UNIVERSITAT DE BARCELONA

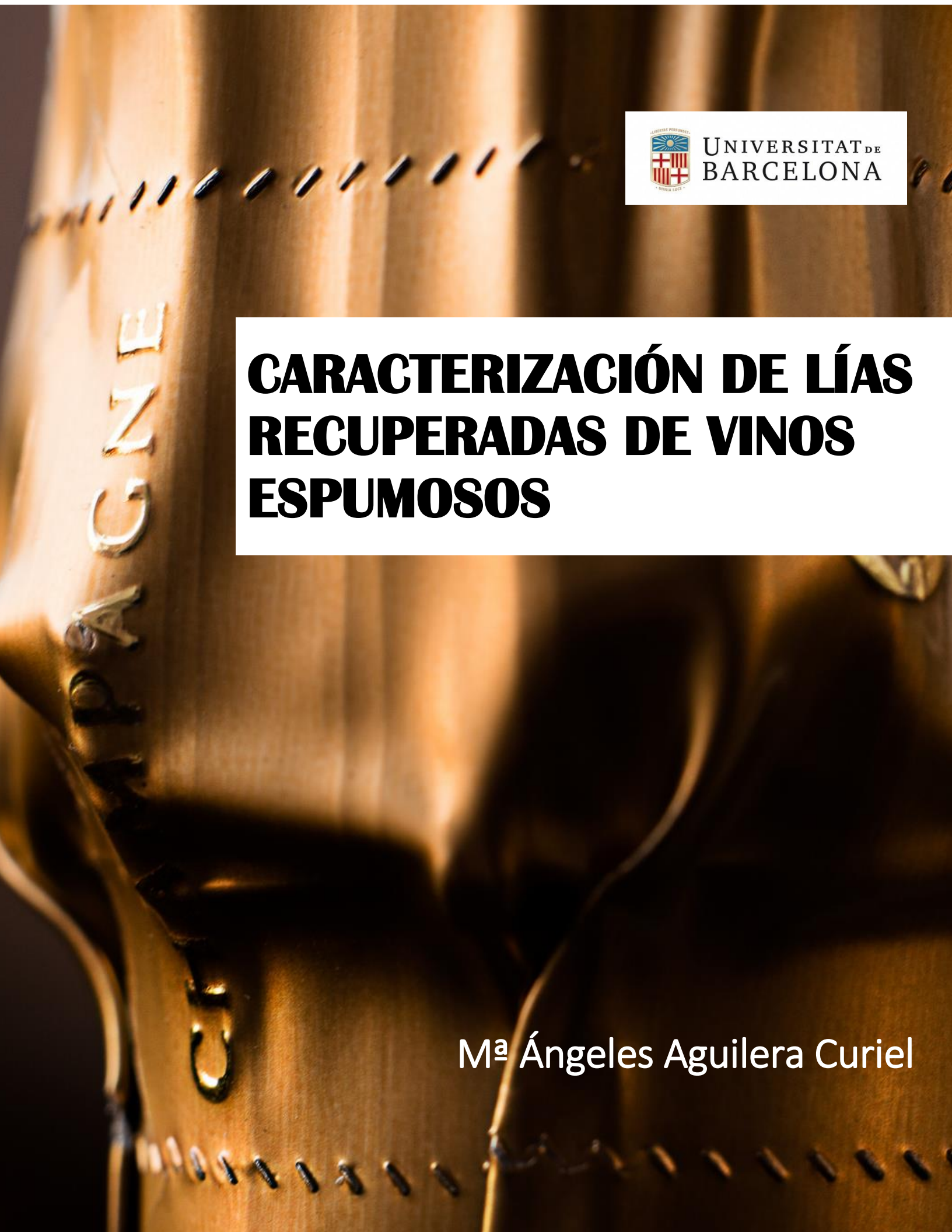
Caracterización de lías recuperadas de vinos espumosos

