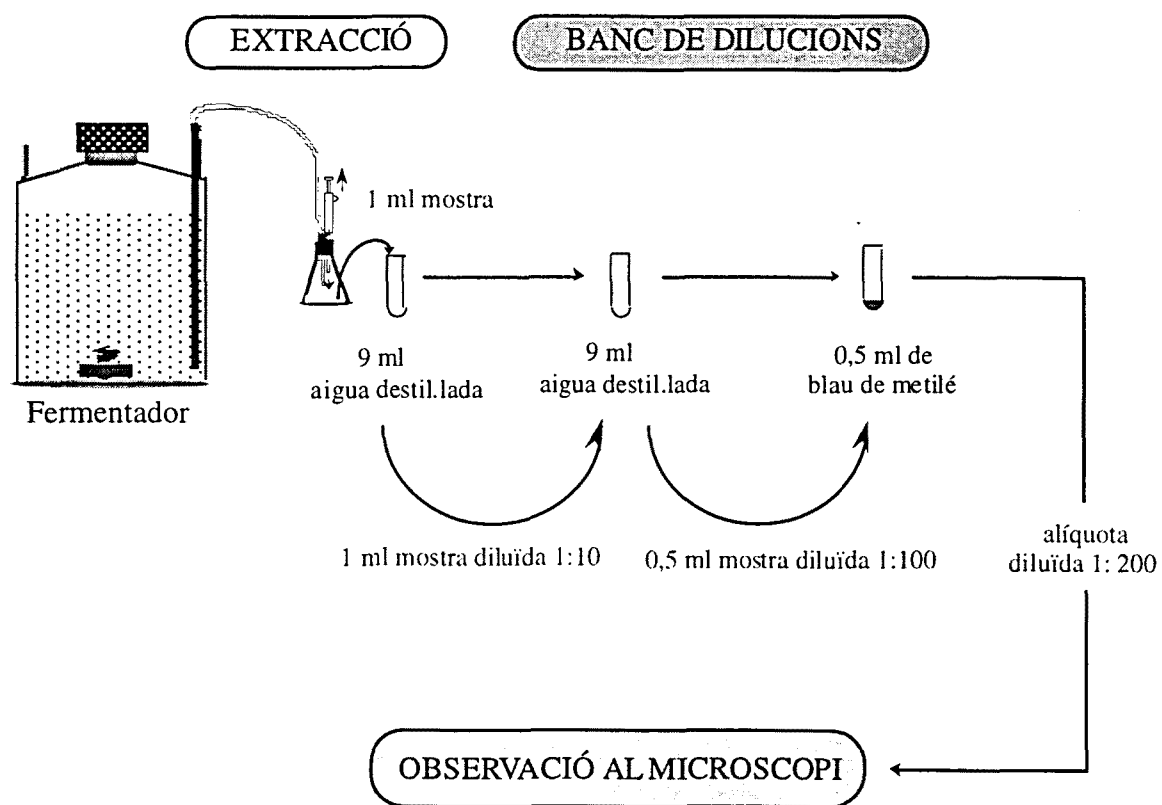


FIGURA 2.4.2 Influència del Coure sobre la fermentació

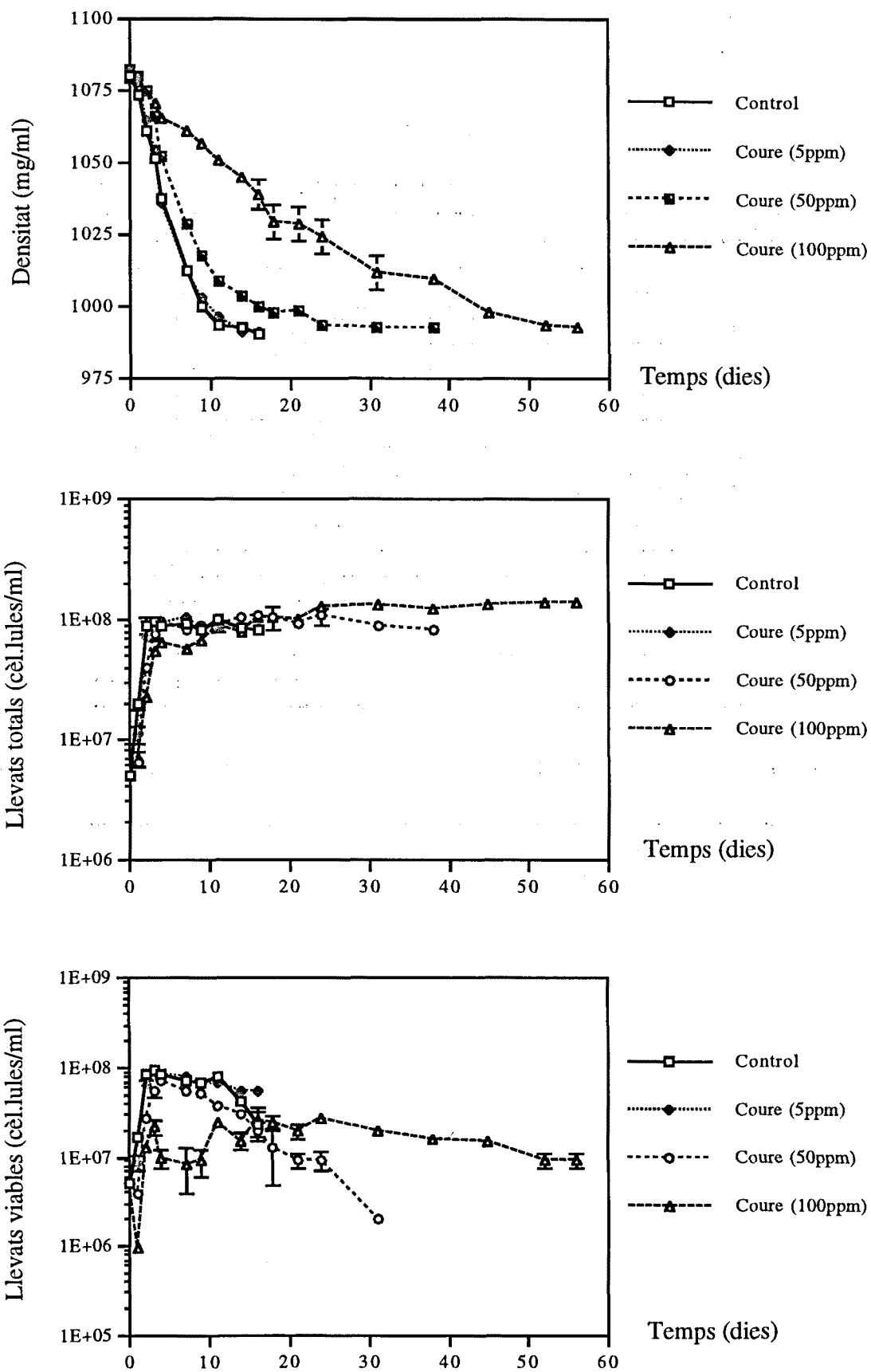


FIGURA 2.4.2. (Bis) Evolució de la densitat (mg/ml) i de les poblacions de llevats totals i viables (10^6 cèl.lules/ml) al llarg de la fermentació alcohòlica en presència de coure. Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al vi control.

DENSITAT

DIES	COURE			
	CONTROL	5 ppm	50 ppm	100 ppm
0	1080 \pm ,0632	1081 \pm 1	1082 \pm 0*	1079 \pm 0
1	1073,2 \pm 1,34	1079 \pm 1,34*	1080 \pm 0,5*	1077,7 \pm 0,33*
2	1060,4 \pm 0,98	1064 \pm 0,5*	1075 \pm 0,577*	1075 \pm 0,57*
3	1051 \pm 1,34	1054 \pm 1,5*	1065,6 \pm 0,9*	1070,3 \pm 0,33*
4	1037,2 \pm 0,37	1036 \pm 0,9	1052 \pm 0,33*	1065,3 \pm 0,33*
7	1012,2 \pm 0,49	1012 \pm 0,3	1028 \pm 0*	1060,7 \pm 1,86*
9	999,4 \pm ,74	1002,3 \pm 1,9	1017,3 \pm 1,52*	1056,3 \pm 3,25*
11	993 \pm 0,77	995,67 \pm 1,02	1008,3 \pm 2,18*	1050,7 \pm 2,96*
14	992,6 \pm 0,4	991 \pm 0,7	1003 \pm 1,76*	1044,3 \pm 3,28*
16	990,4 \pm 0,24	991 \pm 0,8	999,3 \pm 1,53*	1038,3 \pm 5,2*
18	-	-	997,67 \pm 0,88*	1029,3 \pm 5,84*
21	-	-	998 \pm 1,2*	1028,3 \pm 6,11*
24	-	-	993 \pm 1,15*	1023,67 \pm 5,8*
31	-	-	992,67 \pm 0,88*	1011,66 \pm 5,8*
38	-	-	992,67 \pm 0,88*	1009,3 \pm 2,67*
45	-	-	-	997,67 \pm 2,6*
52	-	-	-	993 \pm 1,52*
56	-	-	-	992,67 \pm 0,33*

POBLACIÓ CÈL.LULES TOTALS

POBLACIÓ CÈL.LULES VIABLES

DIES	COURE				COURE			
	CONTROL	5 ppm	50 ppm	100 ppm	CONTROL	5 ppm	50 ppm	100 ppm
0	5 \pm 0	5 \pm 0	5 \pm 0	5 \pm 0	5 \pm 0	5 \pm 0	5 \pm 0	5 \pm 0
1	19,8 \pm 2,33	11 \pm 1,7*	6,4 \pm 0,6*	6,87 \pm 1*	16,8 \pm 1,9	8,67 \pm 1,6*	3,93 \pm 0,5*	9,3 \pm 0,13*
2	90,5 \pm 14	71,7 \pm 4,1*	39,6 \pm 3,3*	22,1 \pm 1,3*	86 \pm 13,4	65 \pm 3*	27,3 \pm 2*	12,8 \pm 0,17*
3	98,2 \pm 4	88,7 \pm 1,8*	76 \pm 9*	53,7 \pm 4*	94,8 \pm 3,4	84,6 \pm 1,8*	54,6 \pm 8,2*	21,7 \pm 4,1*
4	89 \pm 4,15	91,3 \pm 4,1	94,7 \pm 7,1	64,3 \pm 3,5*	85,6 \pm 4,7	86,3 \pm 5	71,3 \pm 9,3*	9,7 \pm 2,2*
7	91,6 \pm 6,91	103 \pm 6,36	83,3 \pm 8,5	56 \pm 4,6*	73,6 \pm 3,8	79,3 \pm 2,7	56 \pm 4,2*	8,3 \pm 4,4*
9	82 \pm 3,85	84,7 \pm 6,8	90,7 \pm 5,21	67,3 \pm 5,7*	67,2 \pm 3,8	64 \pm 5,3	51,3 \pm 2,9*	9 \pm 1,2*
11	84 \pm 4,5	85,3 \pm 0,7	88,7 \pm 10,5	88 \pm 5,5	79,6 \pm 5,1	68 \pm 3,5	37,3 \pm 4,1*	24,3 \pm 3,2*
14	86,8 \pm 4,5	86 \pm 4,6	105 \pm 5,7*	80 \pm 8,6	41,6 \pm 6	56 \pm 3,1*	30,7 \pm 2,7*	15,3 \pm 3,2
16	80,8 \pm 2,6	86 \pm 4,6	108 \pm 8,9*	105 \pm 7,2*	23,2 \pm 8,2	56 \pm 3,1*	20 \pm 5*	26 \pm 9,1*
18	-	-	105 \pm 22,1*	105 \pm 4,1*	-	-	12,6 \pm 7,7*	24 \pm 4,6*
21	-	-	93,3 \pm 5,8*	101 \pm 6,7*	-	-	9,3 \pm 1,8*	19,3 \pm 3,5*
24	-	-	107 \pm 17,3*	129 \pm 13,4*	-	-	9,3 \pm 17,3*	27,3 \pm 2,4*
31	-	-	88 \pm 7,6*	134 \pm 4,2*	-	-	2 \pm 1,8*	20 \pm 2*
38	-	-	81,3 \pm 7,1*	121 \pm 8,8*	-	-	-	16 \pm 1,15*
45	-	-	-	133 \pm 5,7*	-	-	-	14,7 \pm 1,8*
52	-	-	-	141 \pm 5,8*	-	-	-	9,3 \pm 1,8*
56	-	-	-	141 \pm 5,8*	-	-	-	9,3 \pm 1,8*

FIGURA 2.4.3 Influència del Metil paration (1ppm) sobre la fermentació

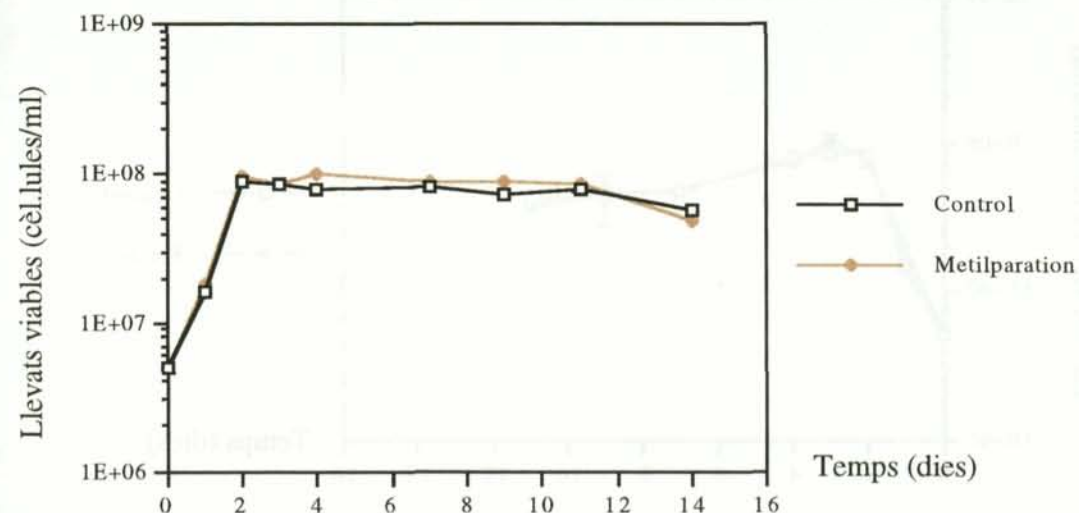
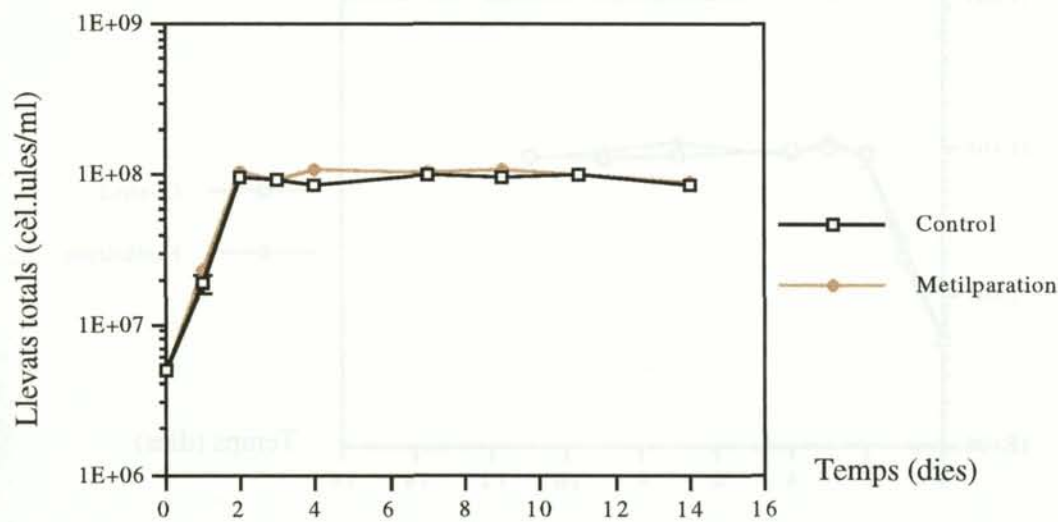
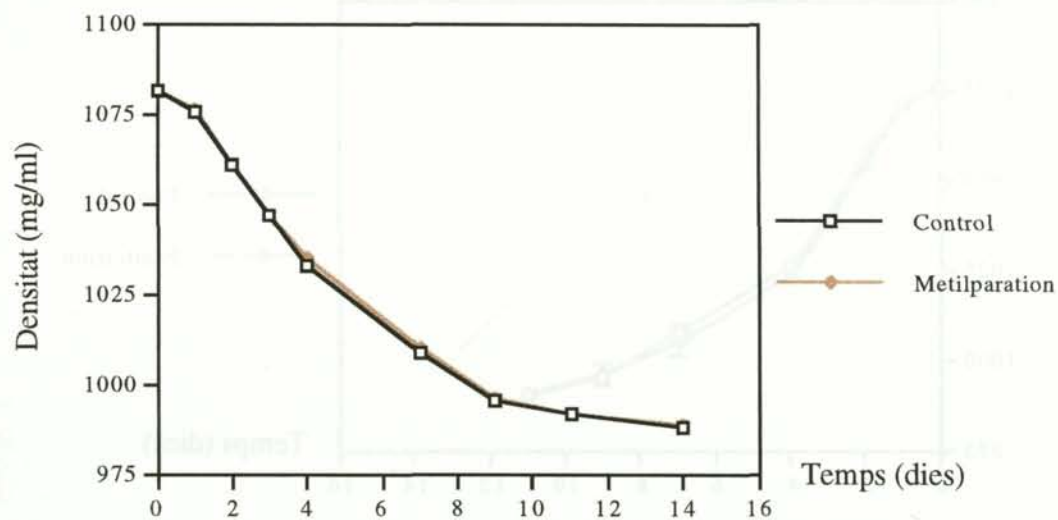