Mª Ángeles Aguilera Curiel

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (**www.tdx.cat**) i a través del Dipòsit Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (**www.tdx.cat**) y a través del Repositorio Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service and by the UB Digital Repository (**diposit.ub.edu**) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

CARACTERIZACIÓN DE LÍAS RECUPERADAS DE VINOS ESPUMOSOS

Mª Ángeles Aguilera Curiel

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Caracterización de lías recuperadas de vinos espumosos

Mª Ángeles Aguilera Curiel

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

CARACTERIZACIÓN DE LÍAS RECUPERADAS DE VINOS ESPUMOSOS

Mª ÁNGELES AGUILERA CURIEL

2016

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO

ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN

2011– 2016

CARACTERIZACIÓN DE LÍAS RECUPERADAS DE VINOS ESPUMOSOS

Memoria presentada por Mª Ángeles Aguilera Curiel para optar al título de doctora por la Universidad de Barcelona

Dra. Elvira López Tamames

(Directora/tutora)

Dra. Montserrat Riu Aumatell

(Directora)

Mª Ángeles Aguilera Curiel

2016

Este trabajo se ha realizado gracias a:

La Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICyT) del Ministerio de Educación y Ciencia a través de los proyectos: AGL2008-03392 y AGL2011-23872, y la beca predoctoral de formación de personal investigador: BES-2009-027531.

La Generalitat de Catalunya mediante ACC1Ó i la ayuda para grupos de investigación consolidados:

- EVALXARTA2010 (EX12)
- 2009 SGR 606
- 2014 SGR 01438

Bodegas del grupo Freixenet S.A.

Agradecimientos

Muchas han sido las personas que me han ayudado, motivado y hecho más fácil el camino durante todo este tiempo. En primer lugar, me gustaría agradecer a Elvira la oportunidad de realizar la tesis doctoral en el grupo de Vinos y Aromas y ser mi directora de tesis, y a Montse por ser la codirectora. A Susana, por su asesoramiento y tutorización en el trabajo final de grado de química, un trocito de esta tesis doctoral.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a mis compañeros de grupo: Paula, Arnau, Ana María y Rebeca, porque, aunque cada uno ya haya tomado su camino, conservo un recuerdo muy bueno de nuestras aventuras y desventuras en el laboratorio. A los compañeros del grupo de Antioxidantes: Anna V., Naiara, Míriam, Palmi, Anna T., Paola, Jose y Álex, por sus charlas siempre interesantes sobre polifenoles y por dejarme el espectrofotómetro las mil y una veces que lo he necesitado. A los compañeros del grupo de Metabolómica: Montse, Rosa, María R., Mar y María B., por su buen humor contra viento y marea. También quiero dar las gracias a los compañeros del grupo de Aminas: Natalia, Joan y Mariluz, siempre prestos a compartir conocimientos.

Fuera del laboratorio, quiero agradecer a Nuri y Ester sus siempre bienvenidas palabras de ánimo y los momentos dicharacheros que hemos pasado junto al resto del elenco de las damiselas. A mis excompañeros de piso y amigos: Paloma, por su simpatía y naturalidad, e Ivaylo, por darme ánimos durante los últimos meses de escritura de esta tesis al más puro estilo de la milicia búlgara. Tampoco me olvido de los santcelonins Miquel, compañero inseparable de Givaudan, que me ha enseñado a beber cerveza como Dios manda, y Amalia, con la que he compartido tantas tardes de running y confidencias.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres, mis hermanas y mi pequeño sobrino Mateo, con los que siempre puedo contar y los que siempre llevo en mi corazón.

A mi familia.

Por fin, un martes de diciembre, a la hora del almuerzo, soltó de un golpe toda la carga de su tormento. Los niños habían de recordar por el resto de su vida la augusta solemnidad con que su padre se sentó a la cabecera de la mesa, temblando de fiebre, devastado por la prolongada vigilia y por el encono de su imaginación, y les reveló su descubrimiento.

-La tierra es redonda como una naranja.