FIGURA 2.4.4 Influència del Fenitotrión (1ppm) sobre la fermentació

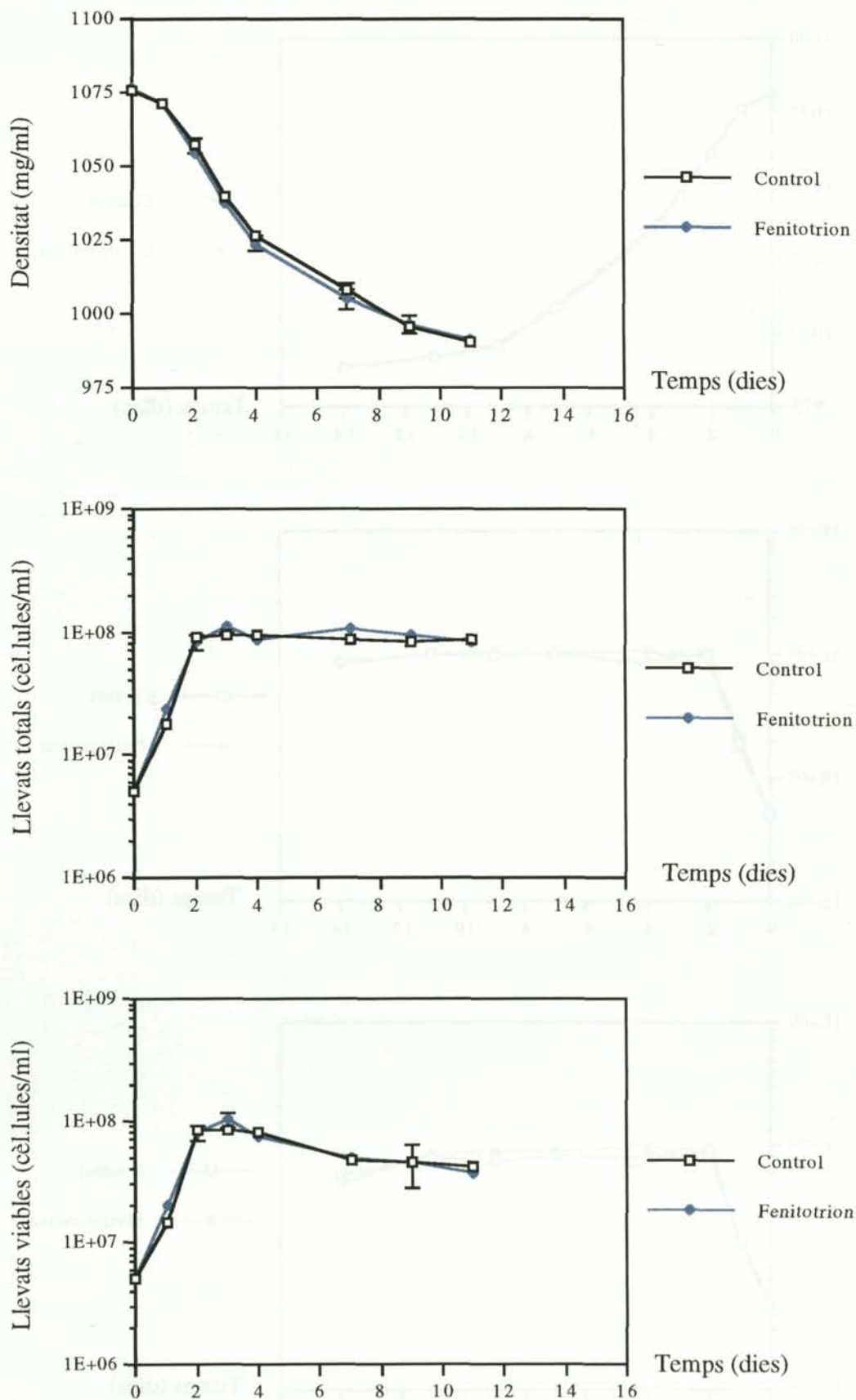


FIGURA 2.4.5 Influència de la Diclofluanida (1ppm) sobre la fermentació

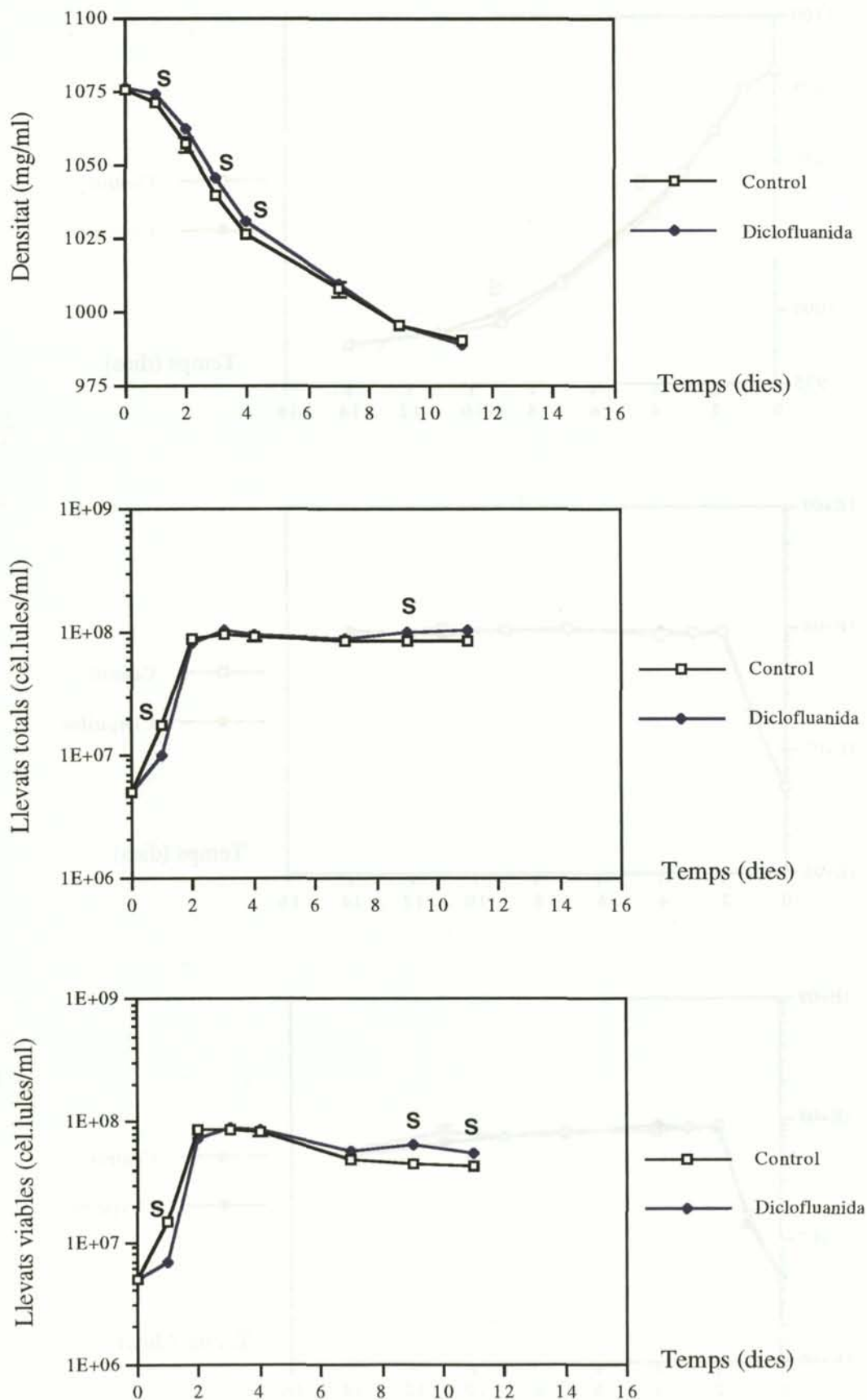


FIGURA 2.4.6 Influència del Clorpirifos (1ppm) sobre la fermentació

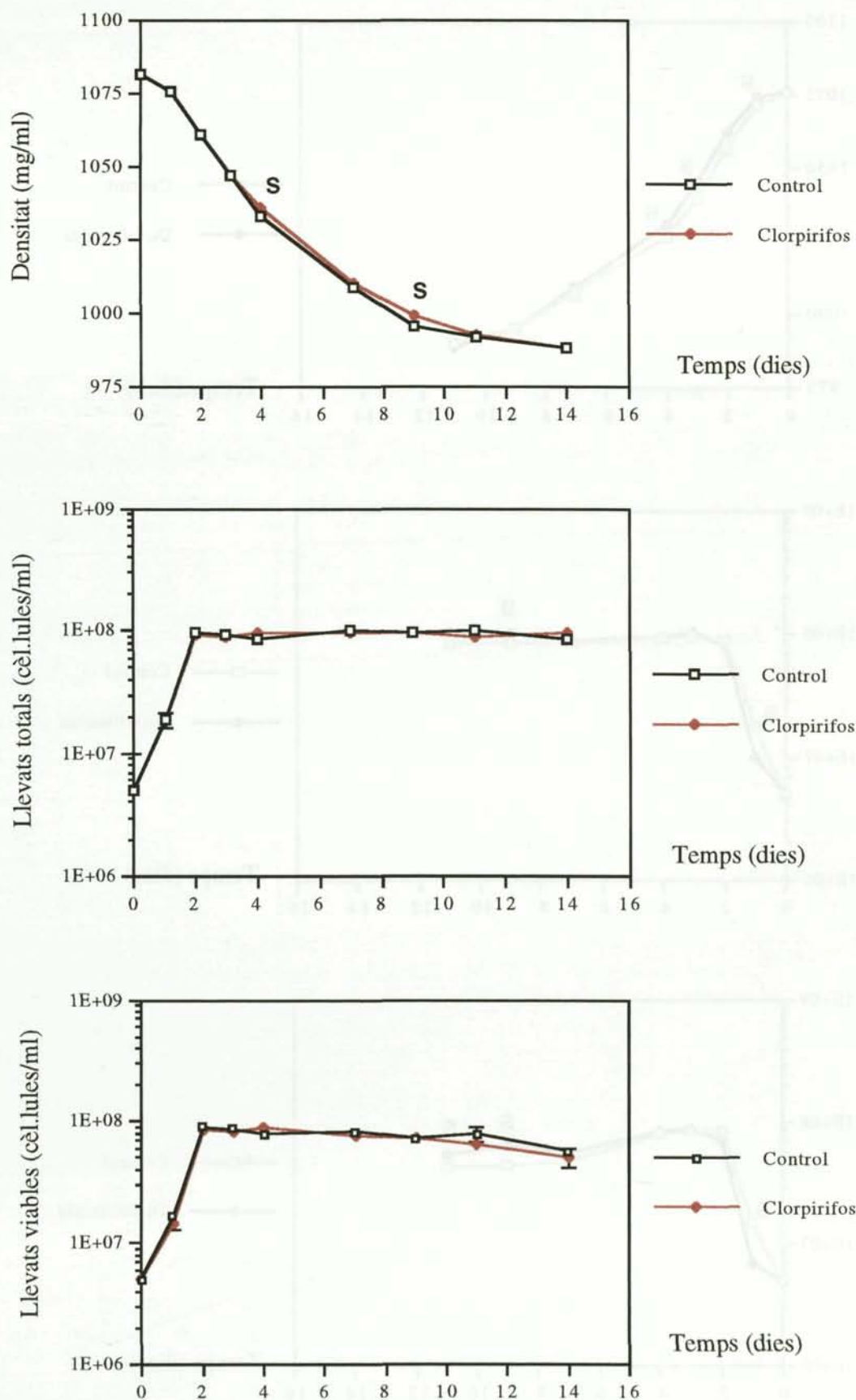


FIGURA 2.4.7 Influència de l'Iprodiona (1ppm) sobre la fermentació

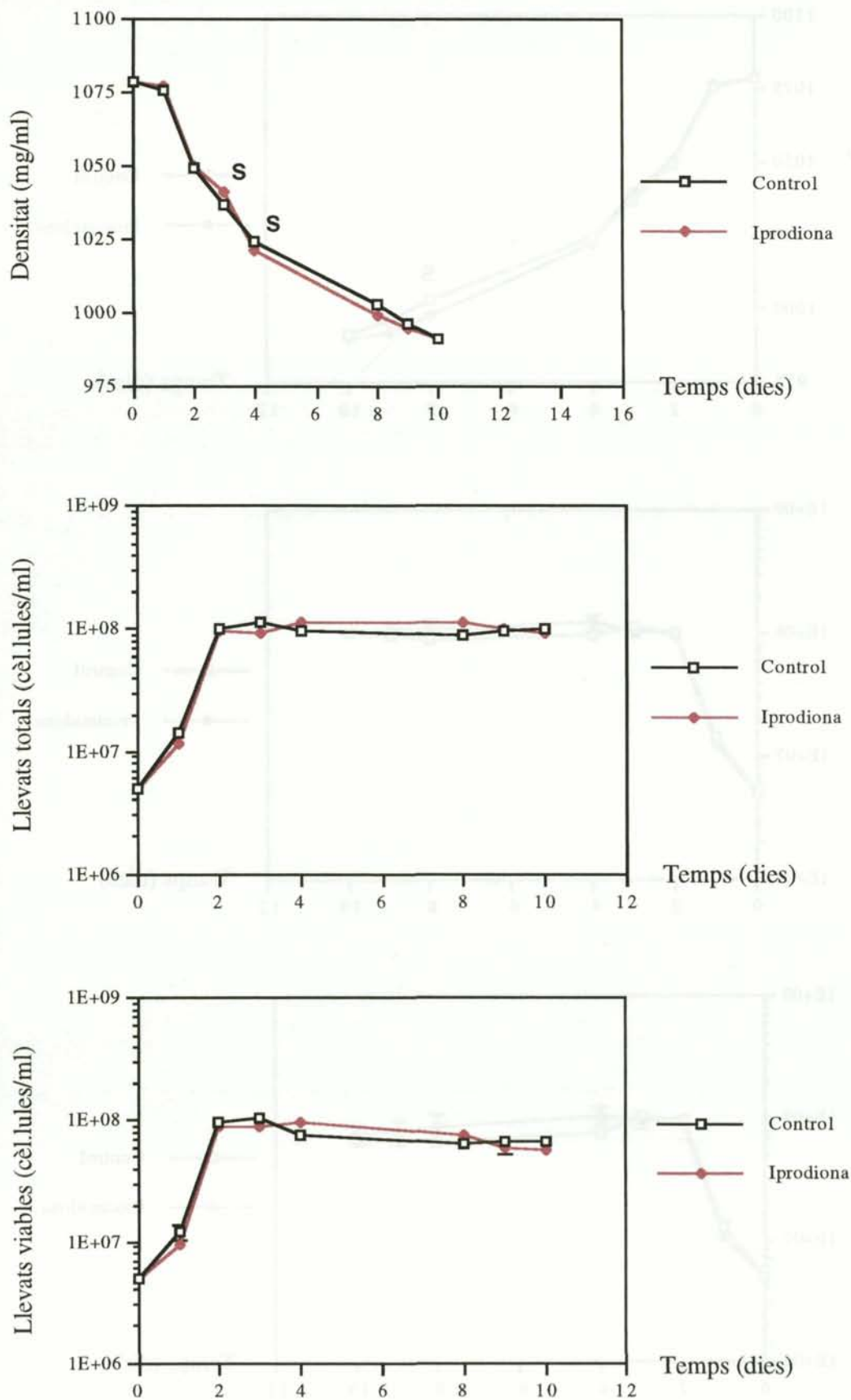


FIGURA 2.4.8 Influència de la Procimidona (1ppm) sobre la fermentació

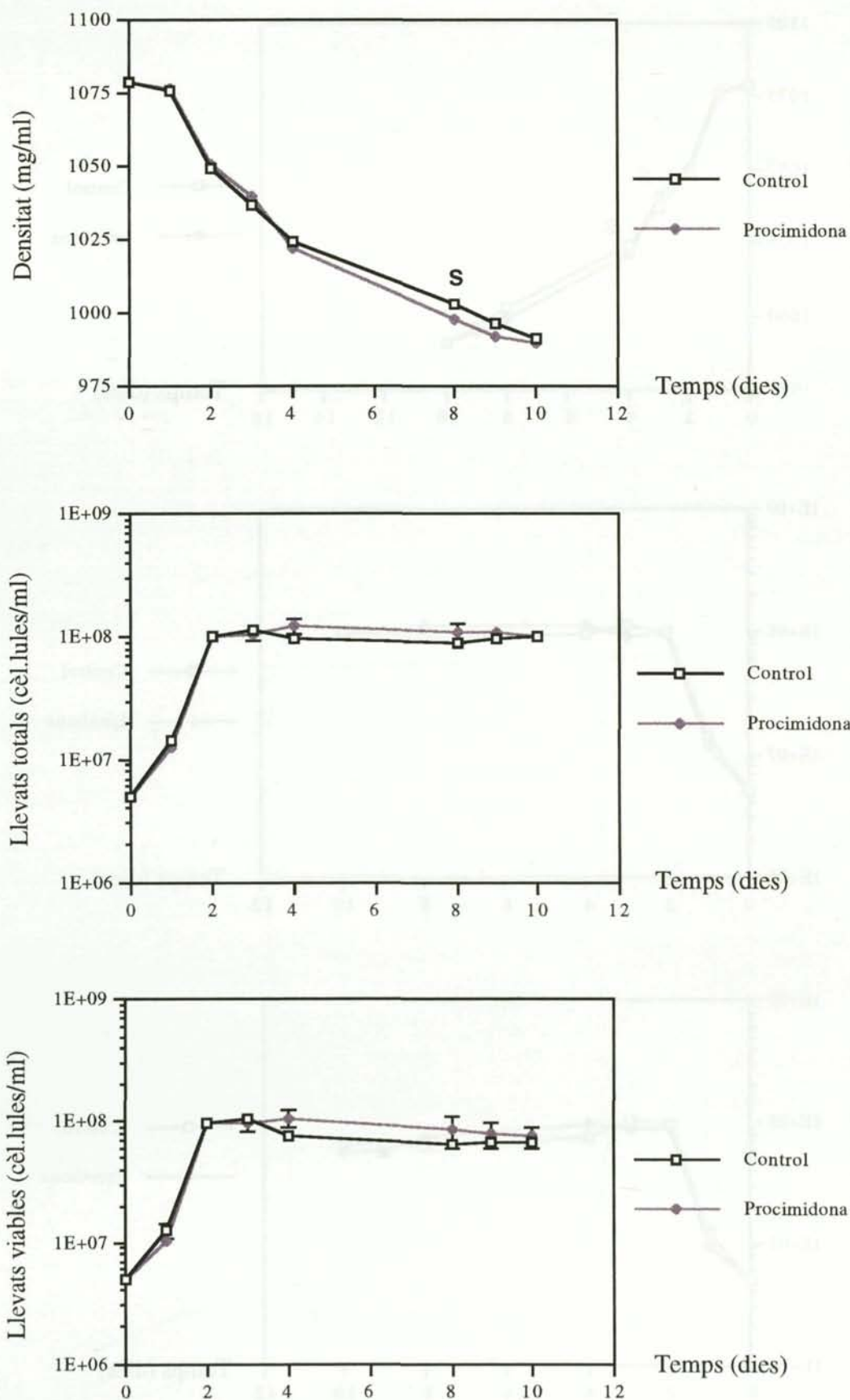


FIGURA 2.4.9 Influència de la Vinclozolina (1ppm) sobre la fermentació

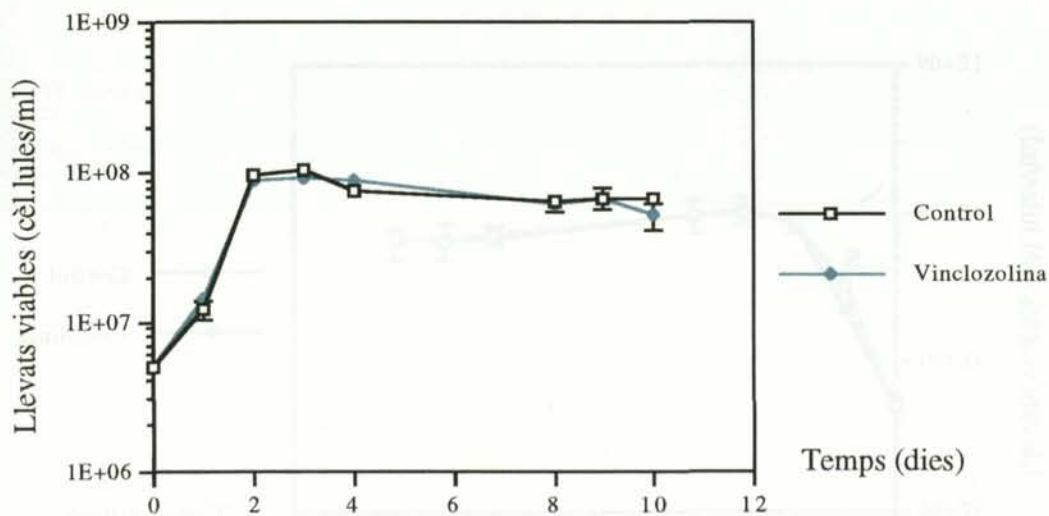
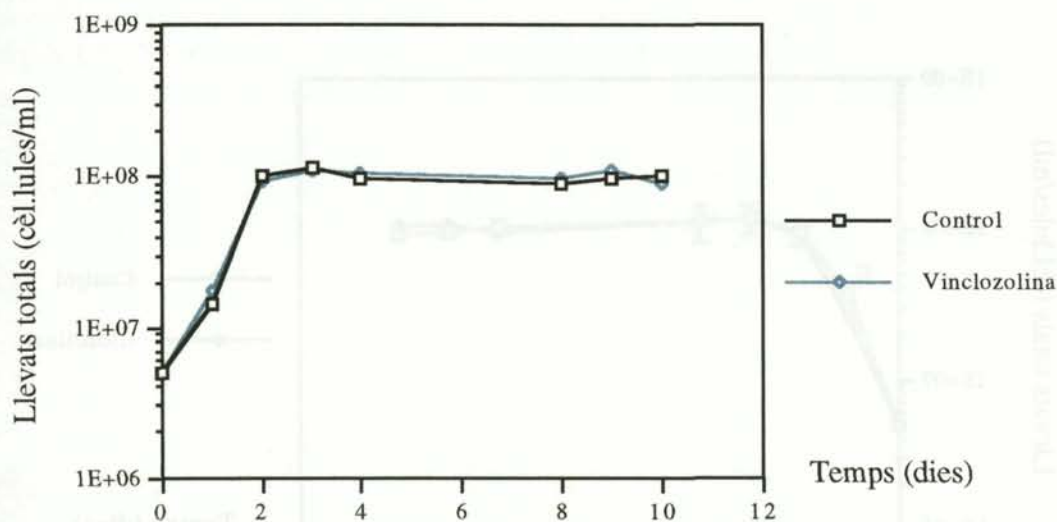
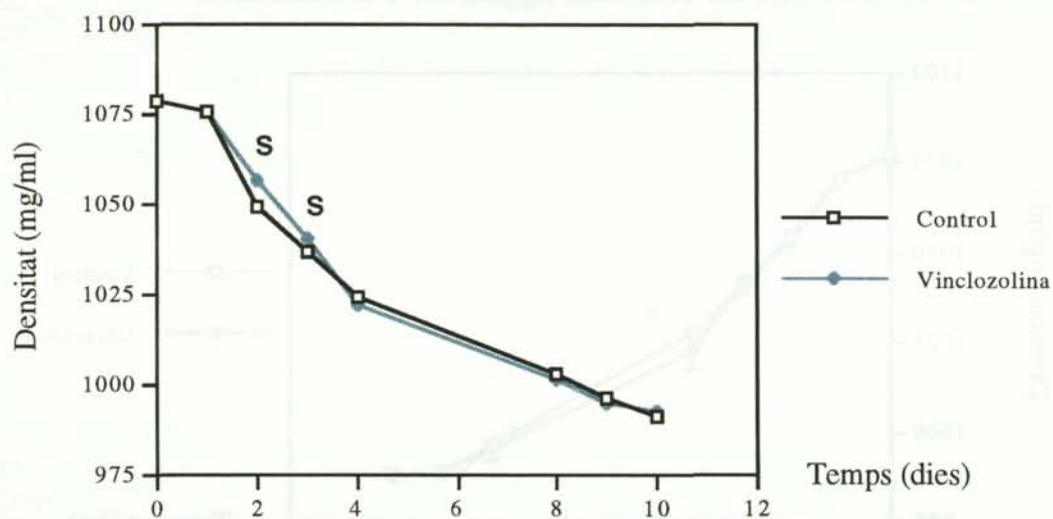
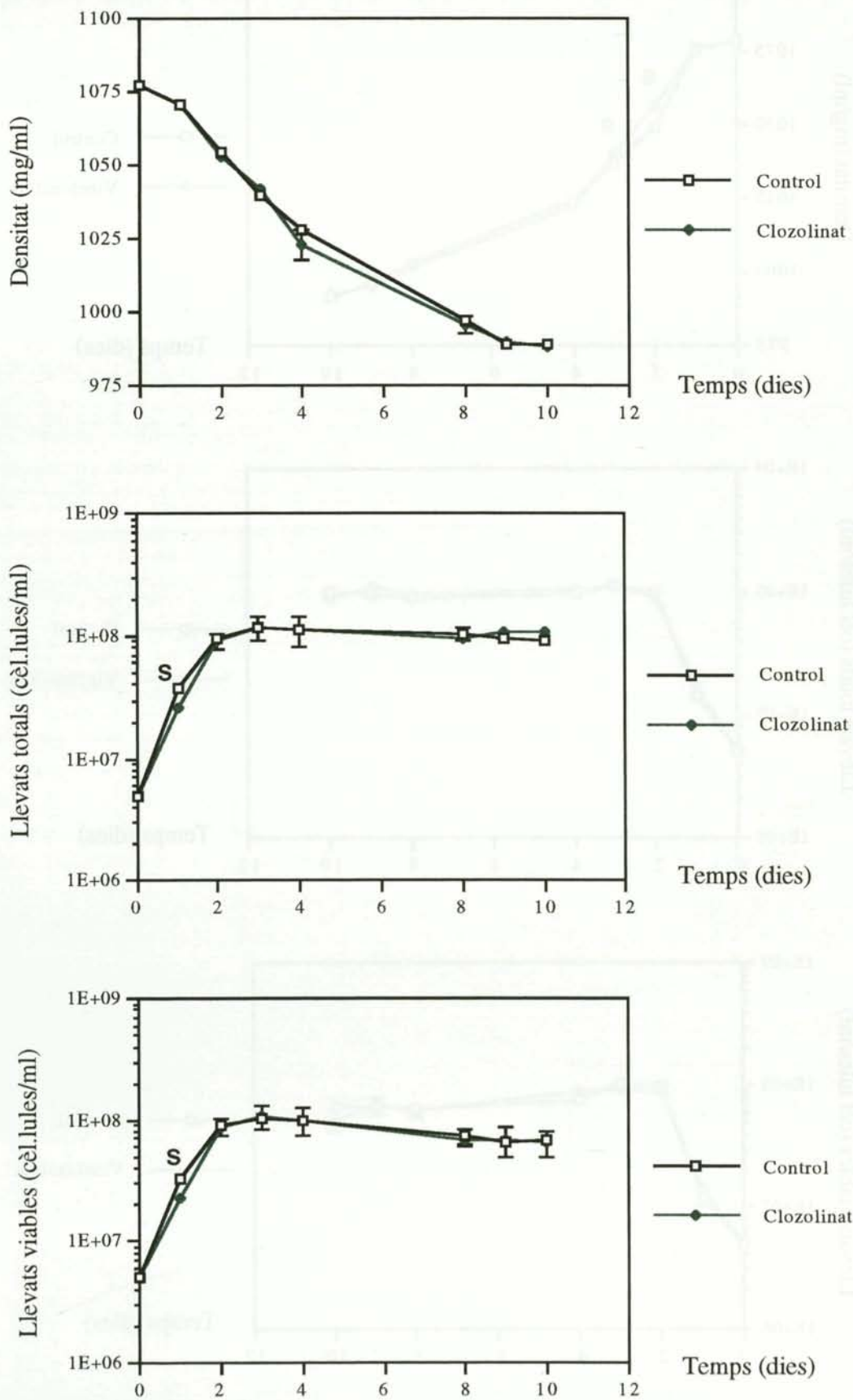


FIGURA 2.4.10 Influència del Clozolinat (1ppm) sobre la fermentació



2.5. CONCLUSIONS

1. La presència de 1 ppm dels pesticides: metil paration, fenitotrion, clorpirifos, iprodiona, procimidona, vinclozolina i clozolinat, no provoca cap alteració de la cinètica fermentativa ni tampoc de l'evolució de les poblacions de llevats.

2. En presència de 1 ppm de diclofluanida, s'observa un alentiment de la cinètica fermentativa que es correlaciona amb un retardament en la multiplicació dels llevats a l'inici de la fermentació.

3. La presència de 5 ppm de coure no produeix cap alteració del procés fermentatiu. No obstant, a dosis de 50 ppm o superiors es detecta un alentiment important de la cinètica fermentativa, així com un disminució clarament significativa de la població de llevats viables.

2.6. BIBLIOGRAFIA

Akrida-Demertzi, K., Drainas, C. i Koutinas, A.A. (1990). Significance of copper in alcohol production with fermentation of raisin extracts by the cell recycle process. *J. Food Sci.*, 55, 6, 1588-1616.

Amerine, M.A. (1985). Winemaking. En *Worlds Debt to Pasteur* editat per Koprowski i S.A. Ploting, pp. 67-81, New York: Alan R. Liss Incorporated.

Bureau, G., Brun, O., Vignes, A., Maujean, A., Vessells, G. i Feuillat, M. (1982). Étude de la microflore levurienne champenoise. *Conn. Vigne Vins*, 16, 15-31.

Cabras, P.; Meloni, M. i Pirisi, F.M. (1987). Pesticide fate from vine to wine. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*; U.S.A., 99,83, 117.

Cassignard, R. (1980). Influence des produits de traitement de la vigne sur la flore microbienne des fermentations et les caractères organoleptiques des vins. *Vignes et vins*. 286, 33-36.

Coll, C., Colldecarrera, M. i Comas, J. (1992). Aportació metàl·lica durant l'elaboració del vi. *ACE Rev. Enol.*, 4rt trimestre, 4-8.

Conner, A.J. (1983). The comparative toxicity of vineyard pesticides to wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 34, 4, 278-279.

Cuenat, P., Zufferey, E. i Kobel, D. (1990). La prévention des odeurs sulphydriques des vins par la centrifugation après la fermentation alcoolique. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 22, 5, 299-303.

Cuinier, C. (1979). Influence des fongicides sur les levures. *Vignes et Vins*, 285, 42-48.

Dominguez, J., Hernáez, J.L., Otero, D., Pastrana, L. i Pazos, Y. (1995). Los residuos antibióticos en las fermentaciones vinicas. Incidencias en la calidad del vino. *Viticultura y Enologia*. 111-123.

Dvorak, V. i Schopfer J.F. (1970). Rémanence de l'Euparène et vinification. *Rev. Suisse Vitic. Arboric.*; 2, 5, 99-104.

European Community (1990). Regulation N° 2676/90 determining the Community analysis methods applicable in the wine sector. *Off. J. Eur. Comm.* L272.

Fleet, G.H. i Heard, G.M. (1994). Yeasts: growth during fermentation. En: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Edited: G.H.Fleet. Harword Academic Publishers. Switzerland. pp. 27-54.

Foulonneau, C., Mollet, C., Durand, R., Roure, P., Bettuine, J.C. i Dufoulon, L. (1980). Conséquences oenologiques de l'emploi au vignoble de produits de lutte contre différents parasites ravageurs et accidents physiologiques de la vigne. Rapport au Comité Scientifique et Technique, Institut Technique du Vin.

Freydier, M., Cugier, J.P., de Cormis, L. i Foulonneau, C. (1989). Influences oenologiques éventuelles des traitements phytosanitaires et conséquences sur l'emploi des pesticides. *Progrès Agricole et Viticole*, 106, 11, 260-265.

Gartel, W. (1967). Action sur la vigne des produits chimiques utilisés dans la lutte contre les parasites et ses conséquences. Bull. OVI 40, 442, 1342-1351.

Girond, S., Blazy-Maugen, Michel, G. i Bosch, M. (1989). Influence de quelques pesticides viticoles sur les levures et la fermentation. *Revue Française d'Oenologie*, 119, 14-22.

Glories, Y. (1988). Les goûts de réduit. Seminario su: Odori e sapori dei vini. Rassegna Economica della Provincia di Alessandria, 3. Supplemento 4, 32-34.

Gnaegi, F. (1985). Fongicides viticoles et fermentation. *Revue Française d'Oenologie*, 99, 9-13.

Gnaegi, F., Aerny, J., Bolay, A. i Crettenand, J. (1983). Influence des traitements viticoles antifongiques sur la vinification et la qualité du vin. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 15, 4, 243-250.

Iñiguez, M. (1993). Estudio de los residuos de pesticidas desde la uva al vino, en diversos trabajos de campo i bodega. *Vitivinicultura*, 9-10, 41-49.

Maujean, A. (1989). Goûts anormaux dans les moûts et les vins en relation avec la présence de produits soufrés volatils. 4ème Symposium International des Métiers de la Vigne et du Vin: odeurs et goûts anormaux des Vins (non liés aux maladies microbiennes classiques), Forum oenologie, Macon, 25-26 Avril.

Minarik, E. (1979). Les pesticides et leur influence sur la fermentation. Intl. Congress on Microbiology in Food Industries, APRIA, 7-12 oct., Comptes-rendus, 65-84.

Minarik, E. i Regala, P. (1975). L'action sélectionnante des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins de cuve. 4ème Symposium d'oenologie international Valence. 212-237.

Monteil, H., Blazy-Maugen, F. i Michel, G. (1986). Influence des pesticides sur la croissance des levures des raisins et des vins. *Sciences des Aliments*, 6, 349-360.

Otero, D., Mañas, J.L. i Dominguez, J. (1993). Efecto de residuos antibióticos sobre poblaciones levaduriformes. Su incidencia en la calidad del vino (1). *Vitivinicultura*, 5-6, 35-39.

Painting, K. i Kirsop, B. (1990). A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 6, 346-347.

Peynaud, E., (1989). *Enologia pràctica. Conocimiento y elaboración del vino*. 3º edicion. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

Postma, E., Kuiper, W.F., Tomasouw, F., Scheffers, A. i van Dijken, J.P. (1989). Competition for glucose between the yeast *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida utilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 3214-3220.

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. i Sudraud, P. (1975). *Traité d'Oenologie. Sciences et Techniques du Vin*, Tome 2, Paris: Dunot.

Sala, C., Fort, F., Busto, O., Zamora, F., Arola, Ll. i Guasch, J. (1996). Fate of some Common Pesticides during vinification process. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 11, 3668-3671.

Sapis-Domerq, S. (1980). Étude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vins. Experimentation 1978 - 1979. Comparaison avec les résultats de 1975, 1976 et 1977. *Connaissance Vigne Vin.*, 14, 3, 155-181.

Sapis-Domerq, S., Bertrand, A., Joyeux, A., Lucmaret, V. i Sarre, C. (1978). Etude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vines. Expérimentation 1977. Comparaison avec les résultats de 1976 et 1975. *Connaissance Vigne Vin*, 12, 4, 245-275.

Sapis-Domerq, S., Bertrand, A., Mur, F. i Sarre, C. (1976). Influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore levurienne. *Connaissance Vigne Vin*, 10, 4, 369-389.

Sapis-Domerq, S., Bertrand, A., Mur, F. i Sarre, C. (1977). Influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore levurienne. Expérimentation 1976. *Connaissance Vigne Vin*, 11, 3, 227-242.

Schopfer, J.F. (1978). La rémanence des produits de traitement viticole antifongique et leur influence sur la vinification. *Ann. Technol. Agric.*, 27, (1), 383-393.

Soufleros, E. i Bertrand, A. (1979). Role de la souche de levure dans la production des substances volatiles au cours de la fermentation du jus de raisin. *Conn. Vigne Vin*, 3, 181-198.

Strehaiano, P. (1993). Les arrêts de fermentation: causes et facteurs. Données physiologiques. *Rev. Franç. Oenol.*, Mars-Avril, 140, 41-47.

Wenzel, K., Dittrich, H.H. i Bohnert, J. (1980). Schwefelrückstände auf trauben und im most und ihr einfluß auf die H₂S-bildung. *WeinWeis*, 35, 6, 414-420.

Zironi, R., Marchetti, R., Flori, P., Stanzani, R. i Roberti, R. (1981). Influenza degli antibiotritici Vinchlozolin, Iprodione e Procimidone sulla maturazione delle uve e sulle caratteristiche dei vini. *La Difesa delle Piante*, 5, 281-298.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

CAPÍTOL 3

3. EFECTE DE LA PRESENCIA DE COURE I DICLOFLUANIDA SOBRE LES ACTIVITATS HEXOQUINASA, ALCOHOL DESHIDROGENASA I H⁺-ATPasa.

3.1. INTRODUCCIÓ

A partir dels resultats que hem obtingut en el Capítol 2, els quals ens demostraven que tant a dosis de 50 ppm de coure (o superiors) com a dosis aproximades de 1 ppm de diclofluanida, existia un efecte clar sobre l'evolució del creixement i desenvolupament de la població de *Saccharomyces cerevisiae* que provocava un alentiment de la dinàmica fermentativa, iniciarem un estudi sobre les causes més probables d'aquest alentiment de la velocitat de la fermentació alcohòlica en aquestes condicions.

El nostre primer objectiu va ser iniciar un estudi de l'efecte del coure i de la diclofluanida sobre la principal via metabòlica que *Saccharomyces cerevisiae* utilitza per a degradar les hexoses, la via de la fermentació alcohòlica (Traverso-Rueda, 1980; Larue i col., 1984; Boulton i col., 1996). La via de les pentoses fosfat, que en altres organismes pot servir com una ruta alternativa pel catabolisme de la glucosa, en *Saccharomyces cerevisiae*, aquesta via només està involucrada en la producció de pentoses fosfat com a precursors d'àcids nucleics i en la regeneració del cofactor NADPH, necessari per una gran quantitat de reaccions anabòliques (Boulton i col., 1996). Per aquesta raó, el primer objectiu va ésser estudiar la influència de la presència de coure i diclofluanida sobre l'activitat de dos enzims, l'hexoquinasa (HQ) i l'alcohol deshidrogenasa (ADH), que juguen un paper clau en el control de la fermentació alcohòlica (Larue i col., 1984).

Saccharomyces cerevisiae, posseix dos isoenzims de la HQ (PI, i PII) no específics que assegurin la fosforilació de la glucosa, de la fructosa i de la manosa, així com també una glucoquinasa específica (Entian, 1980). L'activitat dels dos isoenzims està afectada quan els nivells d'etanol intracel·lulars incrementen (Navarro i col., 1982). Segons les condicions del medi (Eltayeb i col., 1982), *Saccharomyces cerevisiae* sintetitza quatre isoenzims de la ADH, el I, II, III i el IV (Lutsdorf i col., 1968; Ciriacy, 1975; Paquin i col., 1986; Walton i col., 1986), tot ells dependents de NAD⁺. No obstant durant la vinificació, el llevat desenvolupa només l'isoenzim ADH I (Singh i col., 1976; Kunkee, 1990), l'activitat del qual determinada al final de la fermentació varia segons les soques (Singh i col., 1977).

Segons Kihn i col. (1987) en un medi on hi han elevats continguts de coure, aquest catió pot ser retingut pels llevats ja sigui en la seva paret cel·lular (només una petita fracció), lligat a la superfície externa de la membrana plasmàtica o bé repartit dins la membrana i/o el citoplasma. La incorporació de coure en el citoplasma té lloc o bé per difusió simple (transport passiu a favor de gradient) o bé per un procés de transport particular (transport actiu contra gradient i amb requeriments energètics) (Zoroddu i col., 1989). Un cop aquest catió és dins el citoplasma, malgrat és essencial pel metabolisme dels llevats junt amb altres metalls pesants com el Zn, el Mn, el Fe etc., ja que estan involucrats en el funcionament de nombrosos enzims i proteïnes, pot esdevenir tòxic pels llevats segons la dosi en que es trobi. Es coneix que els llevats tenen la capacitat d'adquirir tolerància a determinades dosis tòxiques de metalls pesants (Mergeay, 1991). La detoxificació del citoplasma dels llevats es deu a unes proteïnes anomenades metalotionines (MT) (Ecker i col., 1986; Han i col., 1992;). Les MT són riques en residus de cisteïna i tenen la capacitat de quel·lar grans quantitats de metalls (Winge i col., 1985), concretament en el cas del coure se sap que poden arribar a immobilitzar més del 60% del catió del citoplasma associant-lo a la seva estructura (Butt i col., 1987). Malgrat tot això, Cooksey i col. (1992) i (Vidal, 1997) van observar una disminució de l'acumulació d'altres metalls essencials en presència d'elevats continguts de coure. Per aquesta raó, el segon objectiu d'aquest capítol serà, doncs, estudiar si l'elevat contingut de coure d'un most es capaç d'afectar la incorporació de Zn, ió metàl·lic divalent que actua (entre altres funcions) com a cofactor de l'enzim alcohol deshidrogenasa (ADH).

Una altra fita d'aquest capítol és estudiar el comportament de la H⁺-ATPasa durant la fermentació alcohòlica en presència del coure i de la diclofluanida. La bomba de protons és un dels principals sistemes de transport, forma aproximadament el 50% de les proteïnes de la membrana plasmàtica durant la fase exponencial del creixement cel·lular, i al voltant del 25% de les mateixes durant la fase estacionària (Serrano, 1991). S'ha estimat que consumeix entre el 10-15% de l'ATP produït durant el creixement dels llevats (Gancedo i col., 1988). La seva funció durant la fermentació alcohòlica és:

- el manteniment del pH intracel·lular, tant en el cas de l'acidificació citoplasmàtica que resultaria de l'activitat glicolítica (Benito i col., 1992), com en el cas de l'acidificació citoplasmàtica fruit dels canvis de permeabilitat de la membrana deguts als elevats nivells d'etanol que permenten l'entrada massiva de protons dins la cèl·lula (Kunkee i col., 1993).

- la regulació del transport d'aminoàcis. Majoritàriament el transport d'aminoàcids es realitza per simport. Els protons que entren dins la cèl·lula de llevat per aquest sistema, són excretats per prevenir l'acidificació citoplasmàtica i la mort cel·lular (Serrano, 1978).

3.2. MATERIALS I MÈTODES

3.2.1. ELS LLEVATS (Veieu capítol 2, apartat 2.2.1.)

3.2.2. EL MEDI DE CULTIU (Veieu capítol 2, apartat 2.2.2.)

Per tal de provocar una situació crítica pels llevats i així obtenir una resposta més clara dels mecanismes de *Saccharomyces cerevisiae* que poden quedar afectats, es va augmentar fins al 13%, el grau alcohòlic del most. En aquestes condicions, s'obté una densitat aproximada de 1085 mg/ml a la temperatura de 20°C, que correspon aproximadament a 220 g/l de sucres reductors.

3.2.3. ELS PESTICIDES (Veieu capítol 1, apartat 1.4., Taules 1a i 1b)

A partir dels resultats obtinguts en el capítol 2 d'aquest apartat, es seleccionaren el coure i la diclofluanida com únics pesticides que afectaven tant la dinàmica fermentativa com les poblacions de llevats. Les dosis escollides van ser 5 i 50 ppm de coure, que corresponen a una dosi normal i a una dosi sense guardar el període de seguretat. Per la diclofluanida es seleccionaren dosis de 1 i 3 ppm, ambdues corresponents a nivells assolits quan no es guarden els períodes de seguretat.

3.2.4. PREPARACIÓ DELS FERMENTADORS (Veieu capítol 2, apartat 2.2.4.a. i apartat 2.2.4.b.)

3.2.5. COMPTATGE DE LLEVATS (Veieu capítol 2, apartat 2.2.5.)

3.2.6. OBTENCIÓ DE PROTOPLASTS I HOMOGENITZACIÓ CEL·LULAR

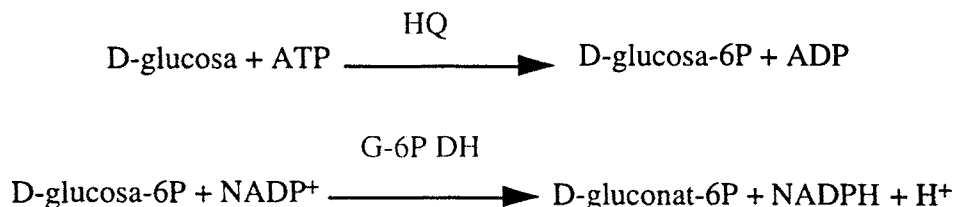
Aquest protocol és una modificació del mètode proposat per Menendez i col. (1995). Els dies 3, 7, 11 i 17 de fermentació, es recullen les mostres dels fermentadors, es fa el comptatge de viables per tal de poder treballar sempre amb una població cel·lular constant de 2×10^9 cèl.ules viables/ml. El volum de mostra que conté exactament la població desitjada, es centrifuga a 3000 g durant 5 minuts. Es renta i es torna a centrifugar tres vegades consecutives amb aigua destil·lada. El precipitat es resuspen en la solució A (Tris-HCl 5 mM, sorbitol 700 mM i ajustada a pH= 7,5, solució hipertònica que provocava la flacidesa del protoplast i per tant una major separació d'aquest respecte la paret cel·lular) fins que la suspensió aconsegueix una absorbància de 0,6 quan es llegeix a 800 nm i havent diluït 10 vegades. La liticasa (enzim que digereix la paret cel·lular) es dissol en la solució A, el volum de solució necessari per la dissolució d'aquest enzim correspon a 1/4 del volum final de la mostra, per tal d'aconseguir una concentració de 300 u/ml, i després s'afegeix a la mostra. Un

cop s'ha mesclat la mostra i l'enzim diluït, s'incorpora DTE (ditioeritritol, que és un antioxidant) amb una concentració final del conjunt de 6,5 mM, i es fa una lectura de l'absorbància a 800 nm. A partir d'ara es posa la mostra a incubar durant 105 minuts a 30°C i es torna a fer una lectura de l'absorbància a 800 nm. La producció de cèl.lules lliures de paret cel.lular (protoplast) ha de presentar un rendiment entre el 80-90% (relació d'absorbàncies d'abans i de després de la incubació). Un cop finalitzada la incubació, es renta i es centrifuga la mostra 2 vegades amb la solució A (10 ml), a 3000 g durant 5 minuts. El precipitat es resuspen en 10 ml de solució B (Mes-Tris 15 mM, sorbitol 500 mM, glucosa 100 mM i s'ajusta a pH= 6,5) i s'incuba 10 minuts a 30°C, per tal d'induir l'activació de H⁺-ATPasa de la membrana plasmàtica.(Serrano, 1983). Un cop a passat el temps d'incubació, es centrifuga la mostra a 3000 g durant 5 minuts i el precipitat es resuspen en 5 ml de solució C (Mes-Tris 25 mM, EDTA 5 mM, BSA 0,2% p/v, hidrolitzat de caseïna 0,2% p/v, DTE 1mM, PMSF 1 mM i s'ajusta a pH= 6,5) per tal d'homogenitzar els protoplasts mitjançant un xoc osmòtic. A partir d'ara es mantindrà la mostra a 4°C. Per obtenir una major eficiència en l'homogenització, podem utilitzar un homogenitzador Potter (hi passem suaument la mostra 5 vegades).

3.2.7. MESURA DE LES ACTIVITATS HEXOQUINASA I ALCOHOL DESHIDROGENASA

Un cop hem homogenitzat la mostra que mantindrem sempre a 4°C, s'agafa una alíquota de 0,5 ml i es col.loca en un tub Eppendorf on prèviament s'hi han pesat 0,3 g de perles de vidre (0,45 MM subministrades per Braun-Biotech S.A.), trecarem les vesícules amb un Vortex durant 30 segons. Passat aquest temps, es fa reposar la mostra a 4°C, per evitar l'escalfament de la mateixa i la possible pèrdua de l'activitat enzimàtica. Aquesta operació es repeteix 4 vegades. Finalment es procedeix a la mesura de les activitats enzimàtiques.

Per la mesura de l'activitat hexoquinasa (HQ) el mètode utilitzat és el proposat per Bergmeyer i col., (1974), que es basa en la determinació espectrofotomètrica de la formació de NADPH:



La determinació consisteix en introduir en una cubeta d'espectrofotòmetre les solucions següents: 0,5 ml de tampó trietanolamina (50 mM, pH= 7,6), 0,1 ml de MgCl₂ (0,1 M), 0,1 ml de NADP (/ml), 5 µl de glutatió (0,1 mg/ml) i 0,5 ml de glucosa (100 mg/ml) . La reacció

a 25°C, s'inicia amb l'addició de 50 µl d'extracte cel.lular a la cubeta de mesura. Al cap de 5 segons de l'inici de la reacció s'efectua la lectura d'absorbància a 340 nm durant 1 minut.

Per la mesura de l'activitat alcohol deshidrogenasa (ADH) el mètode utilitzat és el proposat per Bergmeyer i col., (1974), que es basa en la determinació espectrofotomètrica de la formació de NADH:



La determinació consisteix en introduir en una cubeta d'espectrofotòmetre les solucions següents: 1,2 ml de tampó pirofosfat sòdic (75 mM i s'ajusta a pH= 9), 50 µl de semicarbazida clorhídrica (2,2 M i s'ajusta a pH= 7), 0,1 ml de NAD⁺ (5 mg/ml), 5 µl de glutatió (0,1 mg/ml) i 50 µl d'etanol. La reacció a 25°C, s'inicia amb l'adició de 10 µl d'extracte cel.lular a la cubeta de mesura. Al cap de 5 segons de l'inici de la reacció s'efectua la lectura d'absorbància a 340 nm durant 1 minut.

La determinació de les activitats enzimàtiques es realitza en condicions de pH òptim, de concentracions de substrats i cofactors no limitants, de tal manera que l'únic factor limitant sigui la concentració i l'activitat de l'enzim. A partir de les lectures efectuades a l'espectrofotòmetre i mitjançant les següents fòrmules que inclouent el coeficient d'extinció molar dels compostos, es determinen els µmols de NADH i NADPH apareguts o desapareguts en 1 minut (Bergmeyer i col., 1974):

$$\text{HQ NADPH } (\mu\text{mol}) = \frac{\text{dAbs} \times \text{Vol } (\text{cm}^3)}{1 \text{ cm} \times 6,3 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}}$$

$$\text{ADH NADH } (\mu\text{mol}) = \frac{\text{dAbs} \times \text{Vol } (\text{cm}^3)}{1 \text{ cm} \times 6,3 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}}$$

Els µmols transformats per minut es passen a µKat (o µmols transformats per segon), valor que es refereix a quantitat de proteïna o bé a milions de cèl.lules per obtenir les activitats específiques de cada enzim.

3.2.8. MESURA DE LA H⁺-ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMÀTICA

La mesura de l'activitat de l'enzim H⁺-ATPasa es basa en la determinació de la quantitat de fosfat inorgànic alliberat, després d'incubar les mostres en presència de Mg i ATP. Aquest mètode consta de dues parts ben diferenciades:

A) Incubació (Menéndez i col., 1995)

A partir d'un medi d'incubació on hi havia Mes-Tris (50 mM), sacarosa (330 mM) i inhibidors de les altres ATPases i fosfatases cel·lulars: NaN_3 (1mM) inhibidor de la ATPasa mitocondrial; molibdat sódic (0,1 mM) que inihibeix les fosfatases àcides; KNO_3 (50 mM) que inihibeix les ATPases vacuolars; EDTA (0,1 mM) que acomplexa metalls, i ajustat a pH= 6, es varen fer tres tipus d'assaig:

- en el primer assaig la mostra s'incubava en el medi anterior en el prèviament s'hi havia afegit ATP (3 mM), MgSO_4 (3 mM) com a substrats de l'ATPasa i Tritó X-100 (0,03%) per trencar les vesícules de l'homogenitzat.

- en el segon assaig, que corresponia al blanc, la mostra s'incubava en el medi idèntic a l'anterior, amb la diferència de no afegir MgSO_4 (3 mM).

- en el tercer assaig es feia servir el mateix medi que en el primer assaig, però s'hi afegia ortovanadat (100 μM) com a inhibidor de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmàtica.

Es preparen tres bateries de tubs Eppendorf corresponents a cada assaig segons els medis d'incubació. En cadascun dels tubs Eppendorf s'incorporen 50 μl de mostra (homogenitzat que hem mantingut a 4°C) que conté 15 μg de proteïna, i 125 μl del medi d'incubació corresponent. Tots els tubs Eppendorf s'incuben a 30°C durant 20 minuts.

B) Quantificació de fosfats (Ohnishi i col., 1975)

Es preparen tres solucions:

Solució 1: 4% p/v de molibdat amònic, EDTA 16 mM

Solució 2: PVP (polivinil pirrolidona al 4% p/v), clorur d'hidroxilamina (172 mM), H_2SO_4 (87,5 mM).

Solució 3: Na OH (6,47 M) i Na_2CO_3 (50 mM).

En un vas de precipitat es fa una mescla de les solucions 1 i 2 en una proporció 2:3:1 (Solució 1: Solució 2: H_2O desionitzada, qualitat Milli-Q Millipore, amb un mínim de resistivitat específica de $18 \times 10^6 \Omega/\text{cm}$) Un cop ha transcorregut el temps d'incubació a cada tub Eppendorf s'hi incorpora 1 ml de la mescla anterior (que para la reacció i la prepara per ser colorejada posteriorment) i passats 2 minuts s'afegeixen 100 μl de la solució 3 (anomenada solució reveladora). Es deixa que el color es desenvolupi durant 10 minuts a temperatura ambient i es llegeix a l'espectrofotòmetre a 720 nm.

C) Càcul de l'activitat

Un cop llegides les mostres, els resultats de les absorbàncies obtinguts es tracten de la manera següent:

(Absorbància 1er. assaig - Absorbància Blanc)-(Absorbància 3er. assaig - Absorbància Blanc)

Els valors obtinguts després d'aquest tractament, s'interpolaran en una recta patró de fosfats que s'ha realitzat prèviament (de 0 a 0,5 mg/ml de fosfat inorgànic partint d'una solució mare de tampó fosfat 2mg/ml pH= 7,4) i obtindrem la concentració de Pi que ens servirà per a calcular la activitat H⁺-ATPasa. Aquesta activitat la expressarem com pKat/milló de cèl.lules o com pKat/mg de proteïna, segons el cas.

3.2.9. ANÀLISI QUANTITATIVA DE PROTEÏNES

L'anàlisi de la fracció proteica es realitza segons l'assaig del mètode proposat per Bradford (1976). Aquest mètode es basa en el canvi de coloració d'una solució colorant (Coomassie Brilliant Blue G-250) mesurada a 595 nm. El canvi de color es deu al lligament del colorant amb les proteïnes en medi àcid per formar un complex estable.

En un tub Eppendorf es col.loquen 200 µl de mostra diluïda (1:40), 600 µl d'aigua destil.lada i 200 µl de solució de colorant. S'agita i es deixa en repós durant 15 minuts perquè tingui lloc la reacció, un cop passat aquest temps es procedeix a la lectura a l'espectrofotòmetre a 595 nm. La quantitat de proteïna mesurada en µg/ml, es troba per interpolació en una la recta patró (de 0 a 25 µg/ml de proteïna, albúmina de serum boví al 5% p/v).

3.2.10. INCORPORACIÓ DE COURE I ZINC

Per quantificar la incorporació de coure i zinc pels llevats durant la fermentació alcohòlica, es posaren fermentadors control i fermentadors que contenen 50 ppm de coure. La presa de mostres es realitzà els dies 0, 3, 7 i 10 de fermentació. S'extreuen 10 ml de mostra, es centrifuguen a 3000 g durant 5 minuts. El precipitat es renta i es centrifuga tres vegades en 10 ml d'aigua desionitzada (qualitat Milli-Q Millipore) amb un mínim de resistivitat específica de $18 \times 10^6 \Omega/\text{cm}$, a 3000 g i durant 5 minuts. Es resuspen el precipitat en 0,5 ml d'aigua desionitzada (qualitat Milli-Q Millipore) i es digereix amb 2,5 ml àcid nítric ultrapur (Merk, Damstadt, Alemanya) durant 24 h a 120°C. Un cop realitzada la digestió s'analitzen les mostres per espectrofotometria d'absorció atòmica de flama (Hitachi Polaritzat Zeeman Model Z-8100) (Akirida-Demertzi i col., 1988).

La mesura de la captació de coure i zinc pels llevats en incubacions en solucions sintètiques es realitzà segons el protocol següent: s'extreuen 900 ml de mostra d'un fermentador control en tercer dia de fermentació (fase exponencial o logarítmica). Es centrifuga a 9000 g durant 5 minuts. El precipitat es renta i es centrifuga tres vegades amb 300 ml d'una solució sintètica (100 g/l de glucosa, 6 g/l d'àcid tartàric i ajustat a pH= 3,5), a 9000 g durant 5 minuts. El precipitat resultant es resuspen en 450 ml de solució sintètica. Per les mostres control s'agafen 50 ml de la suspensió anterior i s'hi incorporen 50 ml d'una solució sintètica control que conté 100 g/l de glucosa, 6 g/l d'àcid tartàric, 5 ppm de zinc i està ajustada a pH= 3,5, de tal manera que la concentració de Zn final serà de 2,5 ppm. Per les mostres de la determinació de la influència del coure sobre la incorporació de zinc, s'agafen 50 ml de suspensió i s'hi incorporen 50 ml de la solució sintètica control que conté a més 100 ppm de coure, de tal manera que les concentracions de Zn i Cu finals seran de 2,5 ppm i 50 ppm, respectivament. Tant les mostres control com les mostres de metalls s'incuben a 20°C en agitació constant i es van extraient alíquotes de 30 ml de mostra a 1, 2 i 3 h d'incubació. Cada alíquota es renta i es centrifuga tres vegades amb 10 ml d'aigua desionitzada (qualitat Milli-Q Millipore), a 3000 g durant 5 minuts. El sediment resultant es resuspendrà en 0,5 ml d'aigua desionitzada (qualitat Milli-Q Millipore) i es digereix amb 2,5 ml àcid nítric ultrapur (Merk, Damstadt, Alemanya) durant 24 h a 120°C. Un cop realitzada la digestió s'analitzen les mostres per espectrofotometria d'absorció atòmica de flama (Hitachi Polaritzat Zeeman Model Z-8100).

3.2.11. TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES MOSTRES

L'anàlisi estadística de les diferències dels grups respecte als controls, es va realitzar mitjançant la prova t de Student, amb el paquet estadístic Statview 4.0 (Abacus, USA).

3.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

a. Dinàmica fermentativa

En la Figura 3.4.1 mostrem la dinàmica fermentativa en presència de coure. Com era d'esperar a 5 ppm d'aquest pesticida inorgànic no s'observen diferències significatives respecte a la dinàmica dels fermentadors control. En canvi a 50 ppm, tal com ja havien apuntat en el capítol anterior i d'acord amb els resultats obtinguts per Akrida-Demertzi i col. (1990), hi ha un efecte clar del coure sobre la població viable que es tradueix en un retardament de l'evolució de la densitat.

En el cas de la diclofluanida (Figura 3.4.2) a 1 ppm, es mostra una lleugera davallada del nombre de llevats totals i viables en els estadis inicials de la fermentació, recuperant-se posteriorment, i amb un efecte clar sobre la densitat durant els primers dies. A

dosis de 3 ppm, els llevats totals i viables queden afectats tant en els estadis inicials com en els finals, provocant un marcat alentiment del consum de sucres i per tant de la fermentació alcohòlica.

b. Evolució del contingut proteic cel.lular

L'evolució del contingut proteic cel.lular durant la fermentació alcohòlica en presència de coure i diclofluanida el mostrem en la Figura 3.4.3. Es pot observar que en condicions control el contingut proteic cel.lular en relació al nombre de cèl.lules, puja paulatinament fins els darrers estadis de la fermentació.

En presència de 5 ppm coure (Figura 3.4.3.a) l'increment del contingut proteic és significativament igual al control durant els primers 11 dies de fermentació i serà en el 17è dia quan sofreixi una acusada davallada. A 50 ppm els dies 3er i 7é ens mostren continguts significativament iguals als del control, en el 11è dia s'assoleixen nivells significativament superiors per acabar caiguent pel devall dels valors observats en presència de 1 ppm de coure en el 17è dia de fermentació. Per tant podem dir que la presència de coure afecta el contingut proteic en els estadis finals de la fermentació alcohòlica.

La Figura 3.4.3.b ens mostra que el contingut proteic de les cèl.lules que han crescut en presència de 1 ppm de diclofluanida no queda afectat de manera significativa, mentre que en presència de 3 ppm d'aquest pesticida s'observa un increment de la concentració proteica fins al 7è dia de fermentació, posteriorment no hi han diferències amb el control. En termes generals podem afirmar que la presència de diclofluanida no afectarà de manera significativa el contingut proteic cel.lular (a excepció del 7é dia de fermentació i a la dosi de 3 ppm d'aquest plaguicida).

c. Les activitats hexoquinasa (HQ) i alcohol deshidrogenasa (ADH)

L'evolució de l'activitat HQ la presentem en les Figures 3.4.4 i 3.4.5 referides a població i a contingut proteic respectivament. En aquestes gràfiques es pot comprovar que l'activitat HQ dels llevats control augmenta progressivament durant la fermentació, quan la referim a la població de llevats. Quan la referim a mg de proteïna s'observa un comportament semblant en els primers dies de la fermentació, però es detecta una davallada en el dia 17.

El coure modifica significativament l'activitat d'aquest enzim. A 5 ppm d'aquest catió, s'observa una davallada de l'activitat quan la referim a població cel.lular (Figura 3.4.4.a) en canvi si referim l'activitat al contingut proteic, aquesta incrementa significativament (Figura 3.4.5.a). En presència de 50 ppm d'aquest metall, hi ha un increment significatiu de l'activitat HQ fins al 11é dia de fermentació (Figura 3.4.4.a), a partir d'aquí decreix pel davall de la dosi de 5 ppm, situació que no s'observa quan referim l'activitat

d'aquest enzim al contingut proteic (Figura 3.4.5.a.), en aquest cas l'activitat sempre es manté superior a les altres dues condicions.

En presència de 1 ppm de diclofluanida els valors de l'activitat HQ referida a població es mantenen iguals al control (Figura 3.4.4.b), el comportament d'aquest enzim canvia quan referim l'activitat al contingut proteic. En aquesta situació es pot veure que hi ha un increment significatiu de l'activitat HQ (Figura 3.4.5.b). En presència de 3 ppm de diclofluanida sempre s'observa un increment de l'activitat d'aquest enzim.

En condicions control, les Figures 3.4.6 i 3.4.7, ens mostren com l'activitat ADH segueix una trajectòria ascendent durant la fermentació alcohòlica, tot i que entre els dies 7é i 11é es manté més o menys estable.

En la Figura 3.4.7.a. s'observa com en presència de coure l'activitat ADH referida a contingut proteic és significativament igual tant a 5 ppm com a 50 ppm, a l'activitat del control, si exceptuem les petites diferències observades el dia 3 de fermentació. Aquesta situació no es reproduïx en la Figura 3.4.6.a., en la que podem observar com l'activitat d'aquest enzim referida a població cel.lular queda inhibida significativament en presència de 50 ppm de coure, coincidint també amb la reducció de cèl.lules viables que ens mostrava la Figura 3.4.1.

En presència de 3 ppm de diclofluanida el gran increment de l'activitat ADH assolit fins el dia 11 de fermentació, decau fortament fins el dia 17é en el que s'obtenen valors iguals als del control (Figures 3.4.6.b i 3.4.7.b). El comportament observat en presència de 1 ppm de diclofluanida, és d'un increment de l'activitat de l'enzim en qüestió referida a població cel.lular fins al dia 17 de fermentació (Figura 3.4.6.b). En canvi, quan referim l'activitat enzimàtica al contingut proteic (Figura 3.4.7.b) aquesta activació només es fa palesa fins el dia 7è, després els valors s'igualen als del control.

En termes generals podem afirmar que la presència de diclofluanida, que afectava de manera significativa la viabilitat cel.lular dels estadis inicials (en presència de 1 i 3 ppm) i finals (en presència de 3 ppm) de la fermentació alcohòlica causant un relentiment de la velocitat de la mateixa (Figura 3.4.2), tendeix a augmentar o si més no, ha mantingut els nivells de les activitats HQ i ADH. El coure presenta diferent comportament, depenent de si els resultats estan referits a població o contingut proteic cel.lular. Mentre l'activitat HQ referida a contingut proteic cel.lular està incrementada per ambdues dosis, quan la referim a població cel.lular presenta una significativa inhibició a 50 ppm d'aquest pesticida inorgànic. Pel que fa a l'activitat ADH, evoluciona de forma semblant al control quan la referim a

contingut proteic cel.lular. No obstant, a 50 ppm de coure l'activitat ADH referida a població cel.lular presenta una marcada davallada respecte al control.

El conjunt d'aquestes dades ens indiquen que la presència de coure i de diclofuanida a altes dosis poden modificar les activitats d'aquests enzims. Malgrat això, aquestes modificacions, no poden justificar els alentiments observats en el desenvolupament de la fermentació (Figura 3.4.1.), ja que sempre conserven una activitat potencial suficient per la degradació dels sucres (Larue i col., 1984).

d. Incorporació de coure i zinc

A partir de la pèrdua d'activitat de l'enzim ADH que ens mostrà la Figura 3.4.6.a. referida a població de llevats, ens plantejarem si realment aquesta davallada de l'activitat enzimàtica podria ser deguda al desplaçament del que és objecte el zinc quan en el medi (most) hi han elevades concentracions de coure (Cooksey i col., 1992; Vidal, 1997), sabent que la ADH conté Zn (ió metàlic divalent) íntimament unit a la seva estructura, és a dir l'utilitza com a cofactor.

En la Figura 3.4.8 presentem els resultats de concentració de coure i de zinc dels llevats durant la fermentació alcohòlica. En ella observem com la concentració de coure està significativament incrementada en els llevats dels fermentadors que contenen 50 ppm d'aquests metall, mentre en les cèl.lules dels fermentadors control la concentració es manté a nivells basals. En canvi, en les mateixes condicions, la concentració de zinc pels llevats dels fermentadors control s'incrementa fins el 3er dia (8,3 ng/milió de cèl.lules, aproximadament) es manté fins el 7è dia i després baixa (6,5 ng/milió de cèl.lules, aproximadament). Tanmateix la concentració de zinc dels llevats que han crescut en presència de 50 ppm de coure, es manté sempre a nivells basals.

Aquest efecte inhibidor del coure sobre la incorporació de zinc, també l'observem en condicions d'incubació dels llevats en solucions sintètiques (Figura 3.4.8).

El conjunt d'aquestes dades pot justificar l'inhibició de la ADH per presència de 50 ppm de coure, ja que al disminuir l'incorporació de zinc podria afectar la disponibilitat d'aquest cofactor de la ADH.

e. L'activitat H⁺-ATPasa

En les Figures 3.4.9 i 3.4.10 s'observa com l'activitat H⁺-ATPasa dels llevats que pertanyen als fermentadors control s'incrementa dràsticament entre els dies 3 i 7 de fermentació, probablement degut a la necessitat de mantenir l'homeostasi intracel.lular davant el transport d'aminoàcids i d'amoni (simport) (Serrano, 1978) així com també de fer front al

paulatí increment de la permeabilitat de la membrana induït per l'augment de la concentració d'etanol (Kunkee i col., 1993). Aquesta activitat es manté estable fins al dia 11 i posteriorment es detecta una forta davallada en el dia 17 de fermentació, probablement degut al fet de que el transport d'aquestes substàncies nitrogenades ja ha finalitzat. No obstant, els nivells d'activitat de la H^+ -ATPasa al final de la fermentació semblen mantenir-se a nivells suficients per compensar l'augment de la difusió de protons cap al citoplasma fruit dels canvis que sofreix la permeabilitat de la membrana plasmàtica enfront a les elevades concentracions d'etanol existents en aquestes condicions.

L'activitat H^+ -ATPasa queda fortament inhibida en presència dels dos pesticides estudiats, essent aquesta inhibició més acusada en els estadis inicials de la fermentació alcohòlica i en presència de coure, i recuperant-se posteriorment fins assolir, en el cas de la diclofluanida, els mateixos nivells que l'activitat del controls. En aquesta situació, el transport d'aminoàcids i d'amoni que té lloc al principi de la fermentació per tal de omplir les reserves necessàries pel metabolisme d'aquests compostos, possiblement es vegi afectat. En canvi, la posterior recuperació de l'activitat de la bomba de protons servirà per mantenir el pH intracel.lular davant l'acidificació d'aquest, a causa de l'activitat glucolítica i dels elevats nivells d'etanol (Benito i col., 1992; Kunkee i col., 1993).

Aquests resultats preliminars, ens fan considerar que la bomba de protons és un dels possibles mecanismes implicats en els alentiments i aturades de fermentació, ja que la presència de coure i diclofluanida provoquen una forta inhibició en els primers dies de la fermentació, la qual cosa es pot traduir en una disminució del transport actiu de nutrients necessaris per a la multiplicació cel.lular.

FIGURA 3.4.1 Evolució de la densitat i la població de llevats durant la fermentació alcohòlica. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica \pm Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte als controls.

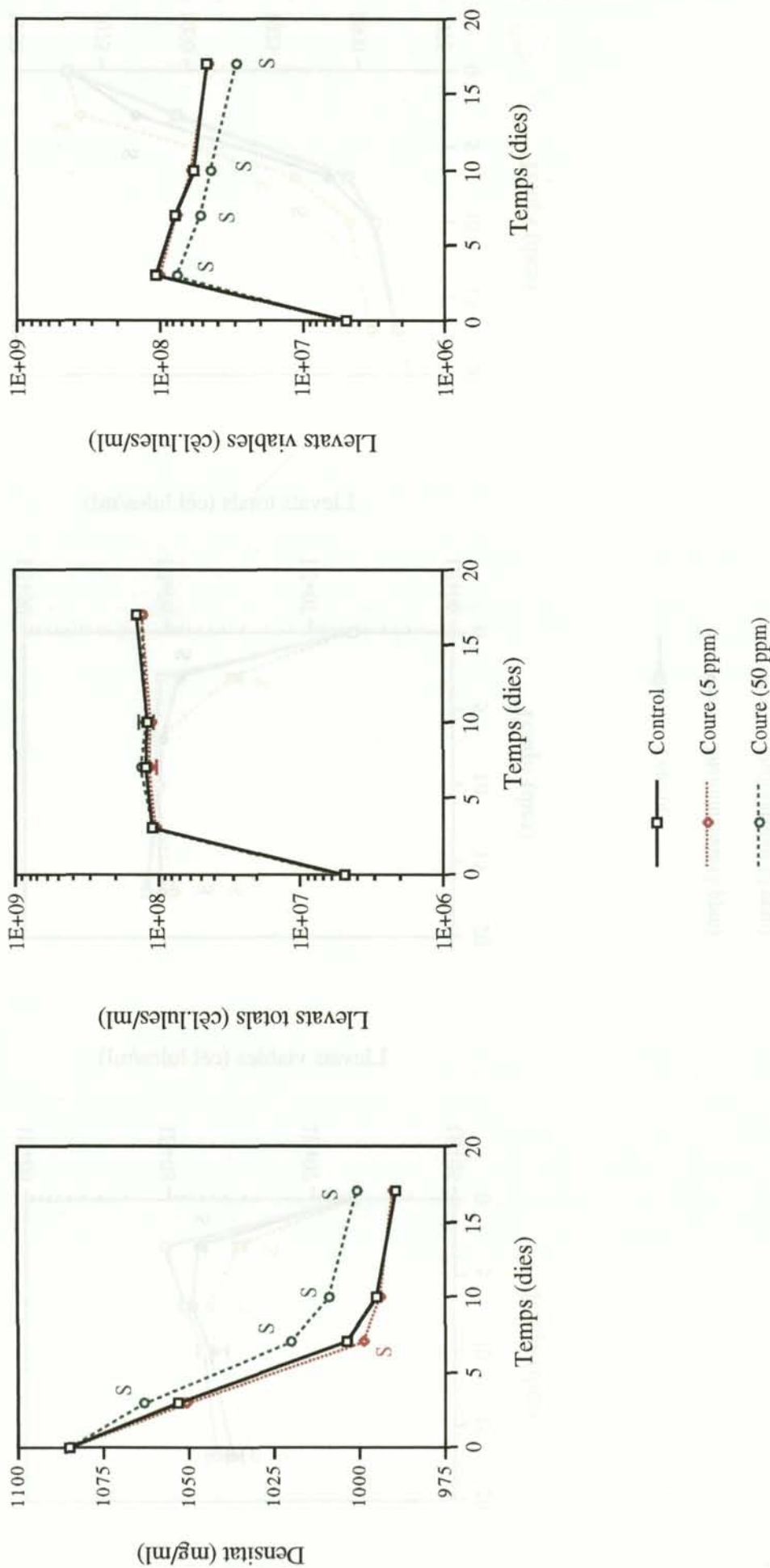


FIGURA 3.4.2 Evolució de la densitat i la població de llevats durant la fermentació alcohòlica. Els resultats es donen com la Mitjana \pm Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte als controls.

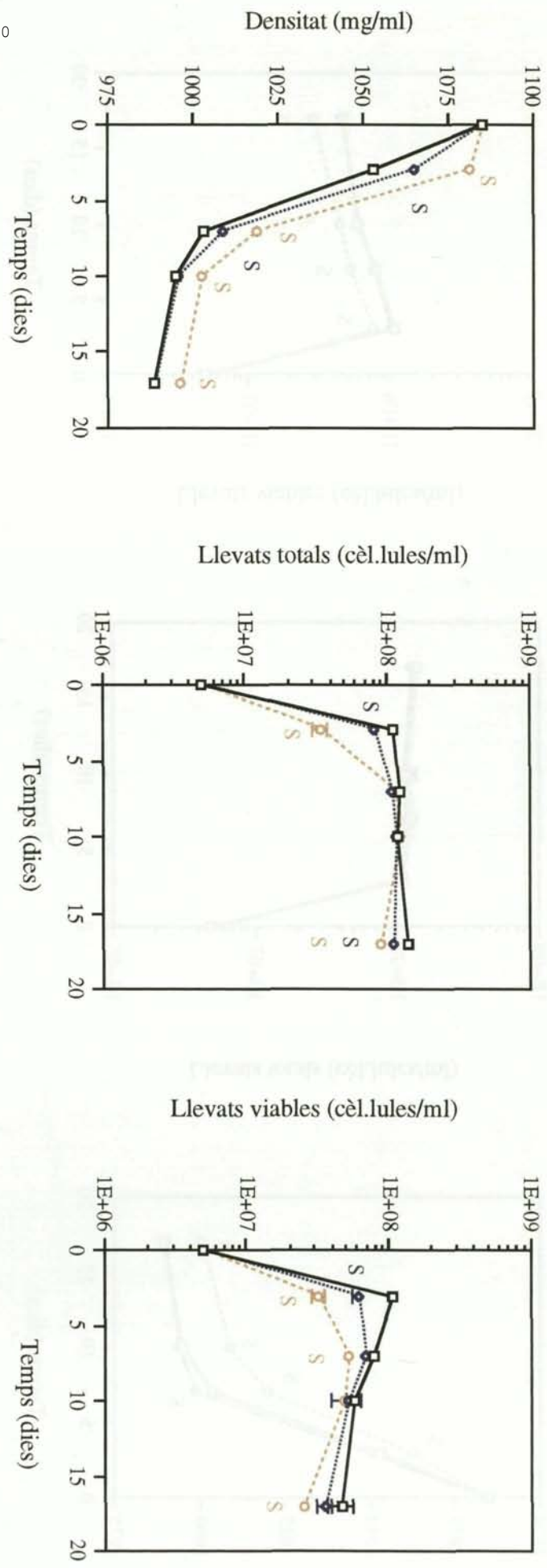
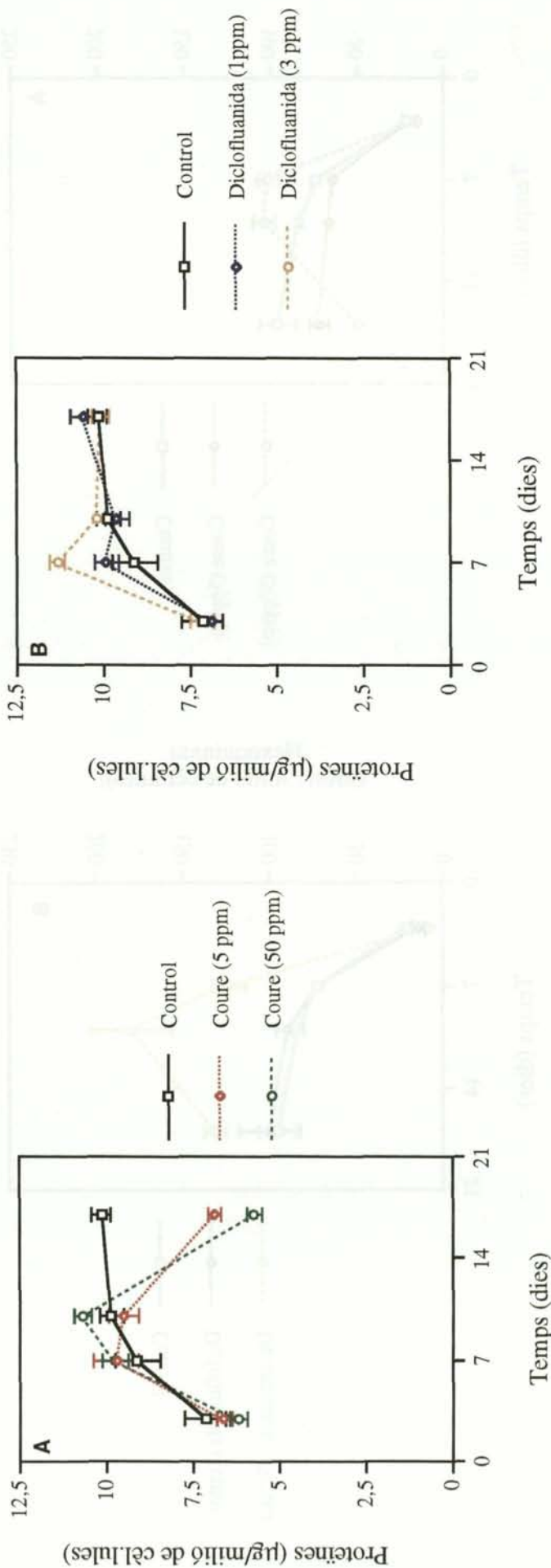


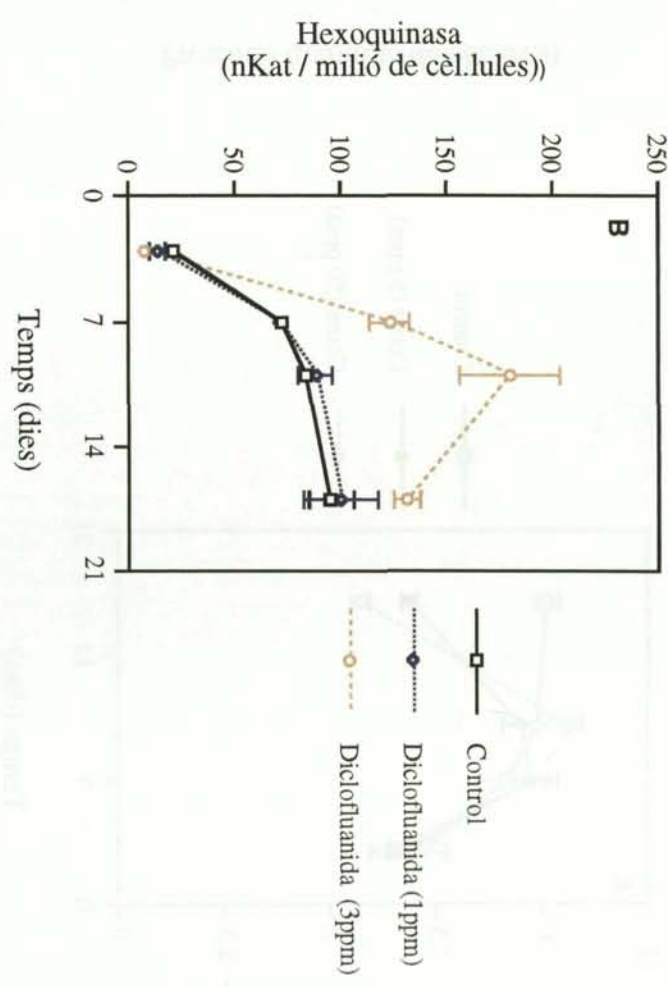
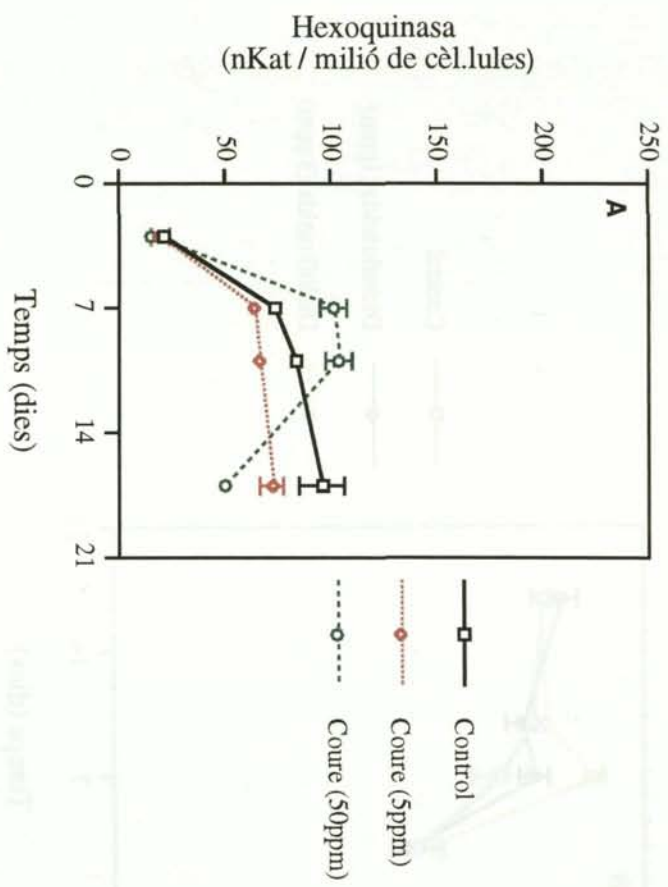
FIGURA 3.4.3 Evolució del contingut proteic cel·lular durant la fermentació alcohòlica. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte als controls.



	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Cu (5 ppm)	-	-	-	S
C - Cu (50 ppm)	-	-	S	S

	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Dc (1 ppm)	-	-	-	-
C - Dc (3 ppm)	-	S	-	-

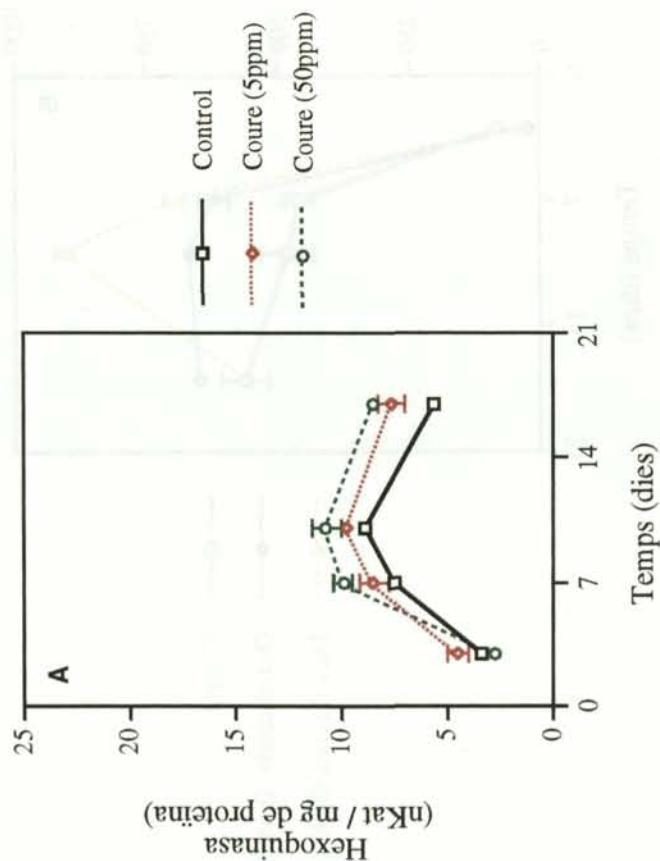
FIGURA 3.4.4 Evolució de l'activitat Hexoquinasa durant la fermentació alcohòlica. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte als controls.



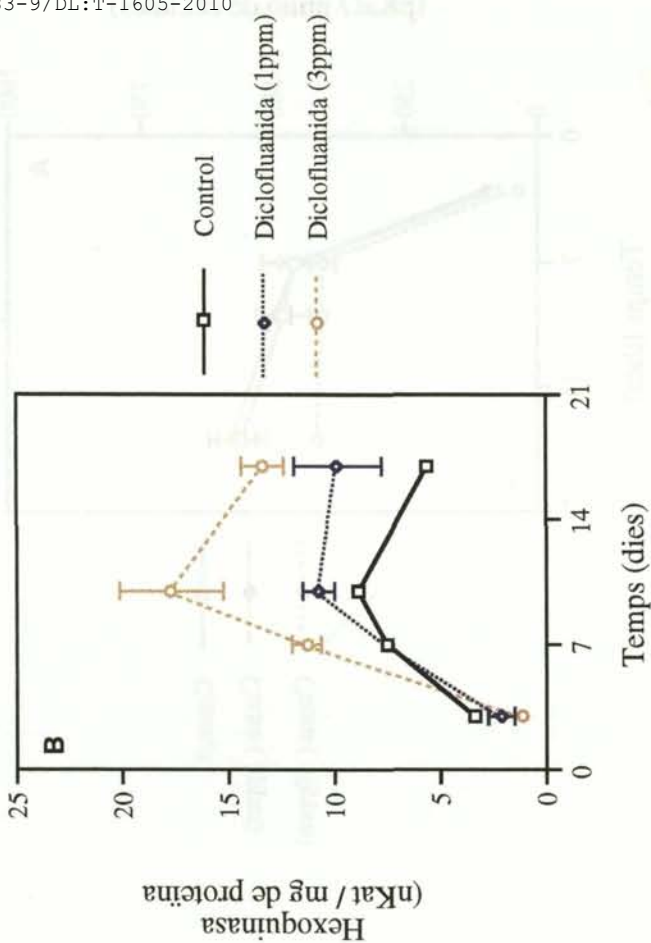
	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Cu (5 ppm)	-	S	S	S
C - Cu (50 ppm)	S	S	S	S

	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Dc (1 ppm)	S	-	-	-
C - Dc (3 ppm)	S	S	S	S

FIGURA 3.4.5 Evolució de l'activitat Hexoquinasa durant la fermentació alcohòlica. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica \pm Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte als controls.

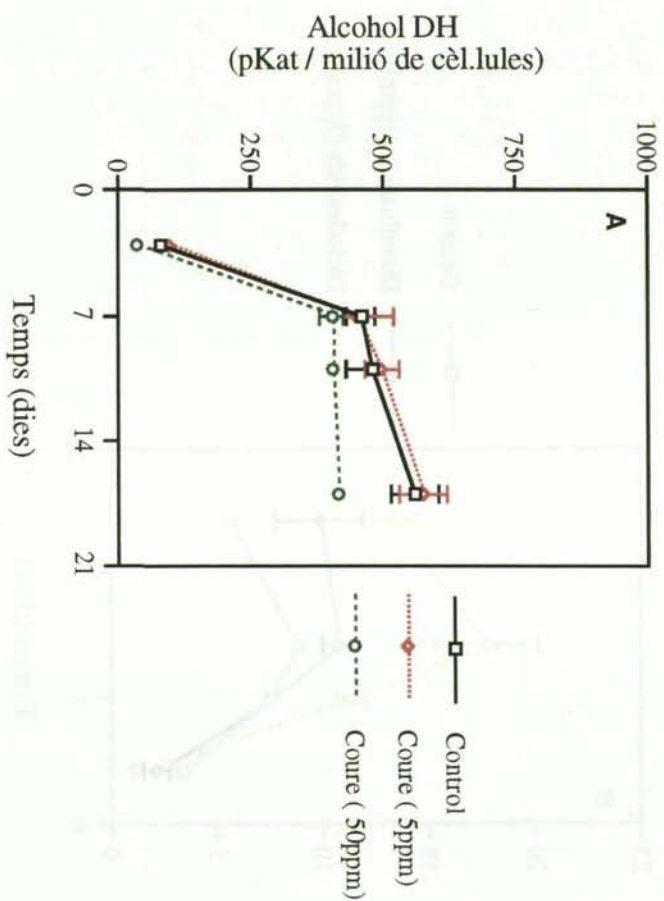


	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Cu (5 ppm)	S	-	S	S
C - Cu (50 ppm)	S	S	S	S

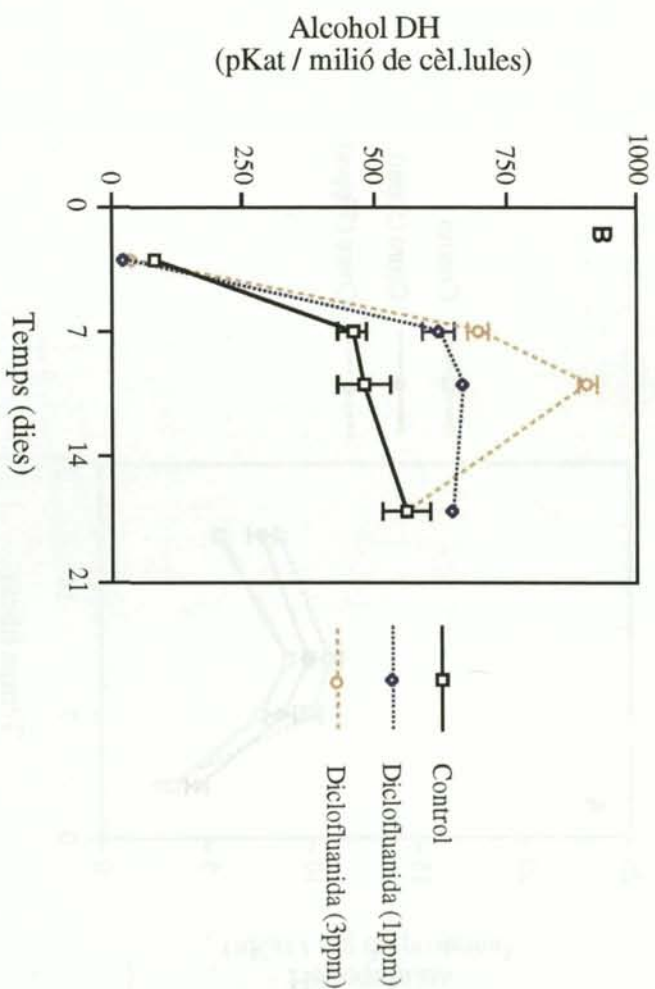


	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Dc (1 ppm)	S	-	S	S
C - Dc (3 ppm)	S	S	S	S

FIGURA 3.4.6 Evolució de l'activitat Alcohol deshidrogenasa durant la fermentació alcohòlica. Els resultats es donen com a Mitjana aritmètica \pm Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte als controls.