-Gabriel García Márquez, "Cien años de soledad".-

Índice

1. Interés y objetivos 1

2. Antecedentes bibliográficos 5

2.1 Vinos espumosos naturales 5

2.1.1 Elaboración de vinos espumosos 5

2.1.2 Propiedades antioxidantes de los vinos espumosos 18

2.2 Levaduras y lías 26

2.2.1 Citología de *Saccharomyces cerevisiae* 27

2.2.2 Autolisis y envejecimiento *sur lie* 35

2.2.3 Las lías como subproducto 48

2.2.4 Las lías como agente antioxidante 53

3. Material y métodos 57

3.1 Vinos espumosos 57

3.1.1 Diseño experimental y muestreo 57

3.1.2 Técnicas analíticas aplicadas 59

3.2 Lías 63

3.2.1 Tipos de muestras 63

3.2.2 Tratamientos para la obtención de fracciones 64

3.2.3 Técnicas de microbiología aplicadas 67

3.2.4 Técnicas analíticas aplicadas 69

4. Resultados y discusión 79

4.1 Composición y actividad antioxidante de vinos espumosos 79

4.1.1 Parámetros enológicos generales 80

4.1.2 Evolución del contenido en fenoles 82

4.1.3 Evolución del sulfito libre y total 86

4.1.4 Evolución de la actividad antioxidante 90

4.1.5 Conclusiones del capítulo 94
4.2 Caracterización morfológica y poblacional 95
4.2.1 Visualización por microscopía óptica confocal 95
4.2.2 Caracterización de las lías por citometría de flujo 97
4.2.3 Conclusiones del capítulo 115
4.3 Composición y actividad antioxidante de las lías 117
4.3.1 Determinaciones básicas 117
4.3.2 Contenido en fenoles 118
4.3.3 Contenido en polisacáridos, proteínas y tioles 121
4.3.4 Actividad antioxidante de las diferentes fracciones 124
4.3.5 Conclusiones del capítulo 130
4.4 Caracterización de la pared celular 130
4.4.1 Composición y actividad antioxidante inicial de las paredes 130
4.4.2 Fraccionamiento completo de la pared 132
4.4.3 Obtención de manoproteínas en un solo paso 141
4.4.4 Conclusiones del capítulo 146

5. Discusión general 149

6. Conclusiones 153

Referencias 155

Anexos 173
Anexo I. Resultados analíticos 175
Anexo II. Cromatogramas 205
Anexo III. Imágenes de microscopía 209
Anexo IV. Publicaciones y presentaciones en congresos 215

Índice de figuras

Figura 2-1. Elaboración de vino espumoso mediante el método tradicional..... 14

Figura 2-2. Elaboración de vino espumoso mediante el método Charmat. 17

Figura 2-3. Estructura química del fenilpropanoide y estructura básica de los flavonoides. 21

Figura 2-4. Ácidos hidroxinámicos y sus derivados (hidroxicinamatos) más habituales en vinos espumosos. 22

Figura 2-5. Otros fenoles habituales en vinos espumosos. 23

Figura 2-6. Representación esquemática de la levadura *S. cerevisiae* y de su compartimentalización subcelular..... 29

Figura 2-7. Representación de la superficie celular y sus componentes..... 34

Figura 2-8. Imágenes de microscopía electrónica de baja temperatura de las células de levadura que han estado en envejecimiento sur lie durante 12 meses..... 39

Figura 2-9. Ampliaciones de secciones ultrafinas de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* recolectadas a 1 mes (a), 9 meses (b), 13 meses (c), 18 meses (d), 30 meses (e), y 48 meses (f) de envejecimiento..... 41

Figura 2-10. Secciones ultrafinas de *Saccharomyces cerevisiae* mostrando diferentes estadios de autolisis después de 9 meses (a-d) y 48 meses (e-h)..... 42

Figura 2-11. Diagrama de elaboración de vinos blancos y tintos donde se indican los puntos en los que se eliminan lías 50