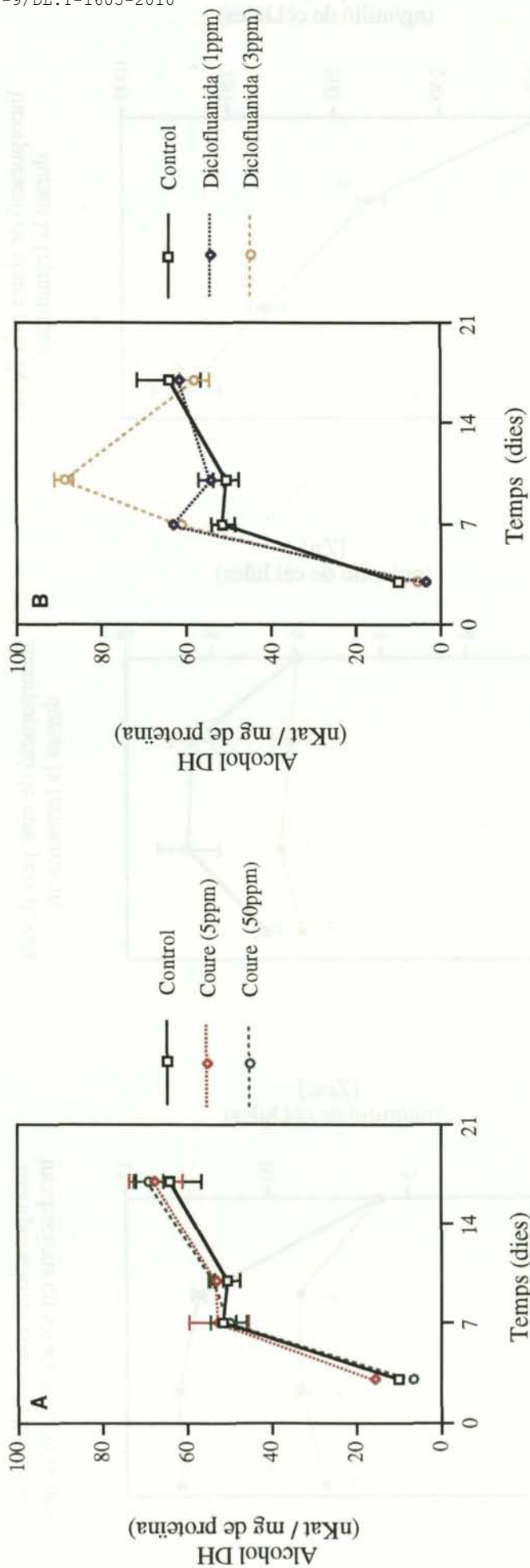


	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Cu (5 ppm)	S	-	-	-
C - Cu (50 ppm)	S	S	-	S



	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Dc (1 ppm)	S	S	S	S
C - Dc (3 ppm)	S	S	S	-

FIGURA 3.4.7 Evolució de l'activitat Alcohol deshidrogenasa durant la fermentació alcohòlica. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte als controls.

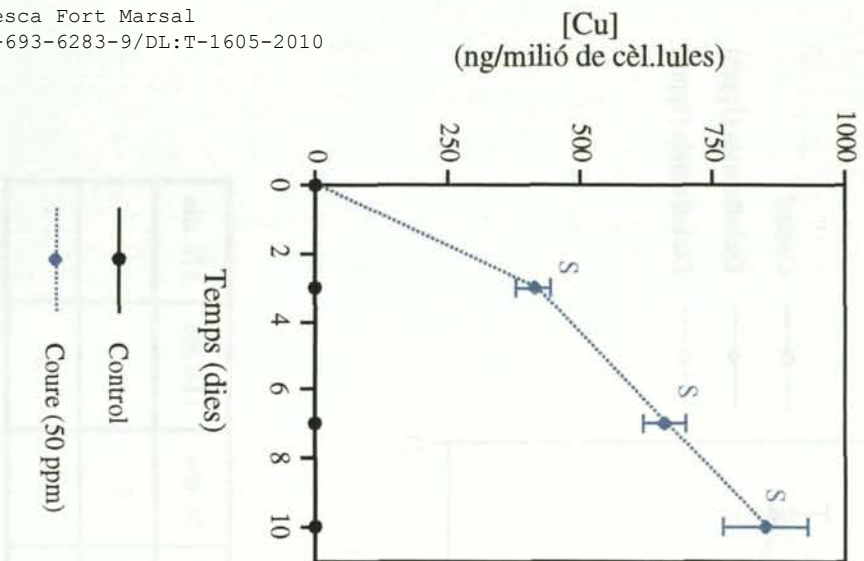


	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Cu (5 ppm)	S	-	-	-
C - Cu (50 ppm)	S	-	-	-

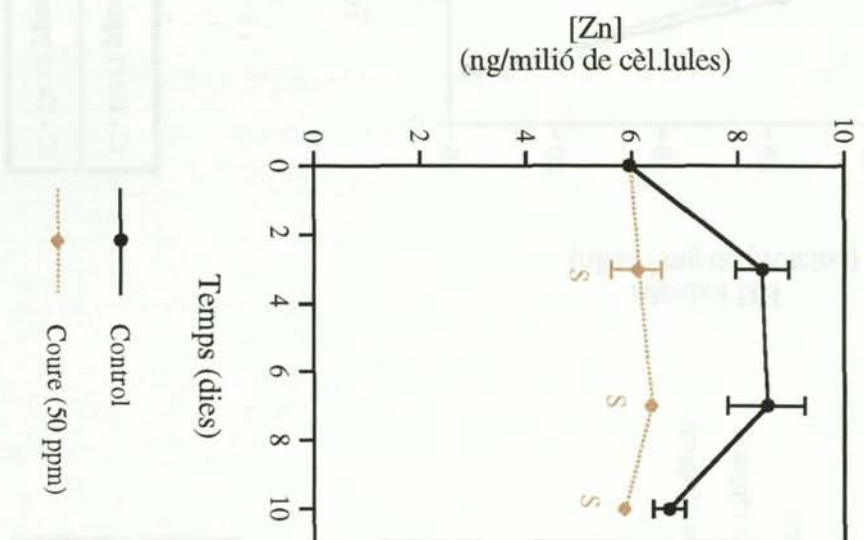
	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Dc (1 ppm)	S	S	-	-
C - Dc (3 ppm)	S	S	S	-

FIGURA 3.4.8 Incorporació de coure i zinc pels llevats en diferents condicions. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica \pm Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte als controls.

Incorporació de coure pels llevats durant la fermentació



Incorporació de zinc pels llevats durant la fermentació



Incorporació de zinc pels llevats en incubacions en solucions sintètiques

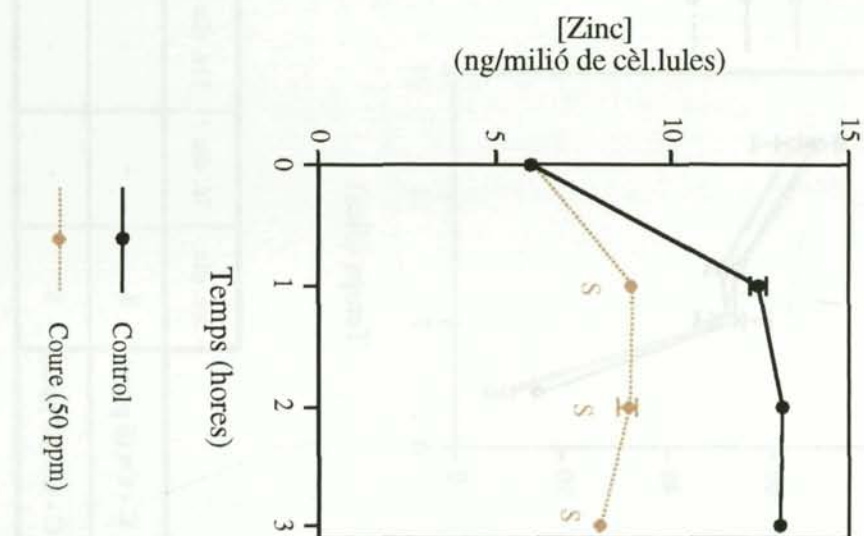
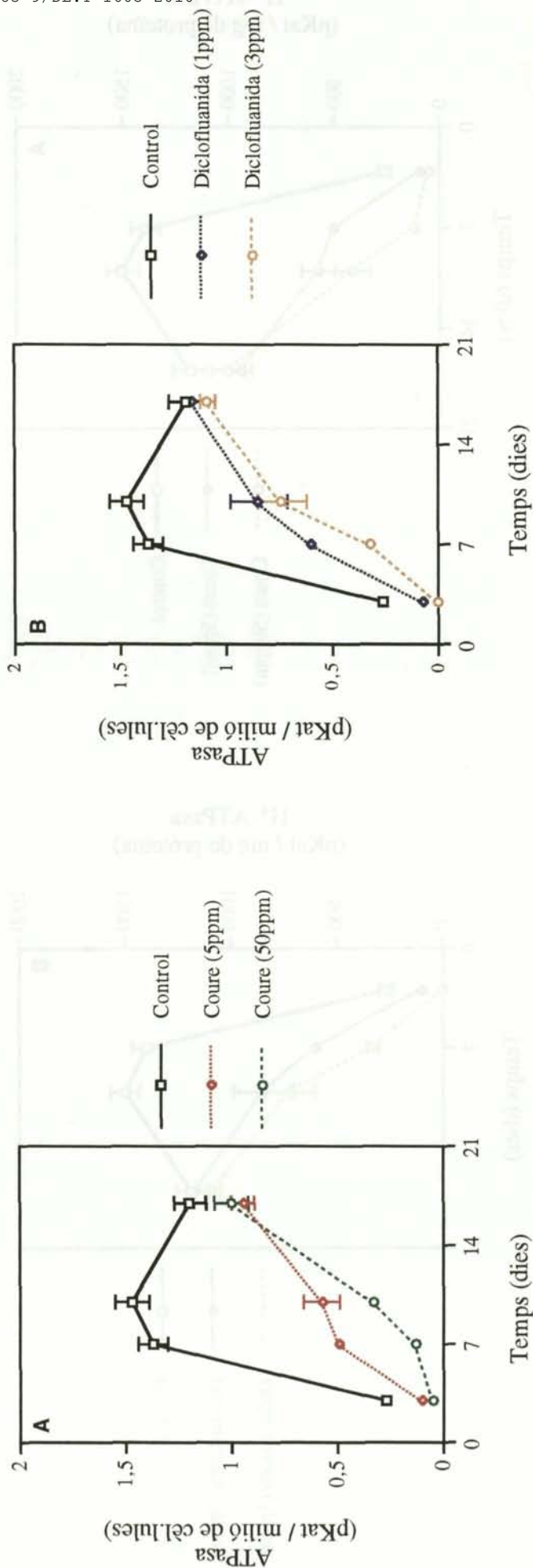


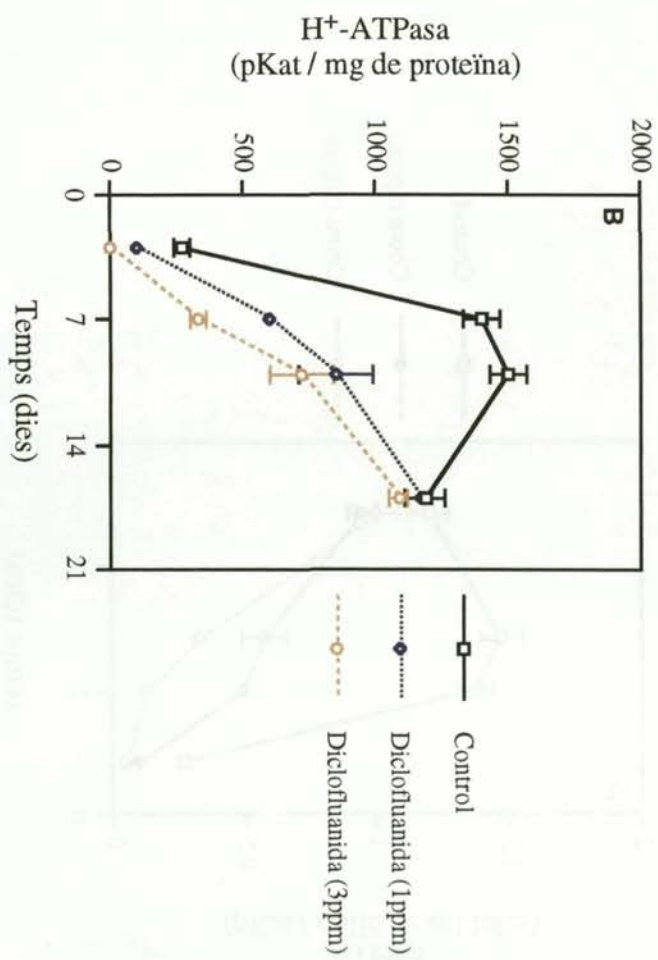
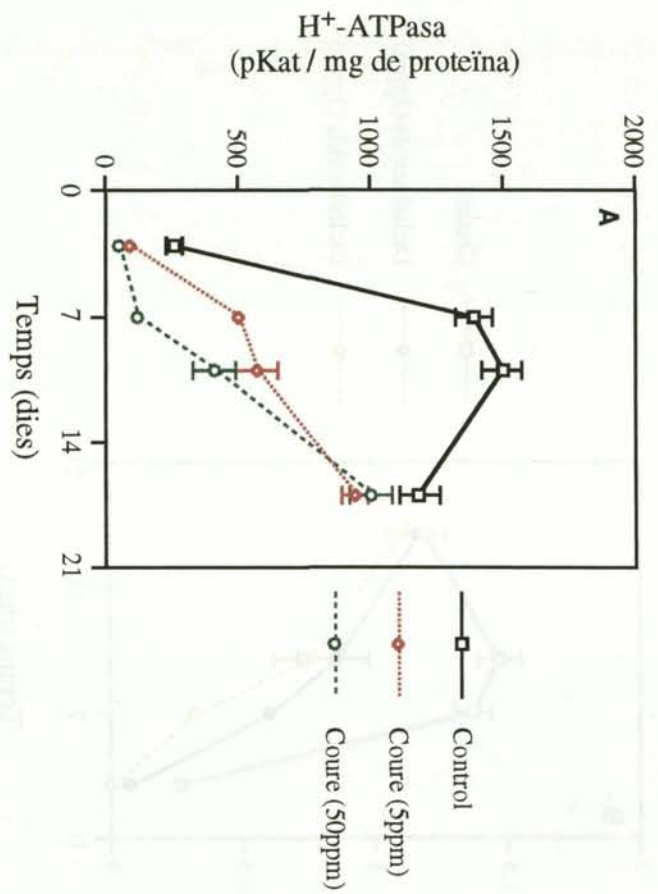
FIGURA 3.4.9 Evolució de l'activitat H^+ -ATPasa durant la fermentació alcohòlica. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica \pm Error típic de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte als controls.



	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Cu (5 ppm)	S	S	S	S
C - Cu (50 ppm)	S	S	S	S

	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Dc (1 ppm)	S	S	S	-
C - Dc (3 ppm)	S	S	S	-

FIGURA 3.4.10 Evolució de l'activitat H^+ -ATPasa durant la fermentació alcohòlica. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica \pm Error típus. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte als controls.



	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Cu (5 ppm)	S	S	S	S
C - Cu (50 ppm)	S	S	S	S

	3er. dia	7é. dia	11é. dia	17é. dia
C - Dc (1 ppm)	S	S	S	-
C - Dc (3 ppm)	S	S	S	-

3.5. CONCLUSIONS

1. Els nivells d'activitat hexoquinasa i alcohol deshidrogenasa dels llevats control augmenten paulatinament al llarg de la fermentació. L'activitat H^+ -ATPasa augmenta dràsticament entre els dies 3 i 7, per mantenir-se fins al dia 11 i disminuir posteriorment, en el dia 17.

2. La presència de coure a totes les concentracions estudiades provoca variacions de l'activitat hexoquinasa, si bé aquestes no són de massa importància. L'activitat de l'alcohol deshidrogenasa presenta una inhibició significativa en presència de 50 ppm de coure, tot i que les diferències respecte del control no són massa importants. En canvi, la H^+ -ATPasa es veu fortament afectada per la presència de coure sobretot en els primers estadis de la fermentació.

3. La diclofluanida produeix de forma sorprenent una activació tant de la hexoquinasa com de l'alcohol deshidrogenasa. Tanmateix, la H^+ -ATPasa està dràsticament inhibida per la seva presència especialment en els primers estadis de la fermentació.

4. L'addició d'elevades dosis de coure al most, indueix una disminució de la incorporació de zinc pels llevats. Això podria justificar la inhibició de la ADH per la presència de 50 ppm de coure, ja que al disminuir la incorporació de zinc, la disponibilitat d'aquest cofactor de la ADH pot estar limitada.

5. Les variacions de les activitats HQ i ADH induïts per la presència de coure i diclofluanida no semblen poder justificar els alentiments observats en el desenvolupament de la fermentació, ja que sempre conserven una activitat potencial suficient per la degradació dels sucres. En canvi, l'efecte inhibidor del coure i la diclofluanida sobre la H^+ -ATPasa al començament de la fermentació sí que podrien justificar aquests alentiments, ja que podria implicar una disminució del transport actiu de nutrients necessaris per a la multiplicació cel·lular.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA

**ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA DEL COURE I LA
DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA
FERMENTATIVA I EL METABOLISME DE**
Saccharomyces cerevisiae



Memòria presentada per
MARIA FRANCESCA FORT MARSAL
per optar al grau de Doctora en Ciències Químiques
sota la Direcció del Dr. Lluís Arola Ferrer i del Dr. Fernando Zamora Marín

3.6. BIBLIOGRAFIA

Akirida-Demertzi, K.; Demertzis, P.G.; Koutinas, A.A. (1988). pH and trace-elements content in raisin extract industrial-scale alcoholic fermentation. *Biotechnol.Bioeng.*, 31, 7, 666-669.

Akrida-Demertzi, K., Drainas, C. i Koutinas A.A. (1990). Significance of copper in alcohol production with fermentation of raisin extracts by the cell recycle process. *J. Food Sci.*, 55, 6, 1588-1616.

Benito, B., Portillo, F. i Lagunas, R. (1992). In vivo activation of the yeast plasma membrane ATPase during nitrogen starvation. *Federation of European Biochemical Societies*, 300, 271-274.

Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. i Grassl, M. (1974). Alcohol dehydrogenase. En *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed. by H.U. Bergmeyer. Vol. 1, pp. 428-429. 2nd. Ed., Verlag Chemie International, Deerfield Beach, Florida.

Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. i Grassl, M. (1974). Alcohol dehydrogenase. En *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed. by H.U. Bergmeyer. Vol. 1, pp. 473-474. 2nd. Ed., Verlag Chemie International, Deerfield Beach, Florida.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 77, 248-254.

Butt, T.R. i Ecker, D.J. (1987). Yeast metallothionein and applications in biotechnology. *Microbiol. Rev.*, 51, 351-364.

Ciriacy, M. (1975). Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and genetic analysis of *adh* mutants. *Mutation Research*, 29, 315-326.

Cooksey, D.A. i Azad, H.R. (1992). Acumulation of copper and other metals by copper-resistant plant-pathogenic and saprophytic *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 274-278.

Does, A.L. i Bisson, L.F. (1989). Comparison of glucose uptake kinetics in different yeast. *J. Bacteriol.*, 171, 1303-1308.

Ecker, D.J., Butt, T.R., Sternberg, E.J., Neeper, M.P., Debouk, C., Gorman, J.A. i Cooke, S.T. (1986). Yeast metallothionein function in metal detoxification. *J. Biol. Chem.*, 261, 16895-16900.

Eltayeb, Y. i Berry, D.R. (1982). Studies on levels of isoenzymes of alcohol dehydrogenase during growth and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 79, 2, 247-251.

Etian, K.D., (1980). Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. *Molec. Gen. Genet.*, 178, 633-637.

Gancedo, C. i Serrano, R. (1988). Energy yielding metabolism. En *The Yeasts*, 2nd. edition (ed. A.H. Rose and J.S. Harrison), Vol. 3. p. 205. Academic Press, New York.

Gupta, I., Jain, V.K. i Mishra, R.K. (1981). Studies on the effects of 2 deoxy-D-glucose on glucose uptake and glycolysis in respiratory-deficient yeast cells. *Indian J. Experim. Biol.*, 19, 231-237.

Han, N.S., Seo, J.H. i Chung, Y.Ch. (1992). Growth and copper resistance of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing a metallothionein gene. *Biotech. Letters*, 14, 1, 7-11.

Kihn, J.C., Mestdagh, M.M. i Rouxhet, P.G. (1987). ESR study of copper (II) retention by entire cell, cell walls and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.*, 33, 777-782.

Kunkee, R.E. (1990). Some relationships between the strain of wine yeast and its tolerance to ethanol or to other products of alcoholic fermentation. En *Actualities Oenologiques* 89, P. Ribèreau-Gayon and A. Lonvaud, Eds., 238-242. Paris: Dunot.

Kunkee, R.E. i Bisson, L.F. (1993). Wine-making yeasts. En *The yeasts*, 2nd ed., Vol. 5, A.H. Rose i J.S. Harrison, Eds., pp. 69-127. London: Academic Press.

Lafon-Lafourcade, S., Geneix, G. i Ribereau-Gayon, P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeast and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1246-1249.

Larue, F., Lafon-Lafourcade, S. i Ribèreau-Gayon, P. (1984). Relation entre les difficultés de fermentation et certaines activités enzymatiques de la levure. *Conn. Vigne Vin*, 18, 4, 219-224.

Lutsdorf, V. i Megnet, R. (1968). Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 126, 933-944.

Menéndez, A., Larsson, C. i Ugalde, U. (1995). Purification of functionally sealed cytoplasmic side-out plasma membrane vesicles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Analy. Biochem.*, 230, 308-314.

Mergeay, M. (1991). Towards understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *TiBTECH*, 9, 17-24.

Navarro, J.M. i Finck, J.D. (1982). Evolution de l'activité "hexokinase" de *Saccharomyces uvarum* fermentant le saccharose. *Cell. Mol. Biol.*, 1, 85-89.

Paquin, C.E. i Williamson, V.M. (1986). Ty insertion at two loci account for most of the spontaneous antimycin A resistance mutations during growth at 15°C of *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking ADHI. *Molec. Cell. Biol.*, 6, 70-79.

Salmon, J.M. 1989. Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 953-958.

Salmon, J.M., Vincent, O., Mauricio, J.C., Bely, M. i Barre, P. (1993). Sugar Transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 56-64.

Serrano, R. (1978). Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Cell. Biochem.*, 22, 51-63.

Serrano, R. (1983). In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Letters*, 156, 11-14.

Serrano, R. (1991). Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. En *The molecular and cellular biology of the yeast*, by J.R. Broach, J.R. Pringle and E.W. Jones, Ed. Cold Spring Harbour. Vol. I, pp. 523.

Singh, R. i Kunkee, R. (1976). Alcohol dehydrogenase activities of wine yeasts in relation to higher alcohol formation. *Appl. Environm. Microbiol.*, 32, 5, 666-670.

Singh, R. i Kunkee, R. (1977). Multiplicity and control of alcohol dehydrogenase isoenzymes in variations strains of wine yeasts. *Arch. Microbiol.*, 114, 255-259.

Slonimski, P.P. (1955). Adaptation respiratoire: développement du système hémoprotéique induit par l'oxygène. *Proceedures 3rd International Congress Biochem.*, Bruxelles. Acad. Press, New York, 242-247.

Traverso-Rueda, S. (1980). A quantification of the stimulatory effect of sterols on the growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* under vinification conditions. PH. D. thesis, University of California, Davis.

Vidal, M.T. (1997). Interaccions dels pesticides, especialment el coure, amb els bacteris làctics del vi i efectes sobre la fermentació malolàctica. Tesi Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona.

Walton, J.D., Paquin, C.E., Kaneko, K. i Williamson, V.M. (1986). Resistance to Antimycin A in yeast by amplification of ADH4 on a linear, 42 kb palindromic plasmid. *Cell*, 46, 857-863.

Winge, D.R., Nielson, K.B., Gray, W.R. i Hamer, D.H. (1985). Yeast metallothionein: sequence and metal binding properties. *J. Biol. Chem.*, 260, 14464-14470.

Zoroddu, M.A., Berardi, E. i Fatichenti, F. (1989). ERP Study of copper (II) retention by thermotolerant *Hansenula polymorpha*. En 7th. International Symposium on Yeast. Yeast 5 Special Issue by John Wiley and Sons Ltd. April. pp. 323-327.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

CAPÍTOL 4

4. ESTUDI DE LA INCORPORACIÓ DE GLUCOSA

4.1. INTRODUCCIÓ

Saccharomyces cerevisiae presenta una elevada velocitat de glucòlisi en la fase exponencial del seu creixement durant les primeres fases de la fermentació alcohòlica (Lagunas i col., 1982; Mauricio i col., 1992). Tanmateix s'observa una important davallada de la velocitat de la glucòlisi durant la fase estacionària (Boulton, 1980; Larue i col., 1982; Salmon, 1989) sense que les activitats dels enzims de la via glucolítica quedin alterades (Dombek i col., 1987; Larue i col., 1984). Nogensmenys, la inducció genètica d'una sobreproducció dels enzims d'aquesta via en llevats, es tradueix en un increment de l'activitat dels enzims, tot i que no s'observi un increment en la velocitat de producció d'etanol (Schaaff i col., 1989; van de Aar i col., 1990). Per això, el transport de sucres sembla ser el factor limitant de la regulació de la velocitat del metabolisme glucídic durant la fermentació alcohòlica en *Saccharomyces cerevisiae* (Does i col., 1989; Salmon i col., 1993). Fins i tot, alguns autors han postulat que una de les possibles causes dels alentiments i aturades de fermentació, podria ser la inhibició del transport d'hexoses en *Saccharomyces cerevisiae* durant la fermentació alcohòlica (Lafon-Lafourcade i col., 1984; Salmon, 1989; Salmon i col., 1993).

La captació de glucosa i fructosa per *Saccharomyces cerevisiae* es realitza mitjançant dos sistemes de transport, un de baixa afinitat ($K_m = 20-50$ mM per la glucosa) (Lang i col., 1987; van Urk i col., 1989) i un d'alta afinitat ($K_m = 0,5-1$ mM per la glucosa) (Bisson i col., 1983; Ongjoco i col., 1987). Mentre el sistema de transport de baixa afinitat sembla ser constitutiu, el component d'alta afinitat depèn de les condicions del medi (Does i col., 1989) de tal manera que en presència d'altres concentracions de sucres està reprimit (Bisson i col., 1987). No obstant, els llevats desreprimeixen el transportador d'alta afinitat quan les concentracions de glucosa del medi són baixes (Bisson i col., 1984; Ramos i col., 1989) (Veieu l'apartat 2.2.1. de la Introducció).

En condicions d'elevades concentracions de glucosa i fructosa, com és cas del most, *Saccharomyces cerevisiae* incorpora les hexoses mitjançant el sistema de transport de baixa afinitat. Serà en els estadis finals de la fermentació (a concentracions de glucosa i fructosa baixes) quan el transportador d'alta afinitat s'activarà acabant d'incorporar els darrers grams de sucre (Sanz i col., 1994).

L'objectiu d'aquest capítol és esbrinar si el sistema de transport de sucres en *Saccharomyces cerevisiae* és realment un pas limitant o regulador de la fermentació alcohòlica en condicions de vinificació, i si aquest mecanisme pot estar implicat en els alentiments i aturades de la fermentació alcohòlica. Per aquest motiu s'ha estudiat en profunditat la influència de diversos paràmetres característics del most i de la seva paulatina conversió cap a vi sobre la captació de sucres, tals com l'efecte de diferents concentracions de glucosa, d'etanol, d'anhídrid sulfurós, de fructosa, de l'acidesa total i com afecten els diferents pH.

4.2. MATERIALS I MÈTODES

4.2.1. ELS LLEVATS (Veieu capítol 2, apartat 2.2.1.)

4.2.2. EL MEDI DE CULTIU (Veieu capítol 2, apartat 2.2.2.)

Per tal de provocar una situació crítica pels llevats i així obtenir una resposta més clara dels mecanismes de *Saccharomyces cerevisiae* que poden quedar afectats, es va augmentar fins al 13%, el grau alcohòlic del most. En aquestes condicions, s'obté una densitat aproximada de 1085 mg/ml a la temperatura de 20°C, que correspon aproximadament a 220 g/l de sucres reductors.

4.2.3. PREPARACIÓ DELS FERMENTADORS (Veieu capítol 2, apartat 2.2.4.a. i apartat 2.2.4.b.)

4.2.4. COMPTATGE DE LLEVATS (Veieu capítol 2, apartat 2.2.5.)

4.2.5. MESURA DE L'ACTIVITAT DEL TRANSPORTADOR D'HEXOSES

Segons la recerca bibliogràfica que realitzarem per poder dur a terme el nostre estudi sobre la mesura de l'activitat del transportador d'hexoses, el protocol més utilitzat era el mètode proposat per Serrano i DelaFuente (1974) amb les modificacions introduïdes posteriorment per Bisson i Fraenkel (1983) i Busturia i Lagunas (1986). Aquests protocols es basen en la utilització de glucosa o bé anàlegs estructurals de la mateixa marcats radioactivament, i utilitzats en polsos de temps molt curts. Per tal d'optimitzar el mètode experimental proposat i adaptat pels autors esmentats anteriorment, en aquest treball també es proposen algunes modificacions d'aquest mètode que faciliten el procediment.

a. Mètode proposat per Serrano i DelaFuente (1974)

Aquest mètode modificat per Bisson i Fraenkel (1983a) utilitza glucosa marcada per mesurar l'activitat del transportador d'hexoses, amb un temps d'incubació de 5 segons. Busturia i Lagunas (1986) utilitzen la xilosa com anàleg estructural marcat radioactivament per estudiar aquest transport, amb un temps d'incubació de 1 minut. En el present treball hem reproduït el mètode de Busturia i Lagunas (1986) amb unes petites adaptacions i utilitzant però, 2-desoxi-D-glucosa marcada. No s'ha experimentat amb glucosa marcada degut a la gran perillositat que comporta la seva manipulació i a la dificultat que suposa treballar amb temps d'incubació de 5 segons.

S'extreu la mostra del fermentador que es troba en fase exponencial o logarítmica (3er. dia de fermentació), es fa el comptatge de viables per treballar sempre amb una població constant de 1×10^9 cèl.lules/ml viables. Es centrifuga la mostra a 3000 g durant 5 minuts i es resuspen en quatre solucions sintètiques que contenen totes elles 6 g/l (0,04 M) d'àcid tartàric, concentracions de xilosa freda de 9,99; 30; 49,95 i 99,9 mM respectivament i s'ajusten les solucions a pH= 3,5. Després es renta i es centrifuga la mostra tres vegades a 3000 g durant 5 minuts amb aquestes solucions i s'agafa una alíquota de 100 µl que es col.loca en un tub Eppendorf, s'incorpora en cada tub 50 µl de xilosa marcada i en aquestes condicions tindrem en cada tub una concentració de xilosa de 6,66; 20; 33,3 i 66,6 mM que correspondrà a una activitat específica de 366,7; 183,3; 111,1 i 37 MBq/mM respectivament. S'incuben els tubs Eppendorf durant 1 minut exacte a 20°C i s'atura la reacció afegint 0,8 ml de solució salina molt freda (4°C) al 0,8%. Es renten i es centrifuguen les mostres tres vegades a 3000 g durant 5 minuts amb la solució sintètica corresponent i es passen als vials de comptatge. Es digereixen les mostres en presència de 0,5 ml de NaOH 2 M durant 30 minuts en un bany a 65°C. Finalment, s'afegeix el líquid d'escintil·lació i es procedeix al comptatge de la radiació β .

Per l'obtenció dels vials de referència (R), es procedeix de la mateixa manera que acabem d'explicar (per cada concentració de sucre), l'única diferència és que aquests no s'incuben, es passa directament a la digestió amb NaOH.

Quan treballem amb 2-desoxi-D-glucosa marcada es procedeix de manera idèntica, amb l'única diferència que els medis sintètics es fan amb glucosa freda per evitar la toxicitat que comportaria pels llevats, fer la incubació en presència d'elevades concentracions de 2-desoxi-D-glucosa (Novak i col., 1991; Sanz i col., 1994; Slaughter i col. 1991).

La determinació de la radioactivitat incorporada a la biomassa en relació amb el temps transcorregut i amb la concentració de glucosa del medi ens va permetre determinar la

captació de glucosa pels llevats, que es realitzà mitjançant un Packard tri-carb 1500 (LSC-counter):

$$(cpm \times 156)/S.I.S. = dpm$$

$$(dpm M - bK)/((dpm R - bK) \times 10) = Ct$$

$$(Ct \times [Sucre])/P = Cr$$

$$(Cr M - Cr R)/t = \text{Captació real (pKat/milió de cèl.lules)}$$

on **cpm** són les comptes per minut; **156** és l'energia màxima teòrica del ^{14}C ; **S.I.S.** és l'energia real que s'observa en la mostra respecte a un estàndard intern, per tant és un paràmetre d'estimació de l'eficiència de la mesura que fem; **dpm** són les desintegracions per minut; els vials **M** són els que han estat incubats; els vials **R** no han estat incubats i són els vials de referència; **bK** són els vials que considerem com a blanc; **Ct** és la captació total; **P** és la població de llevats en milions de cèl.lules; **Cr** és la captació relativa i **t** és el temps d'incubació en segons.

b. Mètode proposat en aquest treball.

La determinació de la captació de glucosa es realitza utilitzant solucions que contenen quantitats traça de 2-desoxi-[U- ^{14}C]-D-glucosa. Aquest mètode és una modificació d'un altre descrit previament per Zamora, Arola i Alemany (1988) per la mesura de la captació de glucosa en el teixit adipós marró de mamífers.

Es recullen les mostres dels fermentadors control que es troben en la fase exponencial o logarítmica (3er dia de fermentació) (Figura 4.4.1), es fa el comptatge de viables per tal de poder treballar sempre amb una població cel.lular constant de 2×10^9 cèl.lules viables/ml. El volum de mostra que conté exactament la població desitjada, es centrifuga a 3000 g durant 5 minuts. Es renta i es torna a centrifugar tres vegades consecutives amb una solució sintètica (100 g/l (0,55 M) de glucosa, 6 g/l (0,04 M) d'àcid tartàric i ajustada a pH=3,5). Es resuspen en 10 ml d'aquesta mateixa solució i s'extreu una alíquota de 1ml (on hi haurà una població de 1×10^8 cèl.lules/ml) que s'incorpora a un tub Eppendorf. L'estudi del transport pròpiament dit, comença amb l'addició de 100 µl de 2-desoxi-[U- ^{14}C]-D-glucosa 0,55 µM amb una radioactivitat específica de 11,1 MBq/µmol, dins del tub Eppendorf. La relació glucosa/2-desoxi-[U- ^{14}C]-D-glucosa s'ha de mantenir molt elevada (10^6) per tal de minimitzar els efectes tòxics de la 2-desoxi-D-glucosa sobre els llevats (Novak i col., 1991; Sanz i col., 1994; Slaughter i col. 1995).