Figura 2-12. Imagen donde se muestran lías de vino tinto de las variedades morada (A), Cabernet sauvignon (B), Cabernet franc (C) y de vino blanco de la variedad Lorena (D) 50

Figura 3-1. Esquema del muestreo aplicado a los vinos espumosos. 58

Figura 3-2. Reacción yodométrica de Ripper. 60

Figura 3-3. Reacción que tiene lugar al aplicar el método FRAP. 62

Figura 3-4. Reacción que tiene lugar al aplicar el método DPPH. 63

Figura 3-5. Proceso de disrupción celular. 65

Figura 3-6. Proceso de fraccionamiento de las paredes celulares 66

Figuras 4-1. Valores promedio y desviaciones estándar de los contenidos en sulfito total de los vinos espumosos en envejecimiento en lías 88

Figuras 4-2. Valores promedio y desviaciones estándar del contenido en sulfito total de los vinos espumosos comerciales (sin lías) 89

Figura 4-3. Imágenes representativas de microscopía óptica confocal de las lías de primera fermentación. 96

Figura 4-4. Imágenes representativas de microscopía óptica confocal de las lías de segunda fermentación. 96

Figura 4-5. Imágenes representativas de microscopía óptica confocal de las lías de segunda fermentación del Charmat. 97

Figura 4-6. Imágenes representativas de microscopía óptica confocal de las muestras de Levaduras Secas Inactivas (LSI). 97

Figura 4-7. Histograma representativo de la distribución de suspensión de lías brutas en vino modelo. 99

Figura 4-8. Histograma representativo de la distribución de partículas de la suspensión de lías netas en vino modelo. 99

Figura 4-9. Histograma representativo de distribución de partículas de la suspensión de lías rotas en vino modelo. 100

Figura 4-10. Histograma representativo de distribución de partículas en la suspensión de paredes de levaduras en vino modelo. 100

Figura 4-11. Histograma representativo de la distribución de partículas en el citoplasma. 101

Figura 4-12. Ratio de rotura según tiempo de disrupción en molino de bolas de las diferentes concentraciones de lías..... 102

Figura 4-13. Diámetro promedio de rotura según tiempo de disrupción en molino de bolas de las diferentes concentraciones de lías. 103

Figura 4-14. Citogramas biparamétricos de las señales de dispersión de las muestras antes de la disrupción; (A) lías de primera fermentación del cava; (B) lías de segunda fermentación del cava, (C) lías de segunda fermentación del Charmat, y (D) Levaduras secas inactivas LSI. . 106

Figura 4-15. Citograma biparamétrico de las señales de dispersión de las muestras después de la disrupción; (A) lías de primera fermentación del cava; (B) lías de segunda fermentación del cava, (C) lías de segunda fermentación del Charmat, y (D) Levaduras secas inactivas (LSI) 107

Figura 4-16. Histogramas de las señales de dispersión frontal (log FS vs. número de partículas) de las muestras antes (área roja) y después de la disrupción (área azul); (A) lías de primera fermentación del cava; (B) lías de segunda fermentación del cava, (C) lías de segunda fermentación del Charmat, y (D) Levaduras secas inactivas (LSI). 108

Figura 4-17. Histogramas de las señales de dispersión lateral (log SS vs. número de partículas) de las muestras antes (área roja) y después de la disrupción (área azul); (A) lías de primera fermentación del cava; (B) lías de segunda fermentación del cava, (C) lías de segunda fermentación del Charmat, y (D) Levaduras secas inactivas (LSI). 109

Figura 4-18. Citogramas biparamétricos de las señales de fluorescencia verde (FL1; SYTO13) frente a fluorescencia roja (FL3; yoduro de propidio) de las muestras antes de la disrupción en las zonas donde se realizó el “gattering”; (A) lías de primera fermentación del cava; (B) lías de segunda fermentación del cava, (C) lías de segunda fermentación del Charmat, y (D) Levaduras Secas Inactivas (LSI). 114

Figura 4-19. Citogramas biparamétricos de las señales de fluorescencia verde (FL1; SYTO13) frente a fluorescencia roja (FL3; yoduro de propidio) de las muestras después de la disrupción en las zonas donde se realizó el “gattering”; (A) lías de primera fermentación del cava; (B) lías de segunda fermentación del cava, (C) lías de segunda fermentación del Charmat, y (D) Levaduras Secas Inactivas (LSI). 115

Figura 4-20. Imagen de lías de primera fermentación del cava (A), de segunda fermentación del cava (B), y de segunda fermentación del Charmat (C). 118

Figura 4-21. Actividad antioxidante de las muestras de lías y LSI y sus fracciones medidas por el método Folin-Ciocalteau. 125

Figura 4-22. Actividad antioxidante de las muestras de lías y LSI y sus fracciones medidas por el método FRAP..... 126

Figura 4-23. Actividad antioxidante de las muestras de lías y LSI y sus fracciones medidas por el método DPPH. 126

Figura 4-24. Actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas de paredes de lías y LSI medidas por el método Folin-Ciocalteau. 137

Figura 4-25. Actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas de paredes de lías y LSI medidas por el método FRAP. 137

Figura 4-26. Actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas de paredes de lías y LSI medidas por el método DPPH..... 138

Figura 4-27. Actividad antioxidante (método Folin-Ciocalteau) de los precipitados (P) y los sobrenadantes (S) obtenidos con los tratamientos para la obtención de manoproteínas efectuados a las paredes de lías y LSI. 145

Figura 4-28. Actividad antioxidante (método FRAP) de los precipitados (P) y los sobrenadantes (S) obtenidos con los tratamientos para la obtención de manoproteínas efectuados a las paredes de lías y LSI. 145

Figura 4-29. Actividad antioxidante (método DPPH) de los precipitados (P) y los sobrenadantes (S) obtenidos con los tratamientos para la obtención de manoproteínas efectuados a las paredes de lías y LSI. 146

Índice de tablas

Tabla 2-1. Tipos de cava según su contenido en azúcares 13

Tabla 2-2. Métodos in vitro comunes de análisis de la Actividad Antioxidante. 20

Tabla 2-3. Macromoléculas de la pared celular de *S. cerevisiae* 34

Tabla 2-4. Contenido de polifenoles en lías (mg/L).. 52

Tabla 2-5. Resultados del análisis de extracto seco de levadura en polvo..... 52

Tabla 4-1. Parámetros enológicos generales de los vinos base de los cupajes A y B..... 80

Tabla 4-2. Parámetros enológicos generales de los vinos espumosos *sur lie* a los 9 meses de envejecimiento según cupaje A y B. 81

Tabla 4-3. Parámetros enológicos generales de los vinos espumosos comerciales (sin lías) a tiempo 0 según cupaje A y B. 81

Tabla 4-4. Valores medios de fenoles totales, hidroxicinamatos totales y flavanoles totales de vinos espumosos cava y Charmat a diferentes tiempos de envejecimiento *sur lie* 84

Tabla 4-5. Valores medios de fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavanoles totales de los vinos espumosos cava y Charmat a diferentes tiempos de envejecimiento comercial (sin lías) 85

Tabla 4-6. Valores promedio de sulfito libre (mg/L) de los vinos espumosos en envejecimiento comercial 86

Tabla 4-7. Valores medios de actividad antioxidante medida con los métodos FRAP y DPPH de los vinos espumosos cava y Charmat a diferentes tiempos de envejecimiento *sur lie*. 91

Tabla 4-8. Valores medios de actividades antioxidantes medidas con FRAP y DPPH de los vinos espumosos cava y Charmat a diferentes tiempos de envejecimiento comercial (sin lías) 93

Tabla 4-9. Valores R^2 de las correlaciones obtenidas entre la actividad antioxidante y el contenido en fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos, y flavanoles totales, para los dos periodos de envejecimiento de las muestras de vino espumoso. 94