D'aquestes mostres que es troben en presència de radioactivitat, s'agafa una alíquota de 100 µl i es col.loca en un vial de comptatge (seran els vials X), s'hi afegeix 0,5 ml de NaOH 2 M i es digereix durant 30 minuts a 65°C. Els tubs Eppendorf amb un volum de 1 ml de mostra s'incuben a 12, 20 i 30°C durant 0, 30, 60 i 120 minuts . Una vegada ha passat el

temps d'incubació, es centrifuguen a 3000 g durant 5 minuts, després es renten i es centrifuguen quatre vegades amb solució salina al 0,8% que es troba a la temperatura de 4°C. El precipitat es resuspen en 0,5 ml de NaOH 2 M i es digereix durant 30 minuts a 65°C (seran els vials Z). Tant en els vials X com en els Z, un cop han estat digerits s'hi afegeix 15 ml del líquid d'escintil·lació i es procedeix al comptatge de la radiació β .

La determinació de la radioactivitat incorporada a la biomassa en relació amb el temps transcorregut i amb la concentració de glucosa del medi ens va permetre determinar la captació de glucosa pels llevats, que es realitzà mitjançant un Packard tri-carb 1500 (LSC-counter):

$$\begin{aligned}(\text{cpm} \times 156)/\text{S.I.S.} &= \text{dpm} \\ (\text{dpm Z} - \text{bK})/((\text{dpm X} - \text{bK}) \times 10) &= \text{Ct} \\ (\text{Ct} \times [\text{Glucosa}])/P &= \text{Cr} \\ (\text{Cr Z} - \text{Cr X})/t &= \text{Captació real (pKat/milió de cèl.lules)}\end{aligned}$$

on **cpm** són les comptes per minut; **156** és l'energia màxima teòrica del ^{14}C ; **S.I.S.** és l'energia real que s'observa en la mostra respecte a un standar intern, per tant és un parametre d'estimació de l'eficiència de la mesura que fem; **dpm** són les desintegracions per minut; els vials **Z** són els que han estat incubats; els vials **X** són els que no han estat incubats i es considera que són els vials de referència; **bK** són els vials que considerem com a blanc; **Ct** és la captació total; **P** és la població de llevats en milions de cèl.lules; **Cr** és la captació relativa i **t** és el temps d'incubació en segons.

Com es va demostrar que la captació de glucosa era lineal durant 2 h (Figura 4.4.4), es decidí per les següents experiències, incubar durant 60 minuts a 20°C (temperatura a la que habitualment es desenvolupa la fermentació alcohòlica dels vins blancs).

Per estudiar l'efecte que tenen els diferents paràmetres característics del most i de la seva paulatina conversió en vi sobre la captació de glucosa, es procedí tal com hem acabat d'explicar amb la diferència de modificar la solució sintètica segons el factor objecte d'estudi. Les solucions sintètiques control utilitzades com a medi d'incubació estaven formades per glucosa (5,55 mM; 27,7 mM; 55,5 mM que corresponien a 1, 5 i 10 g/l respectivament), 6 g/l d'àcid tartàric (0,04 M), i s'ajustaven a pH = 3,5 (pH normal d'un vi). Per la determinació de la influència de la concentració de glucosa sobre la captació de sucres s'utilitzaven solucions sintètiques amb diferents concentracions de glucosa que anaven desde 2 a 800 mM (0,3 g/l a 150 g/l) a la mateixa concentració d'àcid tartàric i a igual pH. Per determinar l'efecte del pH sobre la captació de sucres es van fer solucions sintètiques control però ajustades a diferents pH (pH igual a 2; 3; 3,5; 4 i 5). Per esbrinar l'efecte de la resta de factors sobre la incorporació d'hexoses, es partia també de solucions sintètiques control a les que afegiem

etanol (0, 5, 10 i 15%), SO₂ (50, 100 i 200 ppm), fructosa (5, 10 i 20 g/l) i àcid tartàric (3, 5, 7 i 9 g/l) segons cada cas. En totes elles i seguint el protocol, s'incorporà 100 µl d'una solució de 2-desoxi-[U-¹⁴C]-D-glucosa que segons la concentració de glucosa de cada mostra (5,55; 27,7 i 55,5 mM) variava l'activitat específica de la mateixa (0,12; 0,6 i 1,21 MBq/mM) mantenint sempre la proporció de glucosa/2-desoxi-[U-¹⁴C]-D-glucosa molt elevada (10⁶) per tal de minimitzar els efectes tòxics de la 2-desoxi-D-glucosa sobre els llevats.

4.2.6. TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES MOSTRES

L'anàlisi estadística de les diferències entre grups es va realitzar mitjançant la prova t de Student, amb el paquet estadístic Statview 4.0 (Abacus, USA).

4.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

a. Comprovació i discussió de l'eficàcia dels mètodes anteriorment esmentats

En les figures 4.4.2 i 4.4.3 es presenten les activitats dels transportadors de sucres de baixa afinitat obtingudes utilitzant el mètode de Busturia i Lagunas (1986). Com ja s'ha apuntat abans, els anàlegs estructurals de la glucosa emprats són la xilosa i la 2-desoxi-D-glucosa marcades.

En la Figura 4.4.3 es demostra que utilitzant 2-desoxi-D-glucosa marcada i el mètode de Busturia i Lagunas (1986) s'obtenien resultats que coincidien (K_m= 24 mM segons Lineweaver-Burk o K_m= 20 mM segons Eadie-Hofstee) amb els valors de captació de sucres obtinguts per Bisson i Fraenkel (1983) (K_m= 20 mM segons Eadie-Hofstee) utilitzant glucosa marcada, per tant podem donar com a bona la mesura de captació utilitzant 2-desoxi-D-glucosa marcada.

La Figura 4.4.2 ens mostra la captació de sucres utilitzant el mètode de Busturia i Lagunas (1986) utilitzant el mateix anàleg estructural marcat de la glucosa (xilosa), i obviament ens trobarem, coincidint amb els esmentats autors i amb Salmon (1993), una K_m= 108 mM segons Lineweaver-Burk o K_m= 171 mM segons Eadie-Hofstee, que era molt diferent de la trobada treballant tant amb la glucosa marcada com amb la 2-desoxi-D-glucosa marcada, això ens demostrava que la utilització de la 2-desoxi-D-glucosa marcada per determinar l'activitat del transportador de baixa afinitat era més propera a la realitat que la utilització de la xilosa. El problema que presenta aquest protocol continua sent un temps d'incubació curt (1 minut), que fa que la manipulació de la mostra hagi de ser molt ràpida i com a conseqüència els errors entre les rèpliques siguin grans.

Per comprovar la validesa del mètode que es proposa en aquest treball, s'estudià la influència de la temperatura sobre la captació de sucres (Figura 4.4.4). Els resultats ens demostren que la captació de sucres és lineal en relació al temps, i que la velocitat de captació depèn de la temperatura d'acord amb la llei d'Arrhenius. Per tant podem afirmar que el protocol proposat és vàlid, i els avantatges que ens ofereix són:

-temps d'incubació més llarg (1 h), que faciliten la manipulació en el laboratori i minimitzen els errors entre les rèpliques.

-utilització de concentracions significativament més baixes de radioactivitat, que disminueixen el risc de contaminació tant per part del personal investigador que hi està exposat, com pel que fa a la menor quantitat de residus radioactius generats, i que per tant suposa un estalvi econòmic.

b. Cinètica fermentativa

L'evolució de la concentració de sucres i de la població de cèl.lules viables durant la fermentació alcohòlica es dona en la Taula 4.4.1 La cinètica de la fermentació alcohòlica és la normal per la vinificació en blanc a baixes temperatures (20°C).

c. Influència de la concentració de glucosa sobre la captació de sucres

La influència de la captació de glucosa sobre la incorporació de sucres la presentem en la Figura 4.4.5. Els resultats ens mostren que la captació de sucres té un comportament concordant amb l'equació de Michaelis-Menten per baixes concentracions de glucosa. No obstant a elevades concentracions de glucosa, té lloc una inhibició per excés de substrate, d'acord amb la inhibició observada durant la fermentació alcohòlica del most (medi amb elevades concentracions de sucres) (Lafon-Lafourcade i col., 1979). Les representacions de Lineweaver-Burk i Eadie-Hofstee ens donen unes Km de 34 i 31 mM respectivament d'acord, en termes generals, amb els resultats descrits previament per altres autors (Busturia i col., 1986; Lang i col., 1987; van Urk i col., 1989). Les Vmax són de 26 i 25 pKat/milió de cèl.lules respectivament, velocitat que no queda representada en la gràfica de Michaelis-Menten, doncs com abans hem dit, hi ha una inhibició per excés de substrate. Realment la màxima velocitat de transport assolida és de 19 pKat/milió de cèl.lules més o menys, tal com es pot observar en la representació de Michaelis-Menten. Considerant aquest valor i la mitja de la població de cèl.lules viables entre els dies 2n. i 3er. de fermentació (al voltant de $9,78 \times 10^7$), aquesta velocitat de transport dona una velocitat de consum de glucosa de 28,9 g/(l x dia), valor del mateix ordre de magnitud del que s'observa en el consum de sucres entre el 2n. i 3er. dia de fermentació (42,5 g/(l x dia) en condicions de vinificació.

d. Influència de la concentració d'etanol sobre la captació de sucres

D'acord amb la bibliografia, el sistema de transport de glucosa en *Saccharomyces cerevisiae* està inhibit de forma no competitiva pels alcohols (Leao i col., 1982 i 1985; Mauricio i col., 1992) i principalment per l'etanol afectant aquest, la capacitat del sistema però no la seva afinitat per la glucosa (Salmon i col., 1993).

Els nostres resultats (Figura 4.4.6) presenten una paradoxa, s'observa que la corba control presenta menys activitat que les activitats de les corbes realitzades en presència de 5 i 10% d'etanol. Una possible explicació seria que en el 3er. dia de fermentació, la concentració de sucres i d'etanol en el medi són de 139,7 g/l i 4,7% respectivament, condicions molt similars a les de la solució sintètica (100 g/l i 5%). En aquesta situació *Saccharomyces cerevisiae* es troba en la fase exponencial de creixement i està perfectament adaptada a aquesta concentració d'etanol (Beaven i col., 1982; Lloyd i col., 1993). Quan rentem i resuspenem les cèl.lules en la solució sintètica, els canvis en el medi seran més dràstics a 0% d'etanol que a 5% d'etanol, produint-se un decreixement en la velocitat de captació de sucres. Si considerem aquesta nova velocitat de captació de glucosa (en presència de 5% d'etanol) com la captació real del 3er dia de fermentació, la seva velocitat de transport dóna una velocitat de consum de sucres de 52,9 g/(l x dia). Aquest valor és més alt que el valor descrit per la captació entre el 2n. i 3er. dia de fermentació (42,5 g/(l x dia). No obstant, aquesta velocitat sembla ser més real que l'obtinguda a partir de la solució sintètica control (sense etanol), perquè en les solucions sintètiques no hi han agents inhibitoris tals com àcids grassos de cadena curta ni els seus esters etílics (Lafon-Lafourcade i col., 1984).

Tanmateix l'efecte inhibitori de l'etanol sobre la captació de sucres descrit prèviament, es manifesta quan comparem la velocitat de captació de sucres en presència del 5% d'etanol amb les resultants de les captacions que tenen lloc a concentracions d'etanol més elevades

En la Taula 4.4.2 presentem les K_m i les V_{max} resultants de les representacions de Lineweaver-Burk i Eadie-Hofstee, es pot observar (desestimant els resultats control) que a 10% d'etanol la V_{max} no varia significativament respecte el 5% d'etanol tot hi que el transportador es presenta com una mica menys afí pel substrate. En canvi a 15% d'etanol la K_m no presenta variacions significatives (es manté l'afinitat pel substrat) però disminueix significativament la V_{max} de la reacció (40%).

D'aquestes observacions podem concloure que, tal com ja van descriure Kunkee i col., (1993), hi ha una inhibició de l'activitat del transportador de sucres en presència de concentracions creixents d'etanol que pot donar lloc, junt amb altres factors i segons l'estadi de fermentació en que es troben, a relentiments i aturades de fermentació.

e. Influència de la concentració de SO₂ sobre la captació de sucres

L'efecte del SO₂ sobre la captació de sucres el presentem en la Figura 4.4.7 i les corresponents Km i Vmax de les representacions de Lineweaver-Burk i Eadie-Hofstee es donen en la Taula 4.4.3. S'observa un decreixement molt acusat de l'afinitat del transportador pel seu substrate (incrementa la Km) en la mesura que augmenta la concentració de SO₂ present en el medi, que es tradueix amb una pèrdua de la captació de glucosa a dosis creixents d'aquest producte antisèptic, tot i que les Vmax augmentin un 35 i un 32% en presència de 50 i 100 ppm respectivament. Cal ressaltar que a dosis normals de SO₂ (50 ppm), es pot considerar que no hi han variacions significatives en la representació de Michaelis-Menten tot i que la seva Km i la seva Vmax siguin significativament diferents respecte al control. A concentracions de 200 ppm de SO₂, s'observa una pèrdua del comportament michaelià possiblement degut a una inhibició irreversible del transportador. Per tant podem afirmar que l'addició del SO₂ a dosis normals en el most, no alterarà la captació de glucosa però dosis superiors d'aquest compost podran causar problemes de fermentació.

f. Influència de la concentració de fructosa sobre la captació de sucres

Els resultats referents a la influència de la concentració de fructosa sobre la captació de sucres es presenten en la Figura 4.4.8 i en la Taula 4.4.4. Aquests resultats indiquen que la presència de 5 g/l de fructosa en el medi d'incubació no produeix cap alteració en el perfil de captació de sucres pels llevats. No obstant, quan la concentració de fructosa augmenta fins a 10 i 20 g/l, un clar efecte inhibidor de la captació es fa patent. D'acord amb la bibliografia, la glucosa i la fructosa són transportades pel mateix transportador i per tant entraran en competició (Cason et al., 1987; Orłowski et al., 1987; D'Amore et al., 1989; Schutz et al., 1995). De fet el transportador de baixa afinitat presenta diferents Km per la glucosa (Km = 20-40 mM) i per la fructosa (Km = 50-70 mM) (Bisson i col., 1983). Aquesta més gran afinitat del transportador per la glucosa justifica el fet de que el consum de glucosa per *Saccharomyces cerevisiae* sigui més ràpid (Cason et al., 1987; Panchal et al., 1982) i que per tant en les darreres fases de la fermentació alcohòlica els nivells de fructosa siguin més grans que els de glucosa.

Per tot això era d'esperar que els nostres resultats indiquessin un efecte inhibidor de la fructosa de tipus competitiu, i confirmessin que la presència de fructosa disminueix la velocitat de captació de la glucosa. No obstant, el perfil de les rectes a la representació de Lineweaver-Burk (Figura 4.4.8) no són els característics d'aquest tipus d'inhibició. De totes maneres, aquesta aparent inhibició de la captació de glucosa per la presència de fructosa en el medi d'incubació, no s'ha d'analitzar com una possible font de problemes de fermentació, ja que la fructosa disminueix la captació de glucosa únicament perquè la substitueix, amb menys afinitat, en el procés de transport. Sota el punt de vista de la finalització de la

fermentació alcohòlica, la captació de fructosa és tant necessària com la de la glucosa, i per tant aquestes dades només ens indiquen que el transportador realitza aquesta funció.

g. Influència del pH sobre la captació de sucres

No s'observen diferències significatives en l'interval de pH que va de 3 a 3,5 segons les representacions gràfiques de la Figura 4.4.9. Els valors de K_m i V_{max} que presentem en la Taula 4.4.5 tampoc ens mostren diferències significatives per aquests valors de pH. A pH= 4 hi ha una disminució de la velocitat de captació, amb una davallada de la V_{max} (44%) en canvi augmenta l'afinitat pel substrat (devallada de la K_m), en aquestes condicions de pH. A pH= 5 ens augmenta l'afinitat pel substrate i la V_{max} es manté significativament igual al control, fet que provoca un increment en la velocitat de la captació de sucres. El comportament del transportador deixa de ser Michaelià a pH= 2, quedant absolutament i irreversiblement inhibit.

Normalment els pH dels vins oscil·len entre 3 i 4 unitats, llavors podem concloure que l'interval on l'activitat dels sistemes de captació dels llevats és òptima va de 3 a 3,5 començant a quedar afectada quan els valors de pH són propers o sensiblement superiors a 4.

h. Influència de l'acidesa total sobre la captació de sucres

L'interval de valors d'acidesa total que normalment trobem en mostos va de 4 g/l a 8g/l. La Figura 4.4.10 i la Taula 4.4.6 ens presenten els resultats de l'estudi de l'efecte de l'acidesa total sobre la captació de glucosa. S'observa que a concentracions d'àcid tartàric inferiors a 6 g/l (control) hi ha una disminució de l'activitat del transportador de glucosa, baixant tant la K_m (augment de l'afinitat pel substrate) com la V_{max} (un 56% quan hi han 3 g/l d'àcid tartàric i un 32% quan hi han 5 g/l). En presència de concentracions d'àcid tartàric superiors al control trobem menys afinitat del transportador pel substrate (K_m alta) i un increment de la V_{max} (34% en presència de 7 g/l d'àcid tartàric i un 44% en presència de 9 g/l d'àcid tartàric).

Per tant l'activitat del transportador de sucres serà òptima quan els mostos presentin valors en acidesa total compresos entre 6 i 8 g/l aproximadament. Pel davall d'aquests valors, pot ser un factor més que contribueixi a la problemàtica dels relentiments i aturades de fermentació.

i. Influència de la concentració de glucosa sobre la captació de sucres a diferents dies de fermentació

La influència de la concentració de glucosa sobre la captació de llevats a diferents dies de fermentació es dona en la Figura 4.4.11. Els resultats ens demostren l'evolució decreixent de la captació de sucres durant la fermentació. A l 7è i a 11è dia de fermentació, a

baixes concentracions de glucosa (1 g/l i 5 g/l corresponents a 5,55 i 27,7 mM respectivament), els llevats tenen un comportament michaelià. No obstant quan les concentracions de glucosa pugen (10 g/l o 55,5 mM), hi ha una considerable davallada de la captació de sucres. En els llevats de 17é dia de fermentació, s'observa un lleuger increment de la captació entre 1 i 5 g/l, i un decreixement entre 5 i 10 g/l de glucosa.

La pèrdua d'activitat del transportador de sucres que s'observa a 10 g/l de glucosa (55,5 mM), pot ser deguda a que en els dies 11è i especialment el 17è de fermentació, la concentració de sucres és més baixa que aquest valor (Taula 4.4.1). En aquest cas, el sistema de transport d'hexoses d'alta afinitat pot representar un percentatge important en la captació de glucosa pels llevats (Bisson i col., 1984; Ramos i col., 1989; Sanz i col., 1994). La incubació d'aquestes cèl.lules en presència d'elevades concentracions de sucres (Bisson i col., 1987) pot provocar la repressió del transportador d'alta afinitat donant lloc a una davallada de la velocitat de captació en aquestes condicions. Aquestes dades confirmen el risc d'alentiments i aturades de fermentació que es corre quan xaptalitzem en els darrers estadis d'aquest procés.

En el 7è dia de fermentació, tot i que les cèl.lules han crescut en presència d'una concentració de sucres al voltant de 50 g/l (Taula 4.4.1) i per tant més elevada que la concentració de la solució sintètica, el seu comportament és paral.lel al del 11è dia de fermentació, és per això que no podem donar una explicació lògica del mateix.

Aquests resultats es correlacionen molt bé amb la velocitat de consum de sucres durant la fermentació alcohòlica. Al principi del procés, una gran concentració de sucres i una baixa concentració d'etanol afavoreixen l'elevada captació de sucres pels llevats. En els darrers dies de la fermentació, el sistema de transport de baixa afinitat deixa de ser eficient a causa dels baixos nivells de glucosa que en aquests moments existeixen en el most/vi. A més, les elevades concentracions d'etanol que hi ha en el medi inhibeixen dràsticament aquest sistema de transport, comportant a la vegada una considerable disminució de la velocitat de la glucòlisi (Boulton, 1980; Larue i col., 1982; Salmon, 1989). En aquestes condicions el sistema de transport d'alta afinitat sembla que juga un paper important en el consum dels darrers grams de sucre.

Aquests resultats semblen confirmar que la captació d'hexoses limita la velocitat de la fermentació alcohòlica que du a terme *Saccharomyces cerevisiae* en condicions reals de vinificació.

4.4. TAULES I FIGURES

FIGURA 4.4.1 Esquema del mètode proposat en aquest treball

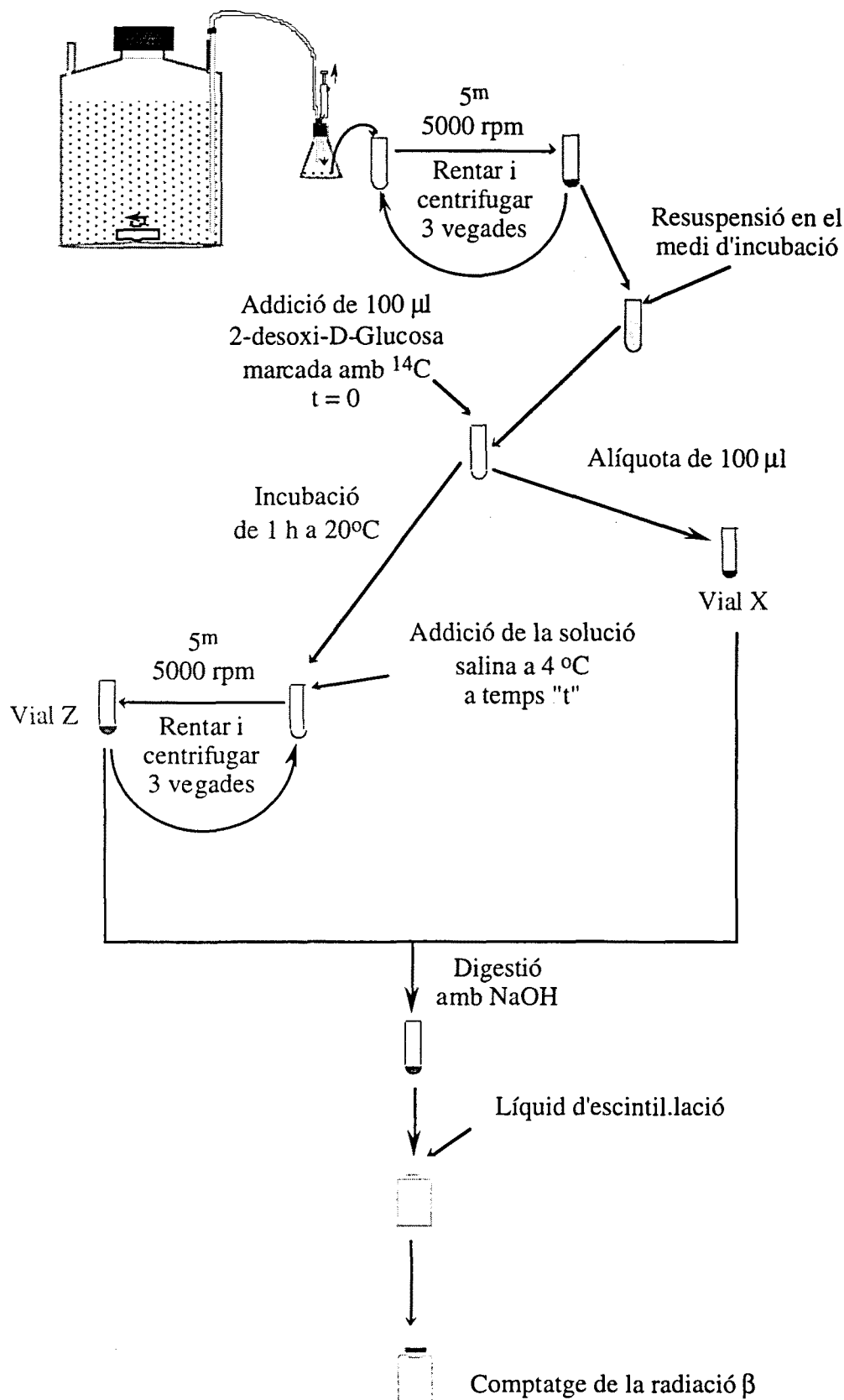


FIGURA 4.4.2 Captació de glucosa mitjançant el mètode proposat per Busturia i Lagunas (1986). Utilització de l'anàleg estructural de la glucosa: Xilosa. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques.

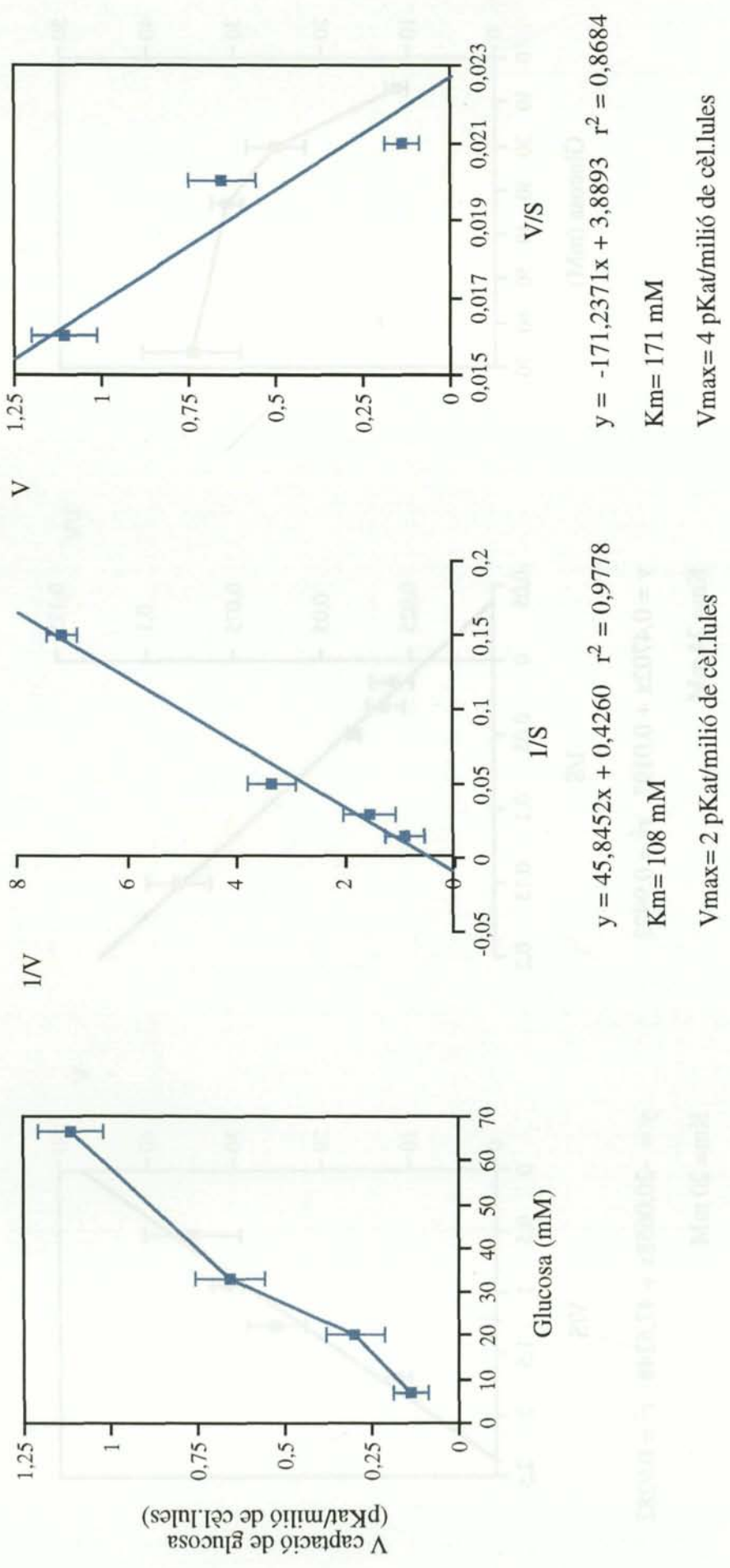
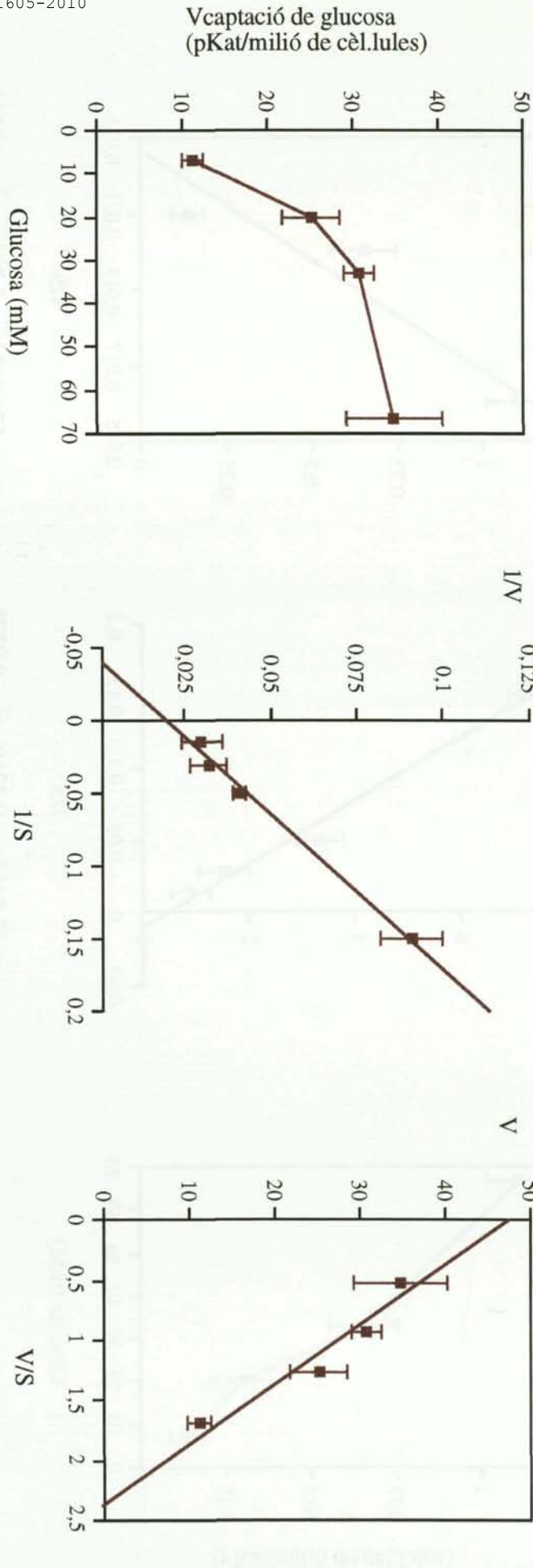


FIGURA 4.4.3 Captació de glucosa mitjançant el mètode proposat per Busturia i Lagunas (1986). Utilització de l'anàleg estructural de la glucosa: 2-desoxi-D-Glucosa. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error típic de 5 rèpliques.



$y = 0,4702x + 0,0197 \quad r^2 = 0,9922$
 $K_m = 24 \text{ mM}$
 $V_{max} = 51 \text{ pKat/milió de cèl.lules}$

$y = -20,0658x + 47,6248 \quad r^2 = 0,9282$
 $K_m = 20 \text{ mM}$
 $V_{max} = 48 \text{ pKat/milió de cèl.lules}$

FIGURA 4.4.4 Influència de la temperatura sobre la captació de sucres (3er.dia de fermentació). Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques.

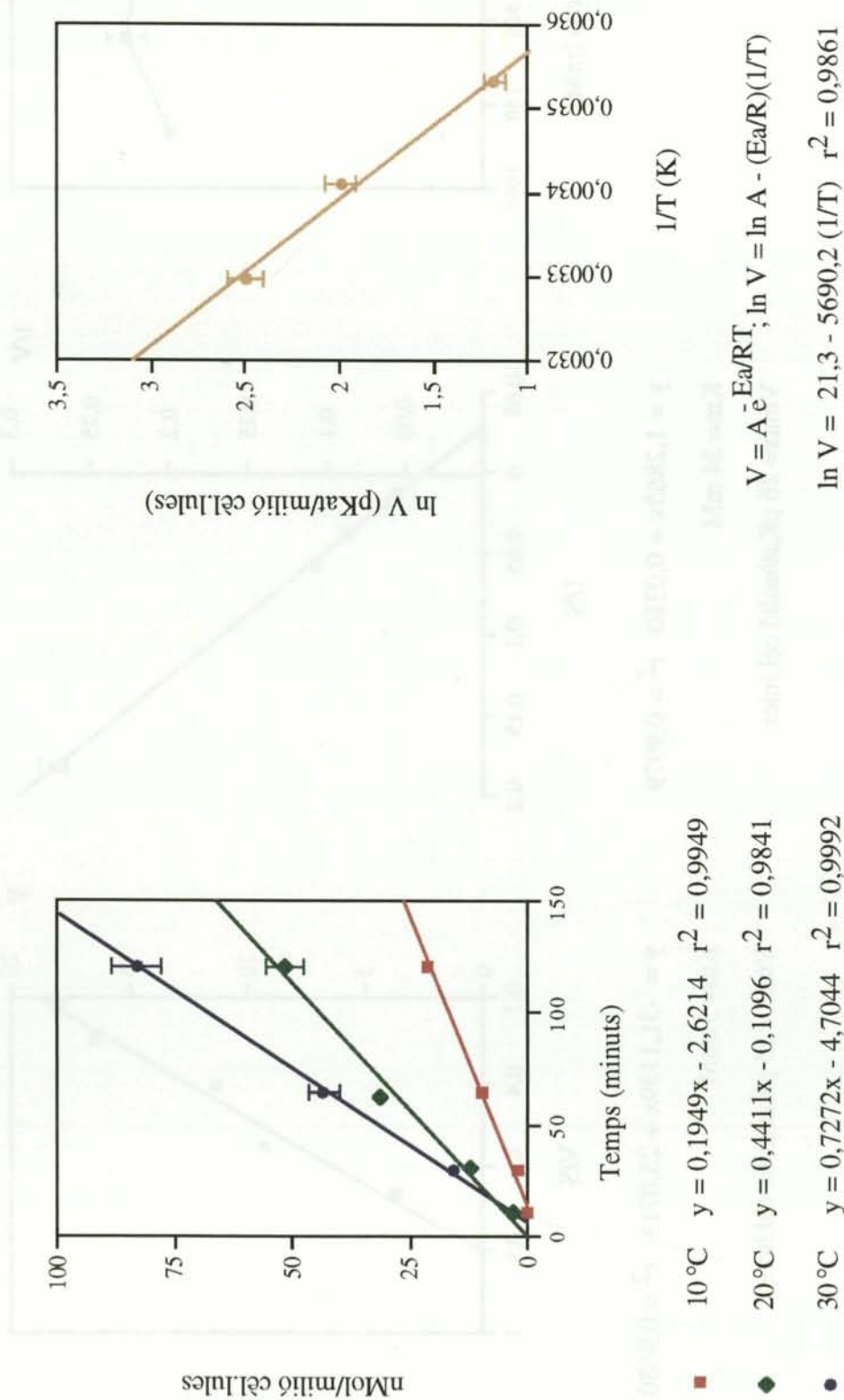
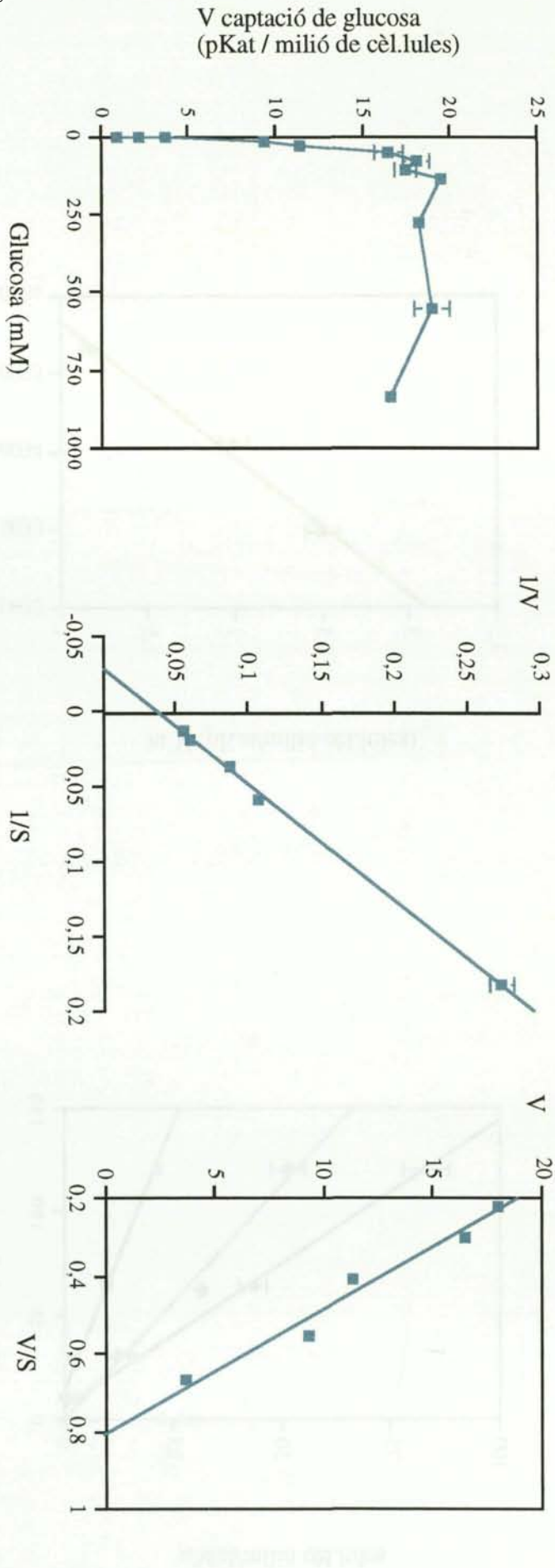


FIGURA 4.4.5 Influència de la concentració de glucosa sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques.



$y = 1,2865x + 0,0380 \quad r^2 = 0,9979$
 $K_m = 34 \text{ mM}$
 $V_{max} = 26 \text{ pKat/milió cèl.lules}$

$y = -31,1139x + 25,0713 \quad r^2 = 0,9680$
 $K_m = 31 \text{ mM}$
 $V_{max} = 25 \text{ pKat/milió cèl.lules}$

FIGURA 4.4.6 Influència de la concentració d'etanol sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al 5% d'etanol.

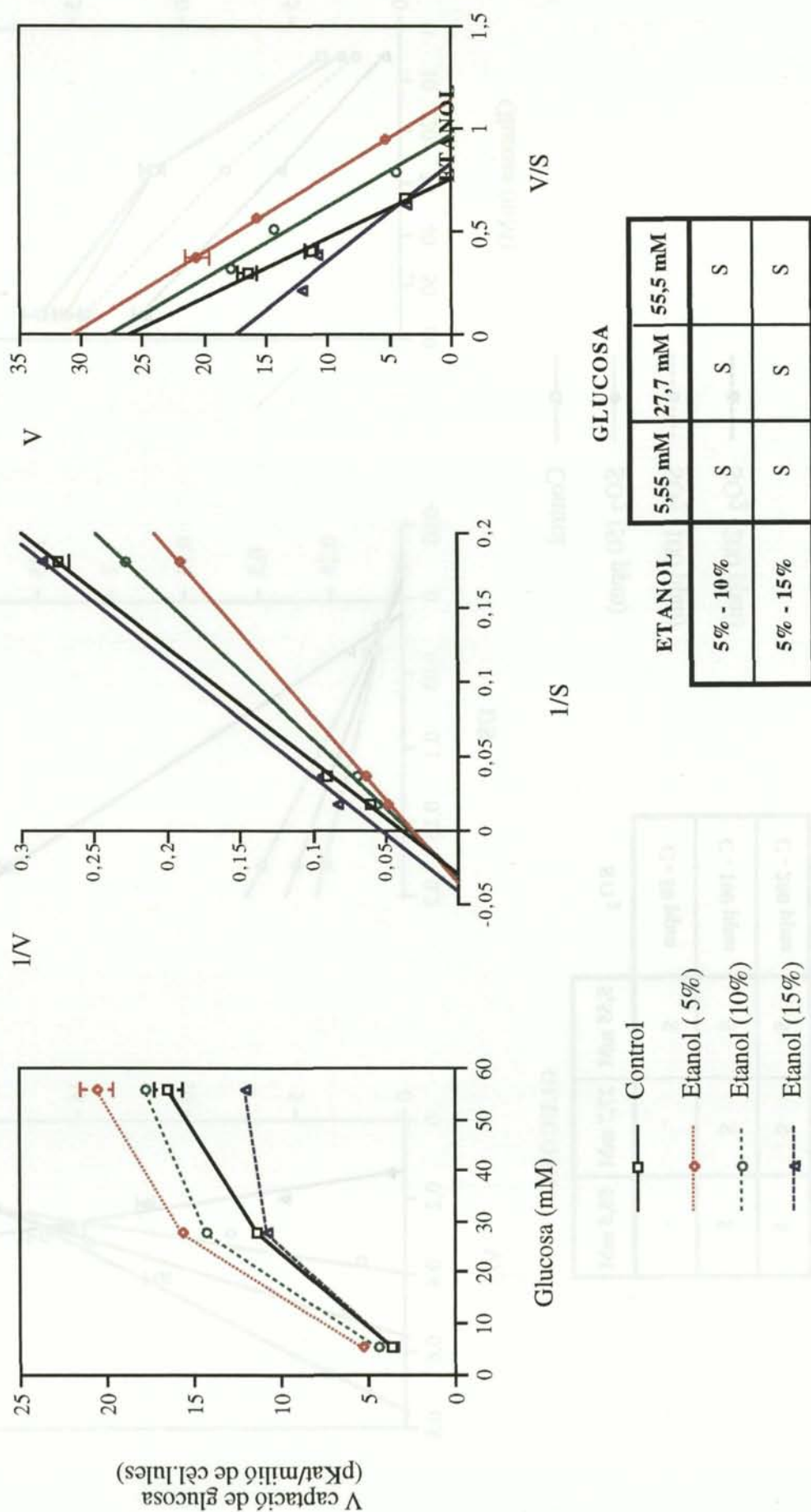
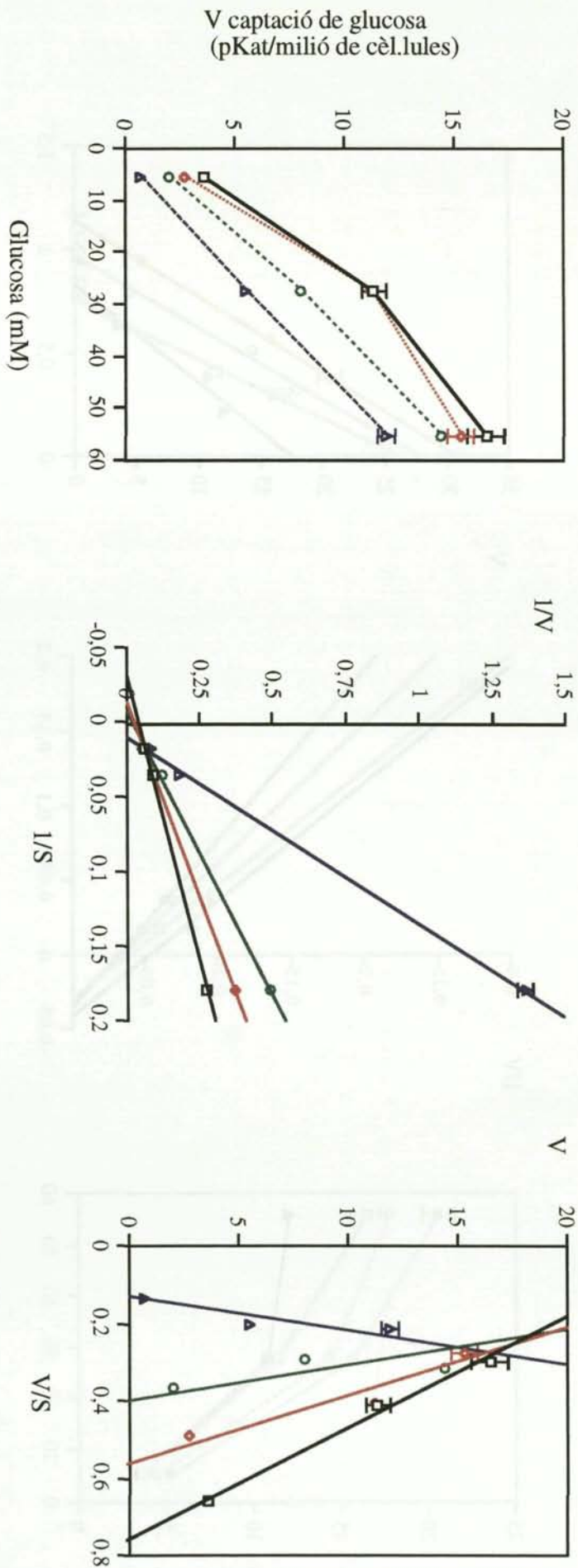
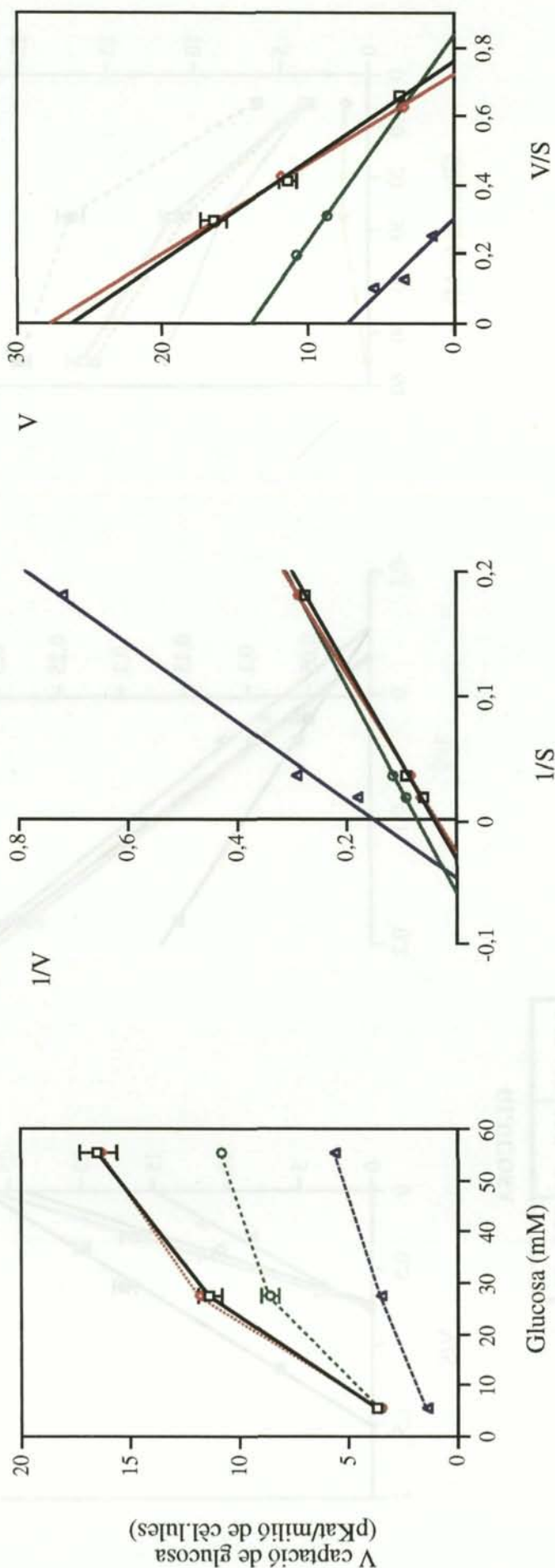


FIGURA 4.4.7 Influència de la concentració de SO₂ sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives (p < 0,05) respecte al control.



SO ₂		GLUCOSA		
C - 50 ppm	S	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
C - 100 ppm	S	-	S	S
C - 200 ppm	S	-	S	S

FIGURA 4.4.8 Influència de la concentració de fructosa sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error típus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.

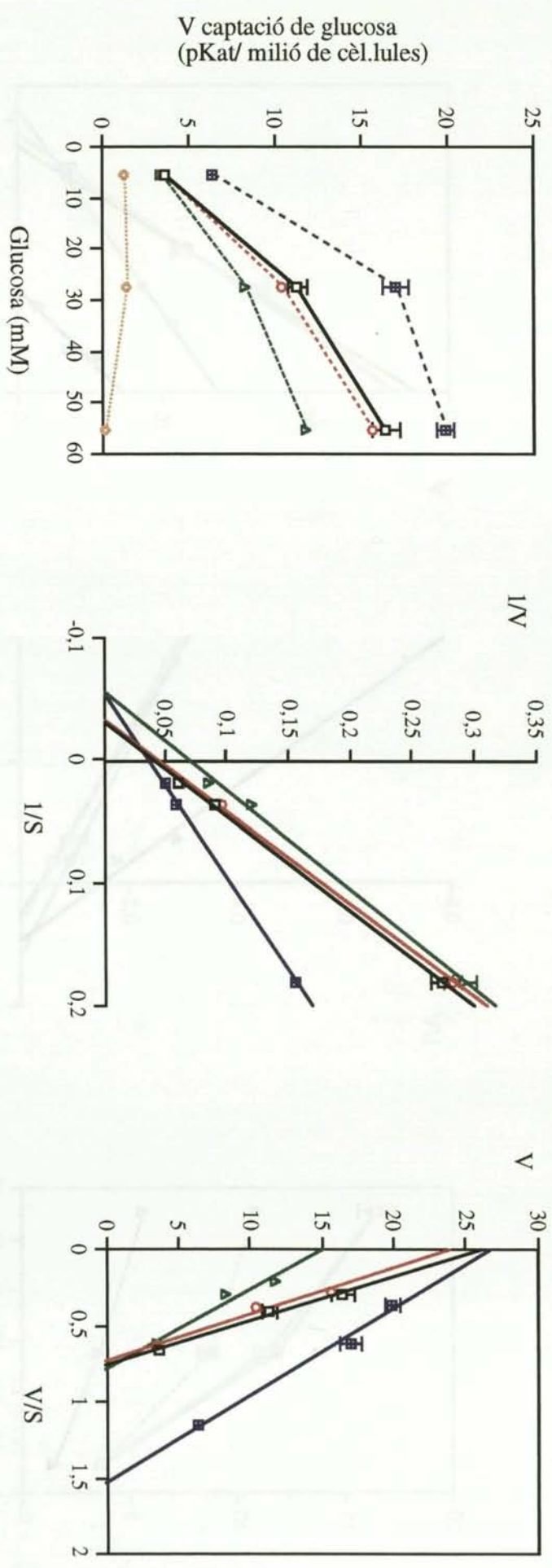


GLUCOSA

FRUCTOSA	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
C - 5 g/l	-	-	-
C - 10 g/l	-	S	S
C - 20 g/l	S	S	S

—□— Control
◇..... Fructosa (5 g/l)
○..... Fructosa (10 g/l)
 -·-·-·△-·-·- Fructosa (20 g/l)

FIGURA 4.4.9 Influència del pH sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.



GLUCUCOSA

C - pH= 2	S	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
C - pH= 3	-	S	S	-
C - pH= 4	-	S	S	S
C - pH= 5	S	S	S	S

FIGURA 4.4.10 Influència de l'acidesa total sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.

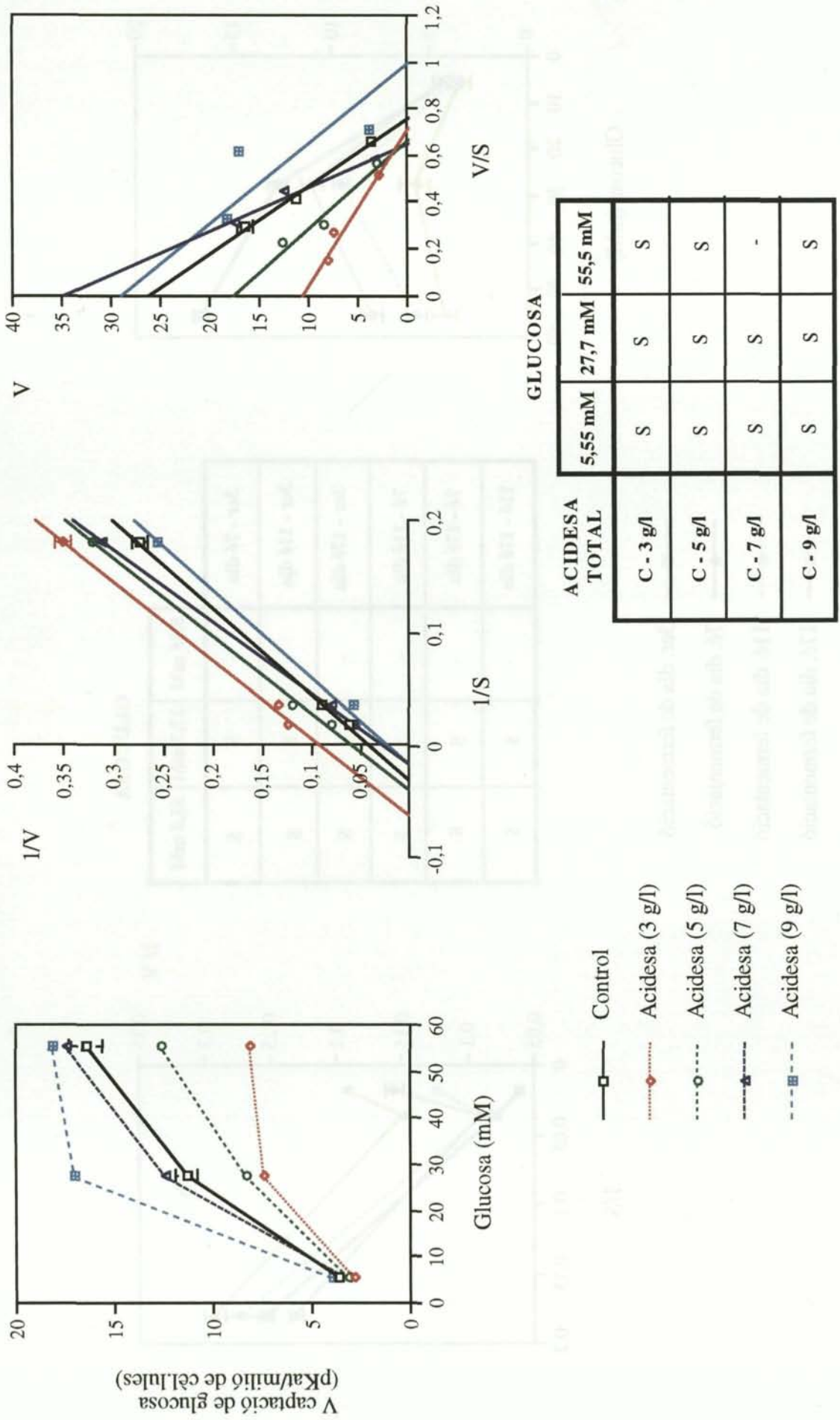
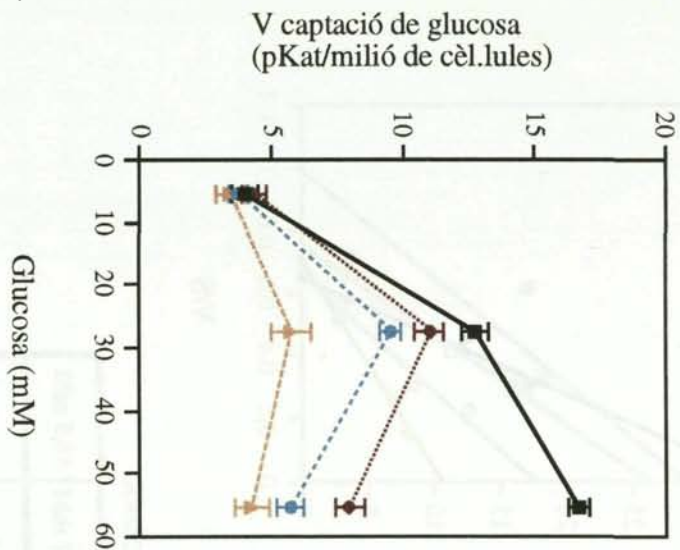
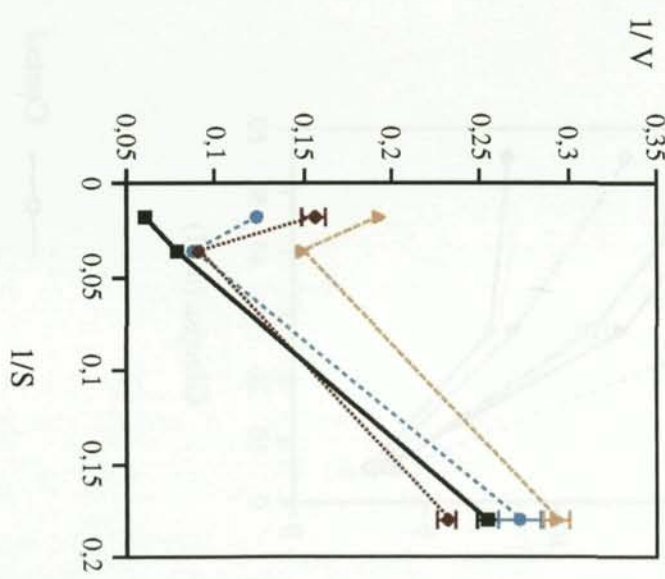
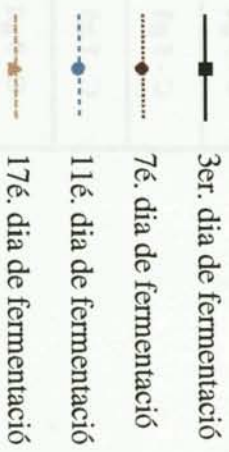


FIGURA 4.4.11 Influència de la captació de glucosa pels llevats a diferents dies de fermentació. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error típus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$).



		GLUCCOSA		
		5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
3er - 7é dia	-	S	S	S
3er - 11é dia	-	S	S	S
3er - 17é dia	-	S	S	S
7é - 11é dia	-	S	S	S
7é - 17é dia	-	S	S	S
11é - 17é dia	-	S	S	S



TAULA 4.4.1 Evolució de la concentració de sucres i de la població de cèl.lules viables durant la fermentació alcohòlica. Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques

Temps (dies)	Concentració de sucres (g/l)	Cèl.lules viables (10^6 cèl.lules/ml)
0	220,2 \pm 0,7	5,0 \pm 0,1
1	216,3 \pm 3,5	16,5 \pm 0,5
2	180,2 \pm 3,6	90,1 \pm 5,7
3	137,7 \pm 3,8	105 \pm 8,6
4	106,4 \pm 2,9	119 \pm 7,3
7	49,3 \pm 0,8	99,3 \pm 4,9
9	15,5 \pm 1,6	82,3 \pm 5,9
11	8,2 \pm 1,3	74,1 \pm 7,9
14	0,48 \pm 0,06	57,3 \pm 6,7
17	0,18 \pm 0,02	47 \pm 8,9

TAULA 4.4.2 Influència de la concentració d'etanol sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al 5% d'etanol.

	Lineweaver-Burk			Eadie-Hofstee		
	r^2	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)	r^2	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)
Control	0,999	32 \pm 2,9	25 \pm 1,9	0,990	34 \pm 2,9	26 \pm 1,7
Etanol (5%)	1	27 \pm 2,2	30 \pm 2,5	1	27 \pm 2,1	31 \pm 2,5
Etanol (10%)	0,999	32 \pm 1,2*	29 \pm 0,9	0,972	29 \pm 0,9	28 \pm 0,9
Etanol (15%)	0,997	24 \pm 0,7	18 \pm 0,6*	0,929	21 \pm 0,6*	17 \pm 0,4*

TAULA 4.4.3 Influència de la concentració de SO₂ sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la mitjana aritmètica ± error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives (p < 0,05) respecte al control.

	Lineweaver-Burk			Eadie-Hofstee		
	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)
Control	0,999	32 ± 2,9	25 ± 1,9	0,990	34 ± 2,9	26 ± 1,7
SO ₂ (50 ppm)	0,999	73 ± 6,1*	38 ± 2,9*	0,914	56 ± 4,1*	38 ± 2,7*
SO ₂ (100 ppm)	0,999	96 ± 5,9*	37 ± 1,5*	0,940	108 ± 6,7*	41 ± 2,3*
SO ₂ (200 ppm)	0,999	-	-	0,816	-	-

TAULA 4.4.4 Influència de la concentració de fructosa sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la mitjana aritmètica ± error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives (p < 0,05) respecte al control.

	Lineweaver-Burk			Eadie-Hofstee		
	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)
Control	0,999	32 ± 2,9	25 ± 1,9	0,990	34 ± 2,9	26 ± 1,7
Fructosa (5 g/l)	0,999	39 ± 2,5*	28 ± 1,3	0,997	39 ± 2,5*	28 ± 1,1
Fructosa (10 g/l)	0,999	17 ± 0,9*	14 ± 0,8*	0,998	17 ± 0,9*	14 ± 0,8*
Fructosa (20 g/l)	0,991	22 ± 1,1*	7 ± 0,2*	0,859	24 ± 1,2*	7 ± 0,2*

TAULA 4.4.5 Influència del pH sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.

	Lineweaver-Burk			Eadie-Hofstee		
	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)
pH=2	-	-	-	-	-	-
pH=3	0,998	30 \pm 1,5	23 \pm 1	0,965	32 \pm 1,7	24 \pm 1
Control (pH=3,5)	0,999	32 \pm 2,9	25 \pm 1,9	0,990	34 \pm 2,9	26 \pm 1,7
pH=4	0,996	18 \pm 0,6*	14 \pm 0,5*	0,946	19 \pm 0,6*	15 \pm 0,5*
pH=5	0,999	18 \pm 1*	27 \pm 1,9	0,986	17 \pm 1*	27 \pm 1,9

TAULA 4.4.6 Influència de l'acidesa total sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.

	Lineweaver-Burk			Eadie-Hofstee		
	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)
Acidesa (3 g/l)	0,996	16 \pm 0,8*	11 \pm 0,4*	0,947	15 \pm 0,7*	11 \pm 0,4*
Acidesa (5 g/l)	0,997	25 \pm 1*	17 \pm 0,8*	0,937	26 \pm 1*	18 \pm 0,8*
Control (6 g/l)	0,999	32 \pm 2,9	25 \pm 1,9	0,990	34 \pm 2,9	26 \pm 1,7
Acidesa (7 g/l)	1	61 \pm 4,1*	38 \pm 2,7*	0,971	53 \pm 3,8*	35 \pm 2,1*
Acidesa (9 g/l)	0,992	58 \pm 3,7*	45 \pm 2,9*	0,534	29 \pm 1,1*	29 \pm 1,1*

4.5. CONCLUSIONS

1. Amb el mètode proposat en aquest treball per a la determinació de la captació de sucres s'obté una Km concordant amb la descrita a la bibliografia, un comportament d'acord amb la llei d'Arrhenius i una velocitat de captació del mateix ordre que l'observada per la desaparició dels sucres. Per tant podem afirmar que el protocol proposat és vàlid i ofereix els avantatges de minimitzar els errors obtinguts, facilitar la manipulació de les mostres i disminuir els nivells de radioactivitat que normalment s'utilitzaven.

2. La captació de glucosa pels llevats presenta un comportament michaelià a baixes concentracions de glucosa. No obstant, quan els nivells de glucosa augmenten apareix una inhibició per excés de substrate. La presència de fructosa dóna lloc a una disminució de la captació de glucosa deguda a la competència pel transportador.

3. L'etanol i el SO₂ produeixen una inhibició de la captació de glucosa. Els valors òptims de captació de sucres pels llevats corresponen a pH entre 3,0 i 3,5, i a acideses totals d'entre 6 i 8 g/l referides a àcid tartàric.

4. La influència de la concentració de glucosa sobre la seva captació, que en llevats de 3r dia de fermentació era michaeliana, presenta un comportament diferent per a llevats de 7, 11 i 17 dia de fermentació. Per a tots ells s'observa que a baixes concentracions de glucosa el comportament es paral·lel als llevats de 3r dia, i que al augmentar la concentració de glucosa disminueix la captació, probablement per inhibició del transportador d'alta afinitat.

4.6. BIBLIOGRAFIA

Beaven, M.J., Charpentier, C. i Rose, A.H. (1982). Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *J. Gen. Microbiol.*, 128, 1447-1455.

Bisson, L.F. i Fraenkel, D.G. (1983). Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*:. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80, 1730-1734.

Bisson, L.F. i Fraenkel, D.G. (1984). Expression of kinase-dependent glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 159, 1013-1017.

Bisson, L.F., Neigebohn, L., Carlson, M. i Fraenkel, D.G. (1987). The SNF3 gene is required for high-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*:. *J. Bacteriol.*, 169, 1656-1662.

Boulton, R. (1980). The prediction of fermentative behavior by a kinetic model. *Am. J. Enol. Vitic.*, 31, 40-45.

Busturia, A. i Lagunas, R. (1986). Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 132, 379-385.

Cason, D.T., Reid, G.C. i Gatner, E.M.S. (1987). On the differing rates of fructose and glucose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.*, 93, 23-25.

D'Amore, T., Russell, I. i Stewart, G.G. (1989). Sugar utilisation by yeast during fermentation. *J. Industr. Microbiol.*, 4, 315-324.

Does, A.L. i Bisson, L.F. (1989). Comparison of glucose uptake kinetics in different yeast. *J. Bacteriol.*, 171, 1303-1308.

Dombek, K.M. i Ingram, L.O. (1987). Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1286-1291.

Kunkee, R.E. i Bisson, L.F. (1993). Wine-making yeasts. En *The Yeasts*, 2nd. ed., Vol. 5, A.H. Rose i J.S. Harrison, Eds., pp. 69-127. London: Academic Press.

Lafon-Lafourcade, S., Geneix, G. i Ribereau-Gayon, P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeast and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1246-1249.

Lafon-Lafourcade, S., Larue, F. i Ribereau-Gayon, P. (1979). Evidence of the existence of "survival factors" as an explanation for some peculiarities of yeast growth, especially in grape must of high sugar concentration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 1069-1073.

Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A. i Saez, J. (1982). Mechanisms of the appearance of Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of the sugar transport systems. *J. Bacteriol.* 152, 19-25.

Lang, J.M. i Cirillo, V.P. (1987). Glucose transport in a kinaseless *Saccharomyces cerevisiae*: mutant. *J. Bacteriol.*, 169, 2932-2937.

Larue, F., Lafon-Lafourcade, S. i Ribereau-Gayon, P. (1982). Inhibition de *Saccharomyces cerevisiae* dans le moût de raisin. *C.R. Acad. Sci. Ser. III.*, 294, 587-590.

Larue, F., Lafon-Lafourcade, S. i Ribereau-Gayon, P. (1984). Relationship between the inhibition of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and the activities of hexokinase and alcohol dehydrogenase. *Biotechnol. Lett.*, 6, 687-692.

Leao, C. i van Uden, N. (1982). Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2601-2604.

Leao, C. i van Uden, N. (1985). Effects of ethanol and other alkanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 359-363.

Lloyd, D., Morrell, S., Carlsen, N.H., Degn, H., James, P.E. i Rowlands, C.C. (1993). Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9, 825-833.

Mauricio J.C i Salmon, J.M. (1992). Apparent loss of sugar transport activity in *Saccharomyces cerevisiae* may mainly account for maximum ethanol production during Alcoholic fermentation. *Biotech. Lett.*, 14, 577-582.

Novak, S., D'Amore, T., Russell, I. i Stewart, G.G. (1991). Sugar uptake in a 2-deoxy-D-glucose resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol.*, 7, 35-40.

Ongjoco, R., Szutnicka, K. i Cirillo, V.P. (1987). Glucose transport in vesicles reconstituted from *Saccharomyces cerevisiae* membranes and liposomes. *J. Bacteriol.*, 169, 2926-2931.

Orlowski, J.H. i Barford, J.P. (1987). The mechanism of uptake of multiple sugars by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture under fully aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 459-463.

Panchal, C.J. i Stewart, G.G. (1982). The influence of media conditions on the utilisation of monosaccharides by strain of *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*). *J. Inst. Brew.*, 88, 86-89.

Ramos, J. i Cirillo, V.P. (1989). Role of cyclic-AMP-dependent protein kinase in catabolite inactivation of the glucose and galactose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171, 3545-3548.

Salmon, J.M. 1989. Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 953-958.

Salmon, J.M., Vincent, O., Mauricio, J.C., Bely, M. i Barre, P. (1993). Sugar Transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 56-64.

Sanz, P., Randez-Gil, F. i Prieto, J.A. (1994). Molecular characterization of a gene that confers 2-deoxyglucose resistance in yeast. *Yeast.*, 10, 1195-1202.

Schaaff, I., Heinisch, J. i Zimmermann, F.K. (1989). Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast*, 5, 285-290.

Schutz, M. i Gafner, J. (1995). Lower fructose uptake capacity of genetically characterized strains of *Saccharomyces bayanus* compared to strains of *Saccharomyces cerevisiae*: a likely cause of reduced alcoholic fermentation activity. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 175-180.

Serrano, R. i DelaFuente, G. (1974). Regulatory properties of the constitutive hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 5, 161-171.

Slaughter, J.C., Smith, J.P. i Mitchell, W.J. (1991). Glucose transport throughout fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1108. *Lett. Appl. Microbiol.*, 12, 221-223.

Van de Aar, P.C., Lopes, T.S., Klootwijk, J., Groenveld, Ph., Van Verseveld, H.W. i Stouthamer, A.H. (1990). Consequences of phosphoglycerate kinase for the growth and physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 577-587.

Van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W.A. i Van Dijken, J.P. (1989). Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeast. *J. Gen. Microbiol.*, 135, 2399-2406.

Zamora, F., Arola, L. i Alemany, M. (1988). In vitro glucose and 2-aminoisobutyric acid uptake by rat interscapular brown adipose tissue. *Biochim. Biophys Acta.*, 968, 346-352.

CAPÍTOL 5

5. COMPORTAMENT DEL TRANSPORTADOR DE SUCRES EN PRESENCIA DE COURE I DE DICLOFLUANIDA

5.1. INTRODUCCIÓ

Una de les possibles causes que pot provocar els alentiments i aturades de fermentació, tal com apuntavem en l'apartat 3 de la introducció general, és la presència dels residus de productes fitosanitaris en el most (Girond i col., 1989; Larue, 1991; Otero i col., 1994), que els viticultors utilitzen per tal de preservar les seves collites de l'atac dels paràsits i de les malalties de la vinya (Carbonel-Grinbaum, 1989; Dominguez, 1993).

Diversos autors (Lafon-Lafourcade i col., 1984; Does i col., 1989; Salmon, 1989; Salmon i col., 1993) han postulat que el transport de sucres, podria ser un dels factors limitants de la regulació de la velocitat del metabolisme glucídic en llevats, i per tant seria susceptible de ser una de les causes que provocarien els alentiments i aturades de fermentació.

Interessats per l'efecte que poguessin tenir pesticides com el coure i la diclofluanida respecte aquests transportadors d'hexoses, en aquest capítol hem dissenyat experiments amb cèl.lules incubades i amb cèl.lules que han crescut en presència d'aquests plaguicides per tal de conèixer l'influència dels mateixos sobre la captació de sucres.

5.2. MATERIALS I MÈTODES

5.2.1. ELS LLEVATS (Veieu capítol 2, apartat 2.2.1.)

5.2.2. EL MEDI DE CULTIU (Veieu capítol 2, apartat 2.2.2.)

Per tal de provocar una situació crítica pels llevats i així obtenir una resposta més clara dels mecanismes de *Saccharomyces cerevisiae* que poden quedar afectats, es va augmentar fins al 13%, el grau alcohòlic del most. En aquestes condicions, s'obté una densitat aproximada de 1085 mg/ml a la temperatura de 20°C, que correspon aproximadament a 220 g/l de sucres reductors.

5.2.3. ELS PESTICIDES (Veieu capítol 1, apartat 1.4., Taules 1a i 1b)

A partir dels resultats obtinguts en el capítol 2 d'aquest apartat, es seleccionaren el coure i la diclofluanida com únics pesticides que afectaven tant la dinàmica fermentativa com les poblacions de llevats. Les dosis escollides van ser 5 i 50 ppm de coure, que corresponen a una dosi normal i a una dosi sense guardar el període de seguretat. Per la diclofluanida es seleccionaren dosis de 1 i 3 ppm, ambdues corresponents a nivells assolits quan no es guarden els períodes de seguretat.