Tabla 4-10 Número de células por gramo seco (DW), % de células antes de la disrupción (% CAD), % de células después de la disrupción (% CDD) y % de rotura promedio (% RP) de cada una de las muestras. 110

Tabla 4-11. Porcentaje de sólidos, pH, y ácido tartárico de las muestras centrifugadas antes del lavado. 117

Tabla 4-12 Contenido en ácidos hidroxicinámicos y sus derivados de las lías en µg/g de peso seco. 119

Tabla 4-13 Contenido en fenoles individuales distintos de los hidroxicinamatos (µg/g de peso seco). 119

Tabla 4-14. Porcentajes en polisacáridos totales, proteína, péptidos y aminoácidos libres de las muestras enteras y sus fracciones..... 121

Tabla 4-15. Porcentaje en tioles totales, glutatión reducido y glutatión oxidado (valores referidos al peso seco de levadura entera. 123

Tabla 4-16 Actividades antioxidantes de productos comerciales de *S. cerevisiae* medidas con los tres métodos (Folin-Ciocalteau, FRAP y DPPH) 128

Tabla 4-17. Porcentajes de peso seco de las paredes obtenidas de las muestras de lías y LSI respecto al peso seco inicial (antes de la disrupción), y % de polisacáridos, proteínas y tioles respecto al peso seco de pared 131

Tabla 4-18. Valores de actividad antioxidante de las paredes las muestras de lías y LSI respecto al peso seco de pared 132

Tabla 4-19. Porcentaje de polisacáridos totales de las diferentes fracciones obtenidas referidas al peso inicial de pared 133

Tabla 4-20. Valores de las correlaciones (R^2) obtenidas entre los diferentes métodos de actividad antioxidante utilizados y entre éstos y la concentración de aminoácidos y péptidos. 140

Tabla 4-21. Composición de los precipitados (P) y los sobrenadantes (S) obtenidos con los tratamientos para la obtención de manoproteínas efectuados a las paredes de lías y LSI.. 142

1. INTERÉS Y OBJETIVOS

Alicia: Por favor, ¿quieres decirme qué camino debo tomar para salir de aquí?
Gato: Eso depende de adonde quieras llegar.
- Lewis Carrol, "Alicia en el país de las maravillas"-

El mercado de los vinos espumosos se ha desarrollado en estos últimos años gracias al impulso de una notable demanda mundial, lo que ha llevado a un aumento del 40 % de su producción en menos de 10 años. España, con más de 1,8 millones de hectolitros al año, es el cuarto productor mundial. Esta vasta fabricación origina como desecho más de 200 toneladas de residuos de levadura de segunda fermentación al año, que la legislación europea denomina "lías". El destino habitual de estas lías es la desalcoholización mediante la destilación para su empleo en alimentación animal, con poco valor añadido, o su destrucción, lo que supone un gasto para la bodega.

Hasta ahora, el estudio de la composición y posibles aprovechamientos de subproductos de la industria vitivinícola se ha centrado en los residuos sólidos provenientes de la uva, como hollejos y pepitas. Existen algunas investigaciones sobre lías de vinos blancos y tintos, pero son muy escasas y en la mayoría de casos se refieren únicamente a la obtención de polifenoles. No hay datos acerca de la composición y potenciales usos que puede ofrecer la lía de segunda fermentación de vinos espumosos.

Las lías de segunda fermentación de vinos espumosos proceden de levaduras que han sido seleccionadas por reunir una serie de características, entre ellas, la facultad de fermentar a baja temperatura y la resistencia al alcohol y al anhídrido sulfuroso. Después de realizar la fermentación, se mantienen en sus respectivos vinos espumosos un tiempo determinado, durante el cual se produce el proceso de autolisis. Este proceso, fundamental para que los

vinos espumosos adquieran sus particularidades organolépticas, supone un lento intercambio de compuestos entre las lías no viables y el vino.