5.2.4. PREPARACIÓ DELS FERMENTADORS (Veieu capítol 2, apartat 2.2.4.a. i apartat 2.2.4.b.)

5.2.5. COMPTATGE DE LLEVATS (Veieu capítol 2, apartat 2.2.5.)

5.2.6. MESURA DE L'ACTIVITAT DEL TRANSPORTADOR D'HEXOSES (Veieu capítol 4, apartat 3.2.5.b)

Per estudiar l'efecte que tenen el coure i la diclofluanida en cèl.lules incubades durant 1 h, es prepararen solucions sintètiques control (1 g/l, 5 g/l i 10 g/l de glucosa o bé 5,55 mM, 27,7 mM i 55,5 mM de glucosa respectivament, 6 g/l d'àcid tartàric i ajustades a pH= 3,5) a les que s'hi afegien dosis de 1 ppm, 5 ppm, 50 ppm, 100 ppm i de 200 ppm de coure per estudiar la influència d'aquest pesticida inorgànic sobre el transportador de sucres. Pel seguiment de la incidència de la diclofluanida sobre l'esmentat transportador, a les solucions sintètiques control, se'ls hi afegien dosis de 1 ppm, 3 ppm i de 5 ppm d'aquest pesticida.

També es realitzaren experiments a partir de fermentacions en presència de 5 ppm i de 50 ppm de coure i en presència de 1 ppm i de 3 ppm de diclofluanida, amb l'objectiu de conèixer la influència d'aquests pesticides sobre el transportador de monosacàrids en condicions més reals, i poder-los comparar amb els resultats obtinguts de les incubacions amb medis sintètics.

El procediment a seguir fou el exactament el mateix per ambdues condicions amb la diferència d'utilitzar, en aquest darrer cas, com a medi d'incubació solucions sintètiques control.

Les dosis escollides pel coure es corresponen més o menys amb les trobades en condicions d'aplicacions normals i en condicions d'aplicacions sense guardar els períodes de seguretat, en la vinificació en blanc (Capítol 1 de l'apartat de Resultats), i les escollides per la

diclofluanida corresponen a condicions d'aplicacions sense guardar els períodes de seguretat, en la vinificació en blanc.

Per l'estudi amb cèl.lules incubades amb plaguicides, s'utilitzaran llevats en 3er. dia de fermentació corresponent a la fase exponencial de creixement de la població durant la fermentació alcohòlica. La presa de mostres de l'experiment de creixement dels llevats en presència de pesticides es fa els dies 3 coincidint amb la fase exponencial o logarítmica de creixement de la població, el dia 7 corresponent a la fase de retardament del creixement, el dia 11 que coincideix amb la fase estacionària i en dia 17 que correspon a la fase de declinació del creixement dels llevats.

5.2.7. TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES MOSTRES

L'anàlisi estadística de les diferències entre grups es va realitzar mitjançant la prova t de Student, amb el paquet estadístic Statview 4.0 (Abacus, USA).

5.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

a. Influència de la concentració de coure sobre la captació de sucres

A partir dels resultats de la Figura 5.4.1 i la Taula 5.4.1 es pot afirmar que dosis baixes d'aquest pesticida (1 i 5 ppm, concentracions habituals en el most) no presenten variacions significatives de l'activitat del transportador de baixa afinitat, tot hi que hi ha una sensible pèrdua de l'afinitat pel substrat. En presència de 50, 100 i 200 ppm de coure l'activitat del transportador de glucosa baixa a mesura que incrementa la concentració d'aquest producte fitosanitari, de tal manera que podríem apuntar una lleugera similitud amb la inhibició acompetitiva degut al cert paralelisme que presenten les representacions en la gràfica de Lineweaver-Burk i al decreixement dels valors de la K_m i V_{max} per cada dosis. Es troben doncs, devallades de la V_{max} del 24, 56 i 60% en presència de 50, 100 i 200 ppm de coure respectivament, resultats que fan que disminueixi la velocitat de la cinètica fermentativa en aquestes condicions (Ross, 1977) i que possiblement junt amb altres factors, podrien provocar relentiments o aturades en la fermentació alcohòlica.

b. Influència de la concentració de diclofluanida sobre la captació de sucres

A dosis creixents de diclofluanida el valor de l'activitat del transportador de la glucosa disminueix (Figura 5.4.2 i Taula 5.4.2). La inhibició en aquest cas podria ser, de la mateixa manera que el coure, acompetitiva però el paralelisme de la representació de Lineweaver-Burk es fa menys evident que en el cas anterior, tot i que la K_m i la V_{max} de cada dosis, decreixen quan la concentració de l'inhibidor (diclofluanida) augmenta. Els percentatges de decreixement de la V_{max} són del 16% per 1 ppm de pesticida, 48% per 3

ppm i del 80% per 5 ppm. Aquests resultats, de la mateixa manera que en el cas anterior (apartat a d'aquest capítol), poden justificar el alentiment de la cinètica fermentativa observat en la Figura 3.4.2 del Capítol 3.

c. Influència de la presència de coure en el most sobre la captació de sucres

En aquest cas hem fet créixer els llevats en presència de 5 i 50 ppm de coure d'acord amb les dosis que vàrem trobar en el Capítol 1 de resultats. En la Figura 5.4.3 i en la Taula 5.4.3 es presenten els resultats corresponents a la cinètica de captació del 3er dia de fermentació, i només s'observa una lleugera diferència respecte als resultats obtinguts en l'experiment anterior d'incubació en presència de coure (apartat a). Així doncs, els llevats que han crescut en presència de 5 ppm de coure sofreixen una sensible davallada de l'activitat del transportador de glucosa, presentant una major afinitat (K_m més baixa) i un decreixement de la V_{max} del 12%. A 50 ppm de coure, també s'observa una lleugera baixada de l'activitat del transportador (V_{max} 30%) respecte a l'experiment d'incubació en presència de 50 ppm de coure (V_{max} del 24%). En aquestes condicions, tot i que l'inhibició continua sent aproximadament acompetitiva es fa evident que el creixement dels llevats en presència de coure té un efecte sensiblement superior respecte als llevats que només han estat incubats 1 h en presència d'aquest pesticida inorgànic.

En la Figura 5.4.4 es donen els resultats de l'evolució de la captació de sucres en presència de coure en diferents dies de fermentació. S'observa com l'activitat del transportador de la glucosa decreix durant la fermentació alcohòlica a mesura que baixa la concentració de glucosa en el medi i que puja la concentració d'etanol. En aquests gràfics queda clar que a dosis baixes d'aquest pesticida (5 ppm) la captació de glucosa durant la fermentació no es veu afectada, resultats que concorden amb les observacions de diversos autors (Minarik i col., 1975; Minarik, 1979; Girond i col., 1989), fins hi tot Bureau i col. (1982) afirmen que dosis normals de coure en el most exerceixen una acció positiva afavorint el desenvolupament de les espècies de *Saccharomyces*, així com també afavorint el desenvolupament de la fermentació.

En canvi a dosis de 50 ppm, la captació es veu afectada de manera significativa fins gairebé al final de la fermentació (17è dia aproximadament) moment en el que les diferències deixen de ser significatives. Aquestes observacions estan en consonància amb els resultats obtinguts per Akrida-Demertzi i col. (1990), aquests autors afirmen que la velocitat de fermentació, el rediment i el creixement cel.lular experimenten una davallada en presència de 50 ppm de coure, i atribueixen el decreixement d'aquests paràmetres a l'efecte que té la captació de coure sobre la incorporació de glucosa pels llevats.

També cal ressaltar que en els dies 7, 11 i 17 a concentracions baixes de glucosa (1 g/l i 5g/l o 5,55 M i 27,7 M) hi ha un comportament michaelià semblant al del 3er dia de fermentació, mentre que a concentracions de glucosa de 10 g/l (55,5 M) hi ha una davallada important de l'activitat del transportador de glucosa. Aquest comportament pot estar relacionat amb el fet que durant aquests dies la concentració de glucosa del medi ha baixat considerablement i en aquesta situació, el sistema de transport de glucosa d'alta afinitat pot començar a representar un important percentatge en la captació de sucres (Bisson i col., 1984; Ramos i col., 1989; Sanz i col., 1994). La incubació d'aquestes cèl·lules amb solucions sintètiques que continguin concentracions de glucosa més elevades que les reals podria reprimir el sistema d'alta afinitat (Bisson i col., 1987) produint la davallada observada en la captació de sucres. De totes maneres aquest no seria el cas del dia 7 de fermentació.

Per tant és obvi que en presència de 50 ppm de coure, l'activitat dels sistemes de transport de sucres es veu disminuïda gairebé fins als estadis finals de la fermentació, recuperant-se posteriorment respecte als fermentadors control. Llavors, sabent que els resultats del Capítol 4 d'aquest apartat, confirmaven que la captació d'hexoses limitava la velocitat de la fermentació alcohòlica, podem afirmar que la presència d'elevats continguts de coure procedents dels tractaments fitosanitaris sense guardar els períodes de seguretat, són susceptibles de provocar junt amb altres factors, els relentiments i aturades de fermentació per la seva acció sobre el transportador d'hexoses.

d. Influència de la presència de diclofluanida en el most sobre la captació de sucres

Procedint de la mateixa manera que en el cas anterior (apartat c) s'han obtingut els resultats que presentem en la Figura 5.4.5 i en la Taula 5.4.4 La possible inhibició competitiva que trobarem en l'apartat b d'aquest capítol, en aquestes condicions, es fa més evident (devallada de la Km i Vmax i representació de Lineweaver-Burk).

Quan els llevats creixen en presència de 1 ppm de diclofluanida, s'observa una inhibició molt més forta de l'activitat del transportador (decreixement de la Vmax del 52%) que en condicions d'incubació (decreixement de la Vmax del 16 %), efecte que no és tan acusat en presència de 3 ppm de diclofluanida (inhibició de l'activitat en condicions d'incubació: 48%; inhibició de l'activitat en condicions de creixement: 52%). Aquest comportament es deu a que els fermentadors que contenien 1 ppm de diclofluanida tot i que experimentaren un lleuger retardament en la dinàmica fermentativa, més o menys finalitzaren com els fermentadors control. En canvi en els fermentadors que contenien 3 ppm d'aquest pesticida, s'observà un retardament de dos dies i mig en l'inici de la fermentació, evidentment quan aquesta començà, els fermentadors amb 3 ppm de diclofluanida estaven en una fase

diferent de la fermentació (més retardada) respecte al control i per això el resultat obtingut és de menys inhibició que la dosi de 1 ppm respecte al control.

Aquests alentiments a l'inici de la fermentació es deuen a que els nivells de diclofluanida en el most han de disminuir per hidròlisi fins assolir valors inferiors a 0,3 ppm d'aquest pesticida (Dvorak i col., 1970). En aquesta situació la població, que ha sofert un important mortalitat, necessita un període per reconstruir la densitat cel.lular viable que li permeti reiniciar la fermentació (Sapis-Domerq, 1980; Girond i col., 1989; Dominguez i col., 1995). De totes maneres dependrà de la dosi (entre altres factors), perquè només es tracti d'un relentiment o bé es produeixi una aturada de la fermentació alcohòlica

En la Figura 5.4.6 corresponent a l'evolució de la disminució de la captació de glucosa dels llevats, s'observa tal com abans (apartat c), la inhibició per excés de substrate del transportador d'alta afinitat en els dies 11 i 17 de fermentació quan les concentracions de glucosa són baixes, quedant sense una explicació lògica el comportament observat en el dia 7. En aquesta Figura també es fa evident com l'activitat del transportador dels llevats que han crescut en presència de 1 ppm de pesticida, es significativament inferior durant la primera meitat de la fermentació, respecte a l'activitat dels que han crescut en presència de 3 ppm i que es troben en una fase diferent de la fermentació. Ambdues activitats a la vegada són significativament inferiors a la del control (amb l'excepció de la captació a baixos nivells de glucosa). En el 11è dia de fermentació, l'activitat del transportador que ha fermentat en presència de 3 ppm de diclofluanida, experimenta una forta davallada assolint els mateixos nivells d'activitat que els fermentadors que contenen 1 ppm de pesticida. La dràstica davallada de la captació de glucosa dels fermentadors que contenen 3 ppm continua fins que en el 17è dia, el transportador de sucres queda inactivat. En canvi a dosi de 1 ppm, l'activitat d'incorporació d'hexoses no presenta diferències significatives respecte a les activitats dels fermentadors control.

La disminució de l'activitat del sistema de transport de sucres es fa més que evident per les dosis de diclofluanida estudiades, fet que pot justificar perfectament, l'aturada inicial de la fermentació i el posterior alentiment de la mateixa, observades en els capítols precedents.

5.4. TAULES I FIGURES

TAULA 5.4.1 Influència de la concentració de coure sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.

	Lineweaver-Burk			Eadie-Hofstee		
	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)
Control	0,999	32 \pm 2,9	25 \pm 1,9	0,990	34 \pm 2,9	26 \pm 1,7
Coure (1 ppm)	0,999	43 \pm 3,5*	29 \pm 1,7	0,993	41 \pm 3*	28 \pm 1,3
Coure (5 ppm)	0,999	37 \pm 1,8	28 \pm 1,4	0,967	31 \pm 1,3	24 \pm 1,1
Coure (50 ppm)	0,999	24 \pm 1,1*	19 \pm 0,9*	0,999	24 \pm 1,1*	19 \pm 0,8*
Coure (100 ppm)	0,984	12 \pm 0,5*	11 \pm 0,2*	0,892	13 \pm 0,4*	12 \pm 0,2*
Coure (200 ppm)	0,992	11 \pm 0,4*	10 \pm 0,4*	0,948	12 \pm 0,3*	10 \pm 0,4*

TAULA 5.4.2 Influència de la concentració de diclofluanida sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.

	Lineweaver-Burk			Eadie-Hofstee		
	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)
Control	0,999	32 \pm 2,9	25	0,990	34 \pm 2,9	26 \pm 1,7
Diclofluanida (1 ppm)	0,998	26 \pm 1,9*	21 \pm 1,3*	0,951	28 \pm 1,8*	21 \pm 1,1*
Diclofluanida (3 ppm)	1	15 \pm 1,1*	13 \pm 0,8*	0,999	15 \pm 1,1*	13 \pm 0,8*
Diclofluanida (5 ppm)	0,799	5 \pm 0,3*	5 \pm 0,3*	0,423	4 \pm 0,2*	5 \pm 0,2*

TAULA 5.4.3 Influència de la presència de coure sobre la captació de sucres pels llevats en 3er. dia de fermentació. Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.

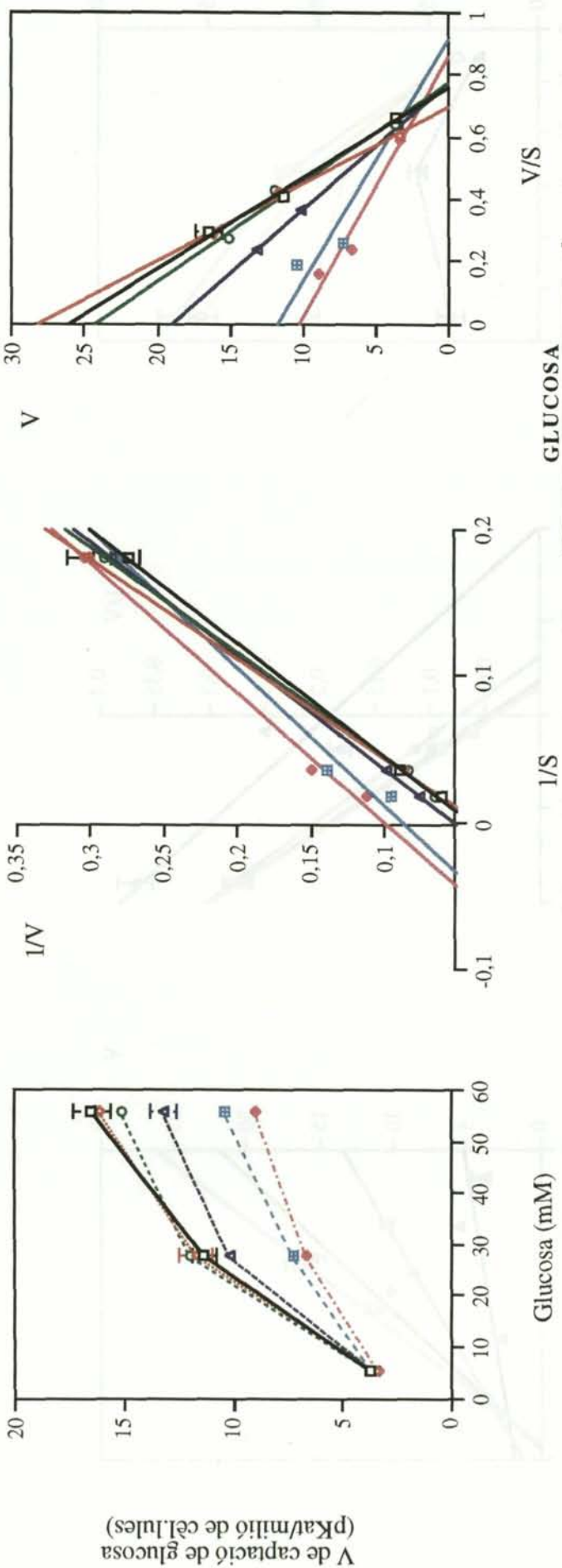
	Lineweaver-Burk			Eadie-Hofstee		
	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)
Control	0,999	33 \pm 2,9	27 \pm 1,9	0,990	31 \pm 2,7	27 \pm 1,9
Coure (5 ppm)	0,999	24 \pm 1,9*	22 \pm 1,6*	0,980	22 \pm 1,6*	21 \pm 1,3*
Coure (50 ppm)	0,998	22 \pm 1,1*	17 \pm 1*	0,967	21 \pm 1*	17 \pm 0,8*

TAULA 5.4.4 Influència de la presència de diclofluanida sobre la captació de sucres pels llevats en 3er. dia de fermentació. Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.

	Lineweaver-Burk			Eadie-Hofstee		
	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)	r ²	Km (mM)	Vmax (pKat/milió de cèl.lules)
Control	0,999	33 \pm 2,9	27 \pm 1,8	0,990	31 \pm 2,7	27 \pm 1,9
Diclofluanida (1 ppm)	1	18 \pm 1,3*	13 \pm 0,8*	0,999	18 \pm 1,3*	13 \pm 0,8*
Diclofluanida (3 ppm)	0,996	22 \pm 1,7*	17 \pm 1,2*	0,919	20 \pm 1,5*	16 \pm 1,1*



la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.



COURE	GLUCOSA		
	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
C - 1 ppm	-	-	-
C - 5 ppm	-	-	-
C - 50 ppm	-	S	S
C - 100 ppm	-	S	S
C - 200 ppm	S	S	S

- Control
- Coure (1 ppm)
- Coure (5 ppm)
- ▲-·-· Coure (50 ppm)
- Coure (100 ppm)
- ◆----- Coure (200 ppm)

V captació de glucosa
 (pKat/milió de cèl.lules)

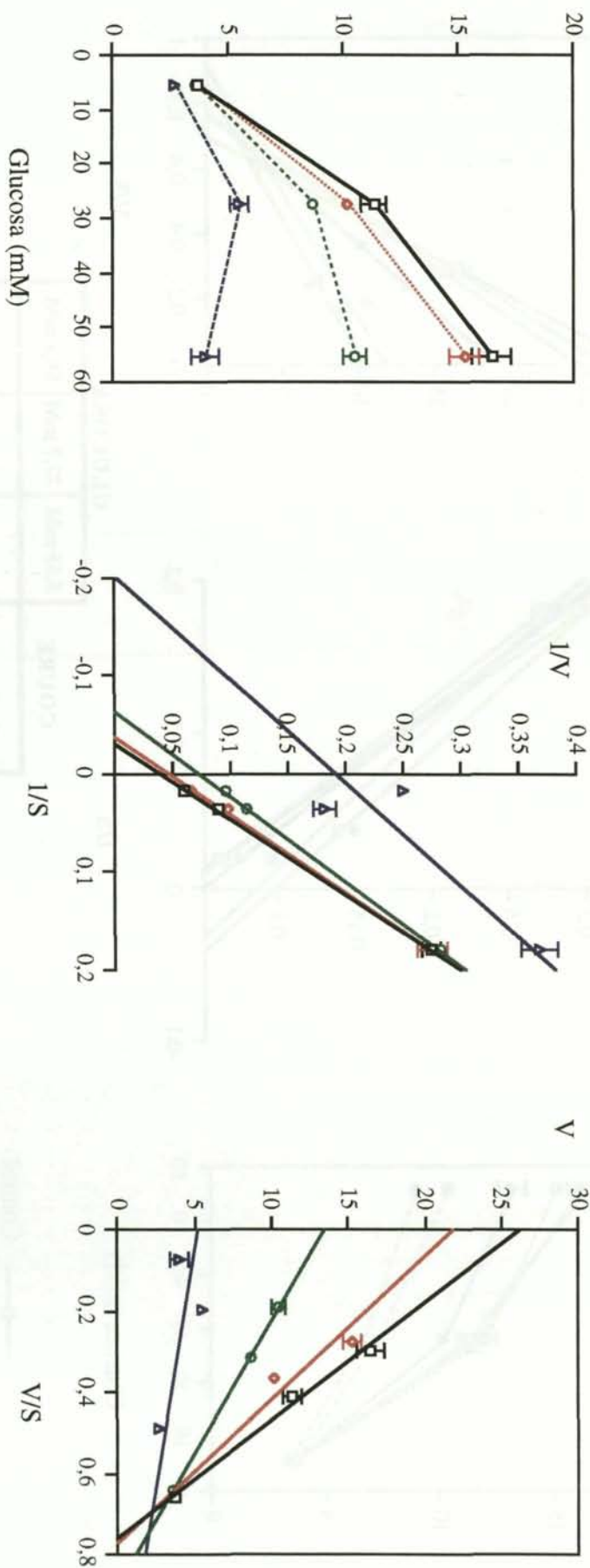


FIGURA 5.4.2 Influència de la concentració de diclofluanida sobre la captació de sucres (3er. dia de fermentació). Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($P < 0,05$) respecte al control.

DC		GLUCOSA		
C-1 ppm	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM	-
C-3 ppm	-	S	S	S
C-5 ppm	-	S	S	S

FIGURA 5.4.3 Influència de la presència de coure en el most sobre la captació de sucres pels llevats en 3er. dia de fermentació. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica \pm Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,005$) respecte al control.

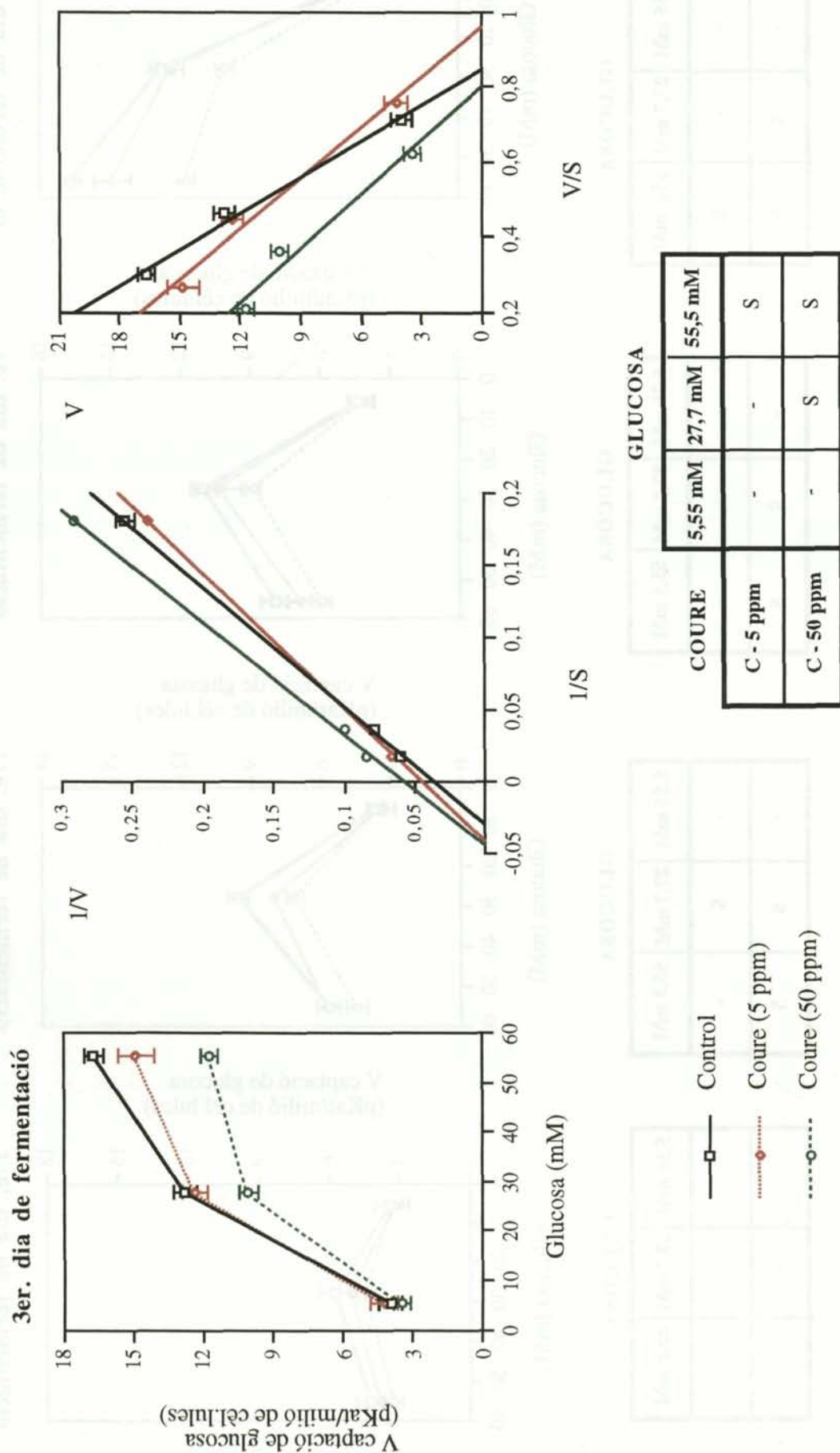
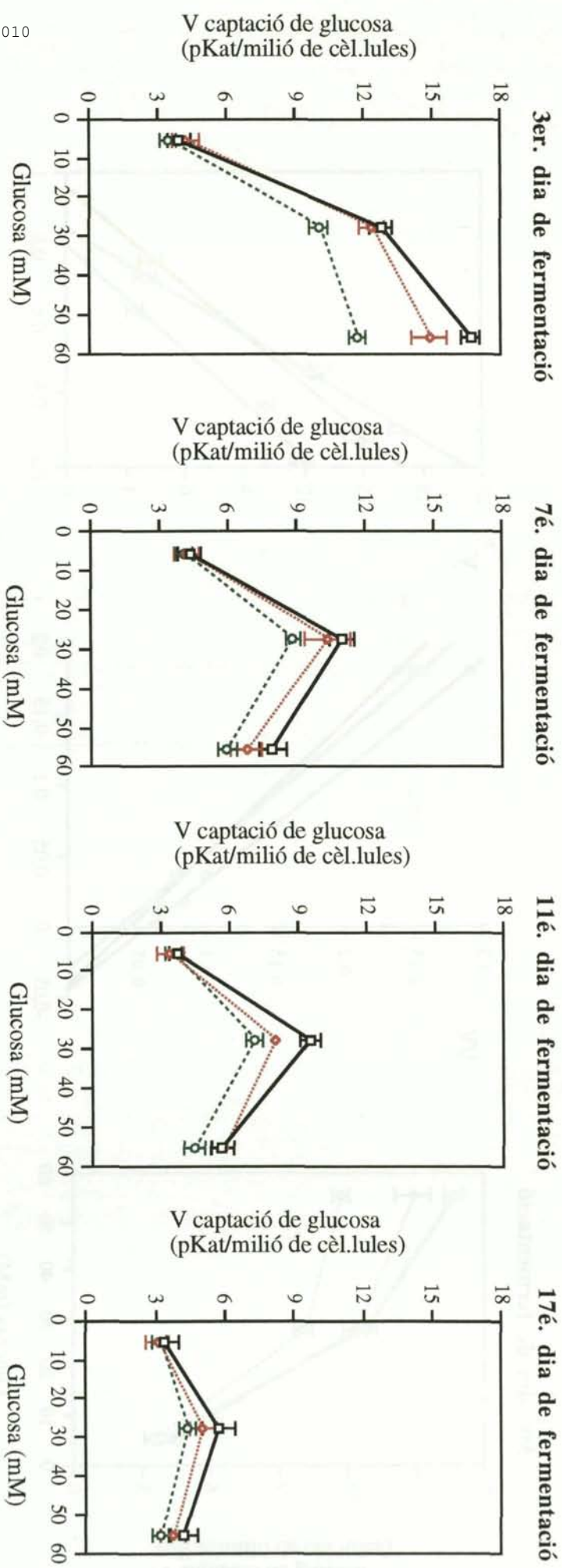


FIGURA 5.4.4 Influència de la presència de coure en el most sobre la captació de sucres pels llevats en diferents dies de fermentació. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error típus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.

—□— Control ●..... Coure (5 ppm) ○..... Coure (50 ppm)



GLUCOSA

COURE	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
5 - 5 ppm	-	-	S
C - 50 ppm	-	S	S

GLUCOSA

	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
	-	-	-
	-	S	S

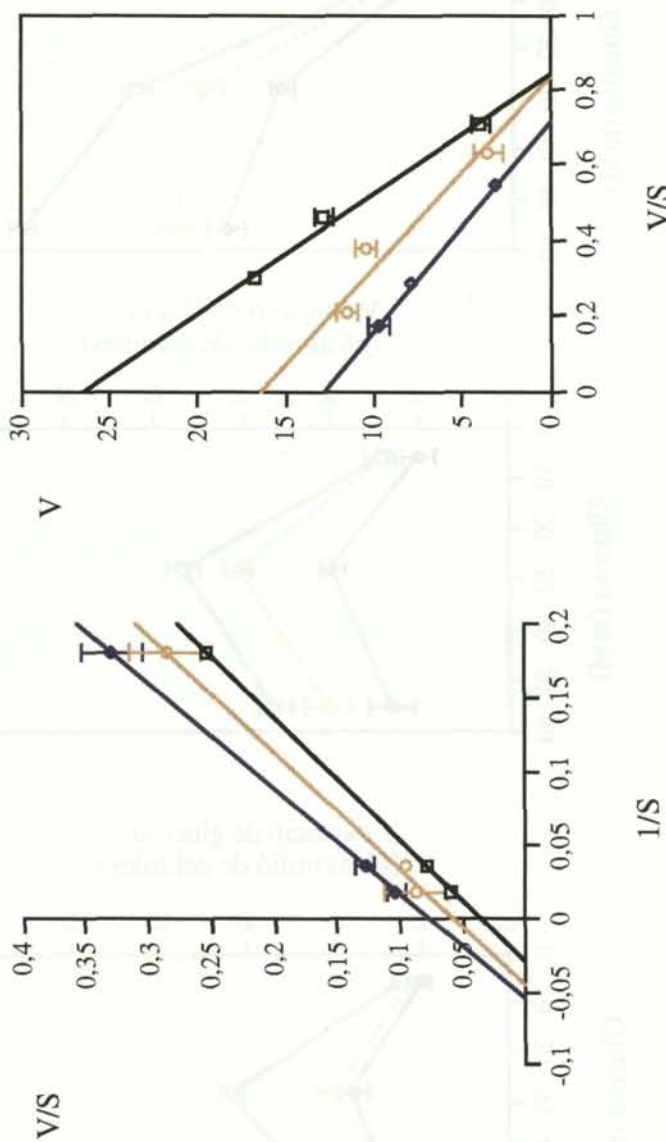
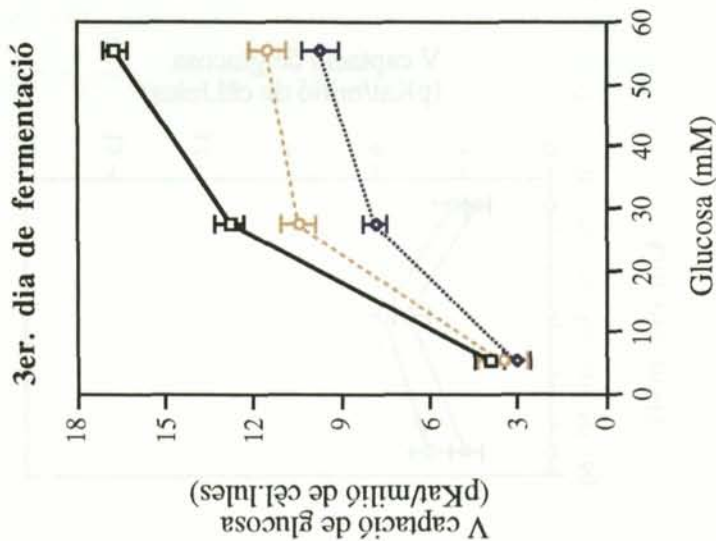
GLUCOSA

	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
	-	S	-
	-	S	S

GLUCOSA

	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
	-	-	-
	-	-	-

FIGURA 5.4.5 Influència de la presència de diclofluanida en el most sobre la captació de sucres pels llevats en 3er. dia de fermentació. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica \pm Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.

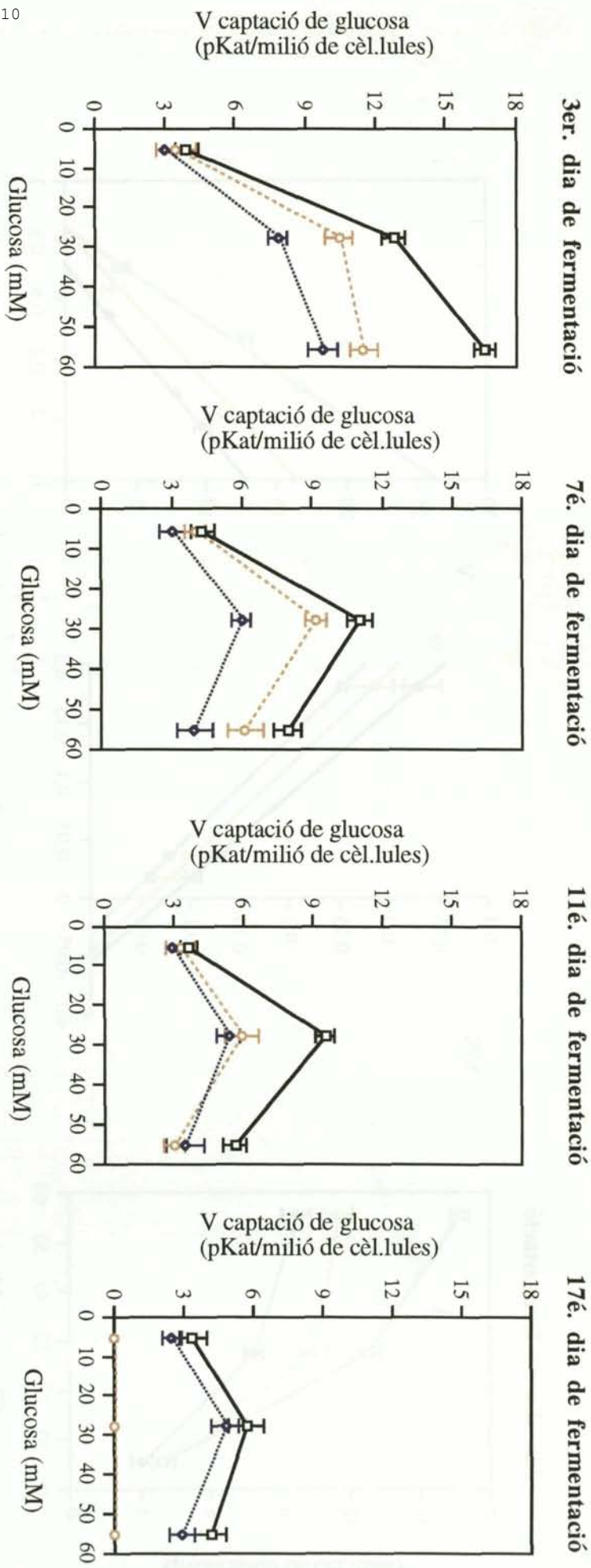


DC	GLUCOSA		
	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
C - 1 ppm	-	S	S
C - 3 ppm	-	S	S

- Control
-◆..... Diclofluanida (1 ppm)
-◇..... Diclofluanida (3 ppm)

FIGURA 5.4.6 Influència de la presència de diclofluanida en el most sobre la captació de sucres pels llevats en diferents dies de fermentació. Els resultats es donen com la Mitjana aritmètica ± Error tipus de 5 rèpliques. (S) indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al control.

—□— Control ●..... Diclofluanida (1 ppm) ○..... Diclofluanida (3 ppm)



GLUCOSA

DC	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
C-1 ppm	-	S	S
C-3 ppm	-	S	S

GLUCOSA

DC	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
C-1 ppm	S	S	S
C-3 ppm	-	S	S

GLUCOSA

DC	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
C-1 ppm	S	S	S
C-3 ppm	-	S	S

GLUCOSA

DC	5,55 mM	27,7 mM	55,5 mM
C-1 ppm	-	-	-
C-3 ppm	S	S	S

5.5. CONCLUSIONS

1. El transportador de sucres està fortament inhibit en els llevats de 3r dia de fermentació incubats amb dosis iguals o superiors a 50 ppm de coure. Aquest efecte inhibidor del coure es va mostrar encara més marcat en els llevats que havien crescut en presència d'aquest catió i és manté fins al dia 11é de fermentació. En el dia 17è de fermentació, no s'observen diferències significatives.
2. La diclofluanida exerceix un efecte clarament inhibidor sobre el transportador de sucres dels llevats de 3er dia de fermentació incubats en presència d'aquest pesticida. De la mateixa manera que en el cas del coure, aquest efecte inhibidor és més important quan els llevats creixen en presència de diclofluanida i és manté durant tot el procés fermentatiu.
3. Tenint present que les activitats dels enzims de la glucòlisi conserven una activitat potencial suficient en presència d'aquests plaguicides, l'inbició del transport de sucres per efecte del coure i de la diclofluanida, pot justificar els relentiments de la cinètica fermentativa provocats per aquests pesticides.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA

**ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA DEL COURE I LA
DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA
FERMENTATIVA I EL METABOLISME DE**
Saccharomyces cerevisiae



Memòria presentada per
MARIA FRANCESCA FORT MARSAL
per optar al grau de Doctora en Ciències Químiques
sota la Direcció del Dr. Lluís Arola Ferrer i del Dr. Fernando Zamora Marín

5.6. BIBLIOGRAFIA

Akrida-Demertzi, K., Drainas, C. i Koutinas A.A. (1990). Significance of copper in alcohol production with fermentation of raisin extracts by the cell recycle process. *J. Food Sci.*, 55, 6, 1588-1616.

Bisson, L.F. i Fraenkel, D.G. (1984). Expression of kinase-dependent uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 159, 1013-1017.

Bisson, L.F., Neigeborn, L., Carlson, M. i Fraenkel, D.G. (1987). The SNF3 gene is required for high-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 169, 1656-1662.

Bureau, G., Brun, O., Vignes, A., Maujean, A., Vessells, G. i Feuillat, M. (1982). Étude de la microflore levurienne champenoise. *Conn. Vigne Vins*, 16, 15-31.

Carbonel-Grinbaum, M. (1989). Les résidus de produits agro-pharmaceutiques: leurs incidences oenologiques essentielles, comment les limiter? *Vignes et Vins*. 1989, 4 Nov., 37-40.

Does, A.L. i Bisson, L.F. (1989). Comparison of glucose uptake kinetics in different yeast. *J. Bacteriol.*, 171, 1303-1308.

Dominguez, F. (1993). Plagas y Enfermedades de la vid, In *Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas* : Mundi-Prensa, Madrid, pp 711-769.

Dominguez, J.; Hernáez, J.L.; Otero, D.; Pastrana, L.; i Pazos, Y. (1995). Los residuos antibióticos en las fermentaciones vinicas. Incidencias en la calidad del vino. *Viticultura y Enología*. 111-123.

Dvorak, V. i Schopfer J.F. (1970). Rémanence de l'Euparène et vinification. *Rev. Suisse Vitic. Arboric.*, 2, 5, 99-104.

Girond, S., Blazy-Maugen, Michel, G. i Bosch, M. (1989). Influence de quelques pesticides viticoles sur les levures et la fermentation. *Revue Française d'Oenologie*, 119, 14-22.

Lafon-Lafourcade, S., Geneix, G. i Ribereau-Gayon, P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeast and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1246-1249.

- Larue, F.** (1991). IBS: des fongicides qui perturbent les fermentations. *Vitis.*, 139,106-108.
- Minarik, E.** (1979). Les pesticides et leur influence sur la fermentation. Intl. Congress on Microbiology in Food Industries, APRIA, 7-12 oct., Comptes-rendus, 65-84.
- Minarik, E. i Regala, P.** (1975). L'action sélectionnante des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins de cuve. 4ème Symposium d'oenologie international Valence. 212-237.
- Otero, D.; Mañas, L.; Dominguez, J.** (1993). Efecto de los residuos antibotróficos sobre poblaciones levaduriformes. Su incidencia sobre la calidad del vino (I). *Vitivinicultura.*, 5-6, 35-39.
- Ramos, J. i Cirillo, V.P.** (1989). Role of cyclic-AMP-dependent protein kinase in catbolite inactivation of the glucose and galactose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171, 3545-3548.
- Ross, I.S.** (1977). Effect of glucose on copper untake and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 69, 1, 77-81.
- Salmon, J.M.** 1989. Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 953-958.
- Salmon, J.M., Vincent, O., Mauricio, J.C., Bely, M. i Barre, P.** (1993). Sugar Transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 56-64.
- Sanz, P., Randez-Gil, F. i Prieto, J.A.** (1994). Molecular characterization of a gene that confers 2-deoxyglucose resistance in yeast. *Yeast.*, 10, 1195-1202.
- Sapis-Domerq, S.** (1980). Étude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vins. Experimentation 1978 - 1979. Comparaison avec les résultats de 1975, 1976 et 1977. *Connaissance Vigne Vin.*, 14, 3, 155-181.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

CAPÍTOL 6

6. INFLUÈNCIA DE LES DIFERENTS DOSIS DE COURE I DICLOFLUANIDA SOBRE LA COMPOSICIÓ DEL VI.

6.1. INTRODUCCIÓ

Els residus dels productes fitosanitaris de la vinya poden provocar una sèrie d'efectes, majoritàriament indesitjables, que poden alterar la qualitat del vi. La incidència d'aquests pesticides d'ús habitual en viticultura, pot generar conseqüències a dos nivells:

- aparició de gustos i olors característics d'aquests productes, lligats a la naturalesa del seu principi actiu i a la seva formulació (Freydier i col., 1989; Glories, 1988; Maujean, 1989; Cuenat i col., 1990)

- modificacions organolèptiques i dels paràmetres analítics del vi provocats ja sigui, per les perturbacions dels desequilibris naturals entre les diferents espècies microbianes (llevats i bacteries), ja sigui per la influència sobre l'activitat cinètica i el creixement dels llevats responsables de la formació dels aromes fermentatius (Otero i col., 1993; Dominguez i col., 1995).

En aquests capítol ens dispodem a estudiar els principals paràmetres analítics dels vins finals resultants de les fermentacions efectuades en presència de 1, 5 i 50 ppm de coure, i 1, 3 i 5 ppm de diclofluanida, comparant-los amb els vins elaborats en condicions control.

6.2. MATERIALS I MÈTODES

6.2.1. ELS LLEVATS (Veieu capítol 2, apartat 2.2.1.)

6.2.2. EL MEDI DE CULTIU (Veieu capítol 2, apartat 2.2.2.)

Per tal de provocar una situació crítica pels llevats i així obtenir una resposta més clara dels mecanismes de *Saccharomyces cerevisiae* que poden quedar afectats, es va augmentar fins al 13%, el grau alcohòlic del most. En aquestes condicions, s'obté una densitat aproximada de 1085 mg/ml a la temperatura de 20°C, que correspon aproximadament a 220 g/l de sucres reductors.

6.2.3. ELS PESTICIDES (Veieu capítol 1, apartat 1.4., Taules 1a i 1b)

A partir dels resultats obtinguts en el capítol 2 d'aquest apartat, es seleccionaren el coure i la diclofluanida com únics pesticides que afectaven tant la dinàmica fermentativa com les poblacions de llevats.

6.2.4. PREPARACIÓ DELS FERMENTADORS (Veieu capítol 2, apartat 2.2.4.a. i apartat 2.2.4.b.)

6.2.5. ANÀLISI DELS PRODUCTES MAJORITARIS

El grau alcohòlic dels vins va ser determinat per espectrofotometria d'infraroig proper (Dumolin i col., 1987), utilitzant un equip Technicon InfrAlyzer 400. La determinació de les concentracions de D-glucosa, D-fructosa, àcid acètic, glicerol, àcid succínic, àcids D- i L-làctic i ió amoni, així com l'acidesa total dels vins van ésser realitzades utilitzant els mètodes oficials de la Comunitat Europea (European Community, 1990)

6.2.6. QUANTIFICACIÓ DELS ALCOHOLS SUPERIORS

Els alcohols superiors, el 1-propanol, el 2-metil 1-propanol, el 2-metil 1-butanol, el 3-metil 1-butanol, el D(-)2,3-butanodiol, el (meso)-2,3-butanodiol i 1,2 propanodiol, junt amb l'acetaldehid i l'acetat d'etil, es determinaren per cromatografia de gasos d'acord amb el mètode descrit per (Bertrand i col., 1989). S'utilitzà com a patró intern el 4-metil-2-pentanol. Tots ells van ser suministrats per la casa comercial Fluka Química (Madrid, Espanya). Per la confecció del patró de referència es va preparar una solució hidroalcohòlica al 12% d'etanol a la que s'hi havia afegit 2000 ppm de cada compost, 3,5 g/l d'àcid tartàric i s'ajustava a pH= 3,5. El patró intern es realitzà a base d'una solució hidroalcohòlica al 12% d'etanol, a la que s'hi havia afegit 3,5 g/l d'àcid tartàric, 10 g/l de 4-metil-2-pentanol i s'ajustava a pH= 3,5.

Per la preparació de les mostres que s'havien d'analitzar es van agafar 5 ml de cada mostra de vi i s'hi afegiren 50 µl de patró intern, finalment es van injectar 0,1 µl en el sistema cromatogràfic.

L'anàlisi dels compostos esmentats es va dur a terme mitjançant un cromatograf de gasos HP 5890 series II, acoplat a un detector de masses HP 5972 series. Per la separació dels compostos s'utilitzà una columna capilar CPwax 57CB (50 m x 0,25 mm d.i., 0,2 µm) subministrada per la casa Chrompak, i com a gas portador es va emprar Heli d'alta puresa (pressió de columna 173 kPa). La injecció es realitzà mitjançant el mètode "split" amb una divisió de fluxe de 60 ml/min. La temperatura de l'injector i el detector van ser de 220 i 280°C respectivament. Per la separació òptima dels compostos s'utilitzà un forn amb la

següent rampa de temperatures: temperatura inicial 40°C durant 5 minuts, a raó de 3°C/minut fins a 200°C i durant 20 minuts a 200°C. El temps total de la determinació va ser de 80 minuts.

La quantificació dels compostos es realitzà per comparació amb una solució patró de referència de tots els compostos. La concentració de cada compost observat es va calcular mitjançant l'expressió matemàtica:

$$C_M \text{ (mg/l)} = C_i (R_M / R_R)$$

on C_M és la concentració del compost objecte d'estudi, C_i correspon a la concentració del compost objecte d'estudi en la solució de referència, R_R es tracta de la relació entre les àrees de cada compost i l'àrea del patró intern, a partir de les dades del cromatograma obtingut amb la solució de referència, R_M és la relació entre les àrees de cada compost i l'àrea del patró intern, a partir de les dades del cromatograma obtingut amb la mostra de vi.

6.2.7. QUANTIFICACIÓ DELS ESTERS

Els esters, acetat d'isoamil, caproat d'etil, caprilat d'etil, decanoat d'etil, succinat de dietil i ministrat d'etil, junt amb el 2-fenil-etanol, es determinaren per cromatografia de gasos d'acord amb el mètode descrit per (Bertrand, 1981). S'utilitzà com a patró intern el 3-octanol. Tots ells van ser subministrats per la casa comercial Fluka Química (Madrid, Espanya). Per la confecció del patró de referència es va preparar una solució hidroalcohòlica al 12% d'etanol a la que s'hi havia afegit 2000 ppm de cada compost, 3,5 g/l d'àcid tartàric i s'ajustava a pH= 3,5. El patró intern es realitzà a base d'una solució hidroalcohòlica al 12% d'etanol a la que s'hi havia afegit 3,5 g/l d'àcid tartàric, 400 mg/l de 3-octanol i s'ajustava a pH= 3,5.

L'anàlisi dels compostos esmentats es va dur a terme mitjançant un cromatograf de gasos HP 5890 series II, acoplat a un detector de masses HP 5972 series. Per la separació dels compostos s'utilitzà una columna capilar CPwax 57CB (50 m x 0,25 mm d.i., 0.2 µm) subministrada per la casa Chrompak, i com a gas portador es va emprar Heli d'alta puresa (pressió de columna 177 kPa). La injecció es realitzà mitjançant el mètode "splitless" amb una divisió de fluxe de 60 ml/min. La temperatura de l'injector i el detector van ser de 220 i 280°C respectivament. Per la separació òptima dels compostos s'utilitzà un forn amb la següent rampa de temperatures: temperatura inicial de 50°C, a raó de 10°C/minut fins a 80°C, a raó de 2°C fins a 220°C. El temps total de la determinació va ser de 73 minuts.

Abans de l'anàlisi cromatogràfica, els compostos van ser sotmesos a una extracció líquid-líquid mitjançant eter:hexà (1:1). Per realitzar l'esmentada extracció es va partir de 50

ml de mostra, extraient amb 4, 2 i 2 ml d'eter-hexà. El patró intern (3-octanol), es va afegir abans de realitzar l'esmentat procés d'extracció. Finalment 0,2 µl de l'extracte va ser injejat en el sistema cromatogràfic.

La quantificació dels compostos es realitzà per comparació amb una solució patró de referència de tots els compostos. La concentració de cada compost observat es va calcular mitjançant l'expressió matemàtica:

$$C_M(\text{mg/l}) = C_i (R_M / R_R)$$

on C_M és la concentració del compost objecte d'estudi, C_i correspon a la concentració del compost objecte d'estudi en la solució de referència, R_R es tracta de la relació entre les àrees de cada compost i l'àrea del patró intern, a partir de les dades del cromatograma obtingut amb la solució de referència, R_M és la relació entre les àrees de cada compost i l'àrea del patró intern, a partir de les dades del cromatograma obtingut amb la mostra de vi.

6.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

a. Efecte del coure

Els resultats referents a l'efecte de la presència de coure sobre els compostos majoritaris dels vins es presenten a la Taula 6.4.1. Respecte al grau alcohòlic, es pot comprovar que la presència de coure provoca la seva disminució, si bé únicament és estadísticament significativa quan la concentració de coure era de 50 ppm. En quant al glicerol, els resultats ens indiquen que a 1 ppm, la seva concentració és significativament més baixa, tot i que aquest efecte no es determina ni a 5 ni a 50 ppm. La relació glicerol/etanol segueix un comportament gaire bé paral·lel a l'observat pel grau alcohòlic, observant-se augments significatius a 5 i 50 ppm de coure.

No es van trobar diferències significatives en els nivells de glucosa, si bé les concentracions de fructosa eren significativament més baixes en presència de coure. L'àcid succínic presenta una tendència a disminuir a mesura que les concentracions de coure augmenten, encara que no existeixin diferències significatives. Els nivells d'àcid acètic van ser significativament més alts a 50 ppm respecte del vi control. L'àcid L-làctic, per sota dels nivells de detecció en el vi control i el vi de 1 ppm de coure, si que va ésser detectat a 5 i 50 ppm, tot i que a concentracions molt baixes. No es van observar diferències significatives en l'acidesa total ni en els nivells d'àcid D-làctic. Els nivells d'ió amoni presenten una tendència a augmentar a mesura que s'incrementa la concentració de coure en el medi, si bé tan sols és significativa aquesta tendència a 50 ppm de coure. Aquest augment significatiu dels nivells d'amoní a 50 ppm podrien estar relacionats amb la més alta taxa de mortalitat de les cèl·lules

de llevat al final de la fermentació, fet que estaria correlacionat amb l'autòlisi gradual dels mateixos (Hough i col., 1970; Arnold, 1981; Charpentier i col., 1986).

La influència del coure sobre la producció d'alcohols superiors es presenta en la Taula 6.4.2. El conjunt de resultats ens indica que existeix una tendència generalitzada a augmentar els nivells de gairebé tots els alcohols superiors en presència de coure, sobretot de l'acetaldehid (Pons i col., 1991). Si analitzem el sumatori d'alcohols superiors podem comprovar que existeixen diferències significatives a totes les concentracions de coure estudiades respecte del vi control.

La influència del coure sobre la producció d'esters es presenta en la Taula 6.4.3. En ella es pot constatar que els nivells de acetat d'isoamil, de caprilat d'etil i de decanoat d'etil disminueixen significativament a mesura que la concentració de coure en el medi augmenta. En el cas del succinat d'etil, el comportament és invers, observant-se augments significatius. No es van trobar diferències estadístiques a nivell del caproat d'etil ni del ministrat d'etil, si bé aquest últim no es va detectar a 1 ppm de coure. Cal assenyalar que el succinat de dietil és olfactivament neutre, mentre que acetat d'isoamil, caprilat d'etil i decanoat d'etil són aromes força interessants pel perfil sensorial del vi (Vegeu l'apartat 4 de la Introducció).

b. Efecte de la diclofluanida

Els resultats referents a l'efecte de la presència de diclofluanida sobre els compostos majoritaris dels vins es presenten a la Taula 6.4.4. Aquest resultats indiquen que la presència de diclofluanida en el most provoca un augmen del grau alcohòlic significatiu a totes les concentracions de diclofluanida, i una tendència a la disminució dels nivells de glicerol, tot i que únicament és significativa a 3 ppm. Si analitzem la relació glicerol/etanol, el comportament observat indica que aquesta relació disminueix de forma significativa a 3 i 5 ppm (Dominguez i col., 1995).

Els nivells de sucres fermentables residuals, glucosa i fructosa, són significativament més alts a mesura que les concentracions de diclofluanida augmenten, indicant que veritablement la presència d'aquest pesticida dificulta l'acabament de la fermentació (Dominguez i col., 1995). Els nivells d'àcid succínic tendeixen a disminuir per la presència de diclofluanida, si bé no s'observen diferències significatives (Dominguez i col., 1995). L'àcid D-làctic sembla augmentar significativament, tot i que les concentracions presents són en tot moment poc importants sota el punt de vista sensorial (Dominguez i col., 1995). L'àcid L-làctic, absent en el vi control, apareix en els vins tractats però a concentracions clarament baixes. L'àcid acètic presenta una tendència a disminuir la seva concentració, però mantenint-se sempre a nivells comparables. L'acidesa total presenta nivells molt semblants a 1 i 3 ppm de diclofluanida, apareixent una disminució significativa a 5 ppm. La concentració d'ió

amoni, de la mateixa manera que observavem en el cas del coure, augmenta significativament a altes dosis del pesticida, indicant probablement que la mortalitat més alta dels llevats en aquestes condicions implica una autolisi elevada (Hough i col., 1970; Arnold, 1981; Charpentier i col., 1986).

La influència de la diclofluanida sobre els nivells d'alcohols superiors es presenta en la Taula 6.4.5. En ella es pot constatar que 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 2-fenil-etanol i 1,2-propanodiol augmenten a mesura que la concentració de diclofluanida és més gran, mentre que els dos isomers del 2,3-butanodiol disminueixen significativament. Donada la importància quantitativa d'aquesta substància, si analitzem el sumatori d'aquests compostos comprovarem que la tendència global és la d'una disminució.

L'efecte de la diclofluanida sobre els nivells d'esters es presenta a la Taula 6.4.6. Aquests resultats ens indiquen que els nivells d'acetat d'etil, d'acetat d'isoamil, de succinat de dietil i de minirrat d'etil són significativament més alts a mesura que la concentració de diclofluanida en el medi augmenta, mentre que els nivells de caproat d'etil, de caprilat d'etil i dedecanoat d'etil disminueixen significativament (Ruíz, 1995).

6.4. TAULES

TAULA 6.4.1. Influència del coure sobre els principals paràmetres analítics del vi. Les concentracions estan expressades en g/l. Els resultats es donen com la mitjana aritmètica ± error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al vi control.

	COURE			
	CONTROL	1 ppm	5 ppm	50 ppm
Grau alcohòlic probable	13,07 ± 0,08	12,98 ± 0,24	12,75 ± 0,21	12,69 ± 0,15*
Glicerol	6,84 ± 0,122	6,21 ± 0,103*	6,49 ± 0,275	7,43 ± 0,393
Glicerol/Grau alcohòlic	0,067 ± 0,001	0,06 ± 0,003	0,064 ± 0,001*	0,074 ± 0,004*
Glucosa	0,177 ± ,017	0,180 ± ,012	0,190 ± 0,015	0,193 ± 0,022
Fructosa	1,393 ± 0,003	1,123 ± 0,064*	0,943 ± 0,069*	0,683 ± 0,075*
Àcid succínic	1,203 ± 0,115	1,120 ± 0,130	1,012 ± 0,057	0,956 ± 0,140
Àcid D-làctic	0,182 ± 0,009	0,177 ± 0,008	0,171 ± 0,006	0,1633 ± 0,01
Àcid L-làctic	-	-	0,071 ± 0,018*	0,115 ± 0,047*
ió amoni (mg/l)	3,253 ± 0,08	4,217 ± 0,615	4,03 ± 0,64	6,45 ± 1,021*
Àcid acètic	0,473 ± 0,007	0,463 ± 0,023	0,460 ± 0,023	0,523 ± 0,023*
Acidesa total	8,238 ± 0,065	7,975 ± 0,238	7,925 ± 0,282	8,325 ± 0,418

TAULA 6.4.2. Influència del coure sobre el contingut d'alcohols superiors del vi. Les concentracions estan expressades en mg/l. Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al vi control.

	COURE			
	CONTROL	1 ppm	5 ppm	50 ppm
Acetaldehid	48,44 \pm 5,12	99,35 \pm 17,86*	114,4 \pm 11,42*	103,78 \pm 7,66*
1-propanol	61,7 \pm 7,25	90,02 \pm 8,44*	120,85 \pm 22,06*	134,85 \pm 4,41*
2-metil 1-propanol	44,2 \pm 5,05	57,51 \pm 5,62*	61,23 \pm 7,37*	96,8 \pm 6,37*
2-metil 1-butanol	18,73 \pm 1,53	20,83 \pm 1,22	20 \pm 2,39	24,05 \pm 1,18*
3-metil 1-butanol	111,39 \pm 9,74	117,25 \pm 2,78	117,79 \pm 10,25	129,2 \pm 8,04
2,3-butanodiol D(-)	1114,98 \pm 78,46	1423,8 \pm 112,8*	1419,6 \pm 100,1*	1932,9 \pm 118,1*
2,3-butanodiol (meso)	254,41 \pm 18,39	314,71 \pm 23,36*	303,19 \pm 20,79*	479,01 \pm 37,97*
2-fenil etanol	7,973 \pm 1,882	6,55 \pm 1,22	11,94 \pm 0,554*	11,89 \pm 1,032*
1,2 propanodiol	68,01 \pm 4,8	86,29 \pm 6,06*	87,04 \pm 3,86*	113,93 \pm 10,11*
Σ Alcohols superiors	1729,8 \pm 40,17	2216,3 \pm 155,4*	2256,1 \pm 165,1*	3026,4 \pm 194,9*

TAULA 6.4.3 Influència del coure sobre el contingut d'esters del vi. Les concentracions estan expressades en mg/l. Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al vi control.

	COURE			
	CONTROL	1 ppm	5 ppm	50 ppm
Acetat d'etil	26,29 \pm 2,03	34,17 \pm 3,65*	32,92 \pm 2,26*	42,8 \pm 3,28*
Acetat d'isoamil	0,83 \pm 0,037	0,765 \pm 0,095	0,767 \pm 0,096	0,553 \pm 0,068*
Caproat d'etil	1,18 \pm 0,111	1,023 \pm 0,312	1,063 \pm 0,228	0,965 \pm 0,155
Caprilat d'etil	0,827 \pm 0,093	0,723 \pm 0,179	0,66 \pm 0,15	0,39 \pm 0,029*
Decanoat d'etil	0,17 \pm 0,024	0,13 \pm 0,041*	0,107 \pm 0,023*	-
Succinat de dietil	0,678 \pm 0,115	1,175 \pm 0,065*	2,115 \pm 0,325*	2 \pm 0,5*
Ministrat d'etil	0,11 \pm 0,32	-	0,115 \pm 0,015	0,11 \pm 0,1
Σ Esters	3,795 \pm 0,294	3,816 \pm 0,498	4,827 \pm 0,394*	4,18 \pm 0,416

TAULA 6.4.4. Influència de la diclofluanida sobre els principals paràmetres analítics del vi. Les concentracions estan expressades en g/l. Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al vi control.

	DICLOFLUANIDA			
	CONTROL	1 ppm	3 ppm	5 ppm
Grau alcohòlic probable	13,07 \pm 0,08	13,23 \pm 0,05*	13,29 \pm 0,1*	13,35 \pm 0,14*
Glicerol	6,84 \pm 0,122	6,92 \pm 0,059	6,23 \pm 0,279*	6,41 \pm 0,242
Glicerol/Grau alcohòlic	0,067 \pm 0,001	0,066 \pm 0,001	0,059 \pm 0,003*	0,061 \pm 0,002*
Glucosa	0,177 \pm ,017	0,230 \pm 0,019*	0,255 \pm 0,015*	0,240 \pm 0,010*
Fructosa	1,393 \pm 0,003	1,290 \pm 0,076*	1,595 \pm 0,085*	1,875 \pm 0,105*
Àcid succínic	1,203 \pm 0,157	0,980 \pm 0,168	0,875 \pm 0,195	0,863 \pm 0,176
Àcid D-làctic	0,1824 \pm 0,086	0,22 \pm 0,027*	0,216 \pm 0,084*	0,1997 \pm 0,023*
Àcid L-làctic	-	0,056 \pm 0,034*	0,068 \pm 0,007*	0,053 \pm 0,006*
ió amoni (mg/l)	3,253 \pm 0,08	3,837 \pm 0,373	4,407 \pm 0,284*	4,027 \pm 0,442*
Àcid acètic	0,473 \pm 0,007	0,433 \pm 0,015*	0,397 \pm 0,018*	0,403 \pm 0,012*
Acidesa total	8,238 \pm 0,065	8,172 \pm 0,23	8,383 \pm 0,247	7,95 \pm 0,087*

TAULA 6.4.5. Influència de la diclofluanida sobre el contingut d'alcohols superiors del vi. Les concentracions estan expressades en mg/l. Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al vi control.

	DICLOFLUANIDA			
	CONTROL	1 ppm	3 ppm	5 ppm
Acetaldehid	48,44 \pm 5,12	77,8 \pm 13,93*	132,08 \pm 11,92*	115,31 \pm 10,58*
1-propanol	61,7 \pm 7,25	82,1 \pm 8,44*	106,45 \pm 8,34*	98,043 \pm 10,17*
2-metil 1-propanol	44,2 \pm 5,05	62,82 \pm 1,55*	64,4 \pm 5,81*	67,8 \pm 6,58*
2-metil 1-butanol	18,73 \pm 1,53	24,62 \pm 3,95*	29,19 \pm 1,96*	29 \pm 2,72*
3-metil 1-butanol	111,39 \pm 9,74	112,01 \pm 10	119,45 \pm 9,44	99,27 \pm 10,64
2,3-butanodiol D(-)	1114,98 \pm 78,46	993,11 \pm 146,1	938,26 \pm 115	728,1 \pm 151,36*
2,3-butanodiol (meso)	254,41 \pm 18,39	247,1 \pm 26,11	221,84 \pm 28,5	174,4 \pm 34,8*
2-fenil etanol	7,973 \pm 1,882	12,19 \pm 0,587*	15,64 \pm 0,96*	11,39 \pm 0,277*
1,2 propanodiol	68,01 \pm 4,8	73,75 \pm 10,21	76,58 \pm 13,72	75,16 \pm 11,22*
Σ Alcohols superiors	1729,8 \pm 40,17	1685,5 \pm 184,9	1703,9 \pm 144,1	1398,5 \pm 127,1*

TAULA 6.4.6. Influència de la diclofluanida sobre el contingut d'esters del vi. Les concentracions estan expressades en mg/l. Els resultats es donen com la mitjana aritmètica \pm error tipus de 5 rèpliques. * indica l'existència de diferències significatives ($p < 0,05$) respecte al vi control.

	DICLOFLUANIDA			
	CONTROL	1 ppm	3 ppm	5 ppm
Acetat d'etil	$26,29 \pm 2,03$	$43,82 \pm 3,84^*$	$43,05 \pm 2,8^*$	$37,57 \pm 6,53^*$
Acetat d'isoamil	$0,83 \pm 0,037$	$0,83 \pm 0,11$	$1,025 \pm 0,005^*$	$1,02 \pm 0,017^*$
Caproat d'etil	$1,18 \pm 0,111$	$1,183 \pm 0,225$	$0,69 \pm 0,1^*$	$0,9 \pm 0,072^*$
Caprilat d'etil	$0,827 \pm 0,093$	$0,577 \pm 0,098^*$	$0,585 \pm 0,085^*$	$0,447 \pm 0,055^*$
Decanoat d'etil	$0,17 \pm 0,024$	$0,08 \pm 0,006^*$	$0,115 \pm 0,035^*$	$0,123 \pm 0,007^*$
Succinat de dietil	$0,678 \pm 0,115$	$1,973 \pm 0,124^*$	$1,29 \pm 0,1^*$	$1,317 \pm 0,05^*$
Ministrat d'etil	$0,11 \pm 0,32$	$0,165 \pm 0,005^*$	$0,15 \pm 0,005^*$	$0,153 \pm 0,009^*$
Σ Esters	$3,795 \pm 0,294$	$4,808 \pm 0,321^*$	$3,855 \pm 0,274$	$3,96 \pm 0,36$

6.5. CONCLUSIONS

1. La presència de coure en el most dóna lloc a una disminució del grau alcohòlic, sense que augmentin els nivells de glicerol ni d'àcid succínic. Simultàniament hi ha un augment dels alcohols superiors i una disminució dels esters més significatius a nivell de l'aroma del vi. Aquest fet ens indica que la presència d'aquest pesticida inorgànic, sobretot a altes concentracions, provoca una certa desviació del fluxe metabòlic dels sucres disminuint la formació d'etanol i d'esters aromàtics, i afavorint la formació d'alcohols superiors. Podem doncs concloure que els vins obtinguts presentaran una més baixa intensitat de aromes afruitats (disminució dels esters) i un augment de la component acre de l'aroma (augment dels alcohols superiors).

2. La presència de diclofluanida en el most provoca un augment del grau alcohòlic i una disminució d'alguns subproductes importants per a la qualitat del vi, com són el glicerol i alguns esters força aromàtics. Per tant els vins obtinguts seran més plans (disminució de la relació glicerol/etanol) i menys aromàtics (disminució dels nivells de caproat d'etil, de caprilat d'etil i dedecanoat d'etil).

6.6. BIBLIOGRAFIA

Arnold, W.N. (1981). Autolysis. En *Yeast Cell Envelopes. Biochemistry, Biophysics and Ultrastructure*. Volum 2, ed. W.N. Arnold, pp 129-137. Boca Raton: CRC Press.

Bertrand, A. (1981). Formation des substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualité du vin. *Colloque Soc. Fr. Microbiologie. Reims*. pp. 251-267.

Bertrand, A., de Revel, G. i Lagargiola, M.C. (1989). Some aspects of malolactic fermentation in wines. En *Alko's colloquium on Enology, Helsinki, Finland*.

Cuenat, P., Zufferey, E. i Kobel, D. (1990). La prévention des odeurs sulphydriques des vins par la centrifugation après la fermentation alcoolique. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 22, 5, 299-303.

Charpentier, C., Nguyen van Long, T., Bonaly, R. i Feuillat, M. (1986). Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 405-413.

Dominguez, J.; Hernáez, J.L.; Otero, D.; Pastrana, L.; i Pazos, Y. (1995). Los residuos antibióticos en las fermentaciones vinicas. Incidencias en la calidad del vino. *Viticultura y Enologia*. 111-123.

Dumolin, E.D., Azais, B.P. i Guerain, J.T. (1987). Determination of sugar and ethanol content in aqueous products of molasses distilleries by near infrared spectrophotometry. *J. Food Sci.*, 52, 626-630.

European Community. (1990). Council Regulation N° 2676/90 determining the Community analysis methods applicable in the wine sector. *Off. J. Eur. Comm.* L272, 1-192, October 3.

Freydier, M., Cugier, J.P., de Cormis, L. i Foulonneau, C. (1989). Influences oenologiques éventuelles des traitements phytosanitaires et conséquences sur l'emploi des pesticides. *Progrès Agricole et Viticole*, 106, 11, 260-265.

Glories, Y. (1988). Les goûts de réduit. Seminario su: Odori e sapori dei vini. *Rassegna Economica della Provincia di Alessandria*, 3. Supplemento 4, 32-34.

Hough, J.S. i Maddox, I.S. (1970). Yeast autolysis. *Proc. Biochem.*, 210, 50-53.

Maujean, A. (1989). Goûts anormaux dans les moûts et les vins en relation avec la présence de produits soufrés volatils. 4ème Symposium International des Métiers de la Vigne et du Vin: odeurs et goûts anormaux des Vins (non liés aux maladies microbiennes classiques), Forum oenologie, Macon, 25-26 Avril.

Otero, D., Mañas, J.L. i Dominguez, J. (1993). Efecto de residuos antibióticos sobre poblaciones levaduriformes. Su incidencia en la calidad del vino (1). *Vitivinicultura*, 5-6, 35-39.

Pons, M.N. i Chanel, S. (1991). Effect of heavy metals on volatiles production in alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Fermen. Bioeng.*, 72, 1, 61-63.

Ruiz Hernandez, M. (1995). Incidencias negativas en el aroma de los vinos en la actualidad. En Aroma de los Einos de Calidad, X Cursos Rioja' 95. Haro, La Rioja.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010



Conclusions

1. El tractament de la vinya amb els productes fitosanitaris estudiats sense respectar els períodes de seguretat, comporta la presència d'elevades concentracions de tots els pesticides en els mostos procedents d'aquestes vinyes.
2. De tots els plaguicides estudiats, tan sols la diclofluanida i el coure presenten un efecte inhibidor de la cinètica fermentativa.
3. La presència de coure a concentracions iguals o superiors a 50 ppm comporta una disminució de l'activitat alcohol deshidrogenasa i sobretot de la H^+ -ATPasa. La diclofluanida únicament provoca una inhibició de la H^+ -ATPasa.
4. El sistema de transport de sucres està inhibit per l'etanol, l'anhídrid sulfurós i per les altes concentracions de sucres del medi.
5. La presència d'elevades concentracions de coure i de diclofluanida inhibeixen el sistema de transport de sucres.
6. Del conjunt de mecanismes estudiats, sembla ser, que els més afectats per la presència de coure i diclofluanida són la activitat H^+ -ATPasa i la captació de sucres. Llavors podem concloure que l'alteració d'aquest dos sistemes pot justificar els alentiments de la cinètica fermentativa constatats previament. D'una banda, la inhibició de la H^+ -ATPasa al començament de la fermentació provocarà una disminució del transport actiu de nutrients que dificultarà la multiplicació dels llevats i d'altra banda, la inhibició del transport de sucres es traduirà evidentment, en una disminució del flux metabòlic.
7. Tant la presència de coure com la de diclofluanida alteren significativament la composició química del vi afectant, com a conseqüència, el seu perfil sensorial.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEL COURE I LA DICLOFLUANIDA SOBRE LA CINÈTICA FERMENTATIVA I EL METABOLISME
DE SACHAAAROMICES CEREVISIAE
Maria Francesca Fort Marsal
ISBN:978-84-693-6283-9/DL:T-1605-2010