La levadura *per se* contiene importantes componentes con utilidad industrial, tanto en su citoplasma como en su pared. Varios de ellos son antioxidantes, existiendo numerosos estudios que han relacionado la actividad antioxidante de las levaduras con una protección frente a la oxidación de los vinos durante el envejecimiento biológico en lías. Teniendo en cuenta esto, es posible que una vez estas lías se hayan desechado de las botellas o depósitos de vino espumoso, retengan compuestos de interés y puedan seguir exhibiendo capacidad antioxidante, sugiriendo una reutilización dentro de la industria alimentaria.

El objetivo del presente trabajo es caracterizar las lías de segunda fermentación y evaluar su rol en la crianza de los vinos espumosos. El propósito es profundizar en sus propiedades y potencial antioxidante para esclarecer el papel de sus componentes en la calidad de los vinos espumosos e incluso poder llegar a revalorizar este material infrautilizado en su destino actual de destilación. Para conseguir esto, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer el papel antioxidante de las células de levadura en la elaboración de vinos espumosos. Para ello, se compararán las evoluciones de la capacidad antioxidante a lo largo del envejecimiento de los vinos espumosos en contacto con lías con la de vinos que envejecen sin la presencia de las mismas.
2. Caracterizar poblacional y morfológicamente lías diferentes provenientes de la fabricación de vinos espumosos. Este objetivo comprende dos partes: en primer lugar, una visualización en microscopio confocal para determinar forma, tamaño y posibles impurezas, y en segundo, un análisis por citometría de flujo, teniendo en cuenta tanto señales de dispersión como de fluorescencia.
3. Caracterizar la composición de lías diferentes recuperadas de la elaboración de vinos espumosos para determinar dónde reside su potencial antioxidante. Este objetivo también se divide en dos partes: por un lado, se estudiará la composición de la lía entera, su interior (citoplasma) y su parte externa (pared celular), y se relacionará con

su capacidad antioxidante. Por otra parte, se subdividirá su pared celular en sus diferentes componentes, analizando la composición y la actividad antioxidante de cada uno de ellos.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Pude ver más lejos porque estaba encaramado a hombros de gigantes.
- Isaac Newton –

2.1 VINOS ESPUMOSOS NATURALES

Los vinos espumosos naturales se caracterizan por una segunda fermentación de un vino base mediante la adición de azúcares y levaduras. El gas carbónico que se origina se conserva en el vino ya que esta segunda fermentación transcurre en recipiente cerrado.

Como consecuencia de esta elaboración especial, en el momento de ser servidos, los vinos espumosos forman una espuma de sensible persistencia con un desprendimiento de burbujas continuo [1]. De acuerdo con la legislación europea, un vino espumoso debe tener una presión de CO_2 mínima de 3 atmósferas, medida a 20 º C (3,5 atmósferas para los vinos espumosos de calidad producidos en regiones determinas, "vecprd") [2].

Por sus particularidades organolépticas y las exigencias de calidad que los envuelven, el consumo de vinos espumosos se ha asociado tradicionalmente a la celebración de eventos y fiestas. Entre los vinos espumosos que gozan de un reconocido prestigio internacional se encuentran el *Champagne* (localizado en la región de Epernay y Reims, Francia), el Cava (principalmente producido en el Penedés, Barcelona) y el Talento (norte de Italia).

2.1.1 Elaboración de vinos espumosos

La elaboración de los vinos espumosos involucra dos etapas netamente diferenciadas: la preparación del vino base o *cuvée* y la segunda fermentación y envejecimiento con sus

levaduras o envejecimiento *sur lie*. Las diferencias en el método seguido durante esta segunda fase es la que marca los tres tipos de vinos espumosos naturales que hay: vinos elaborados por el método tradicional o *Champenoise*, de los cuales el cava y el Champán son los más representativos; los espumosos fermentados en botella, llamados tránsfer; y los elaborados en grandes depósitos, llamados granvás o Charmat [3].

2.1.1.1 Obtención del vino base

La vinificación de los vinos espumosos comienza con la vendimia, que se realiza una vez la uva ha alcanzado la madurez tecnológica. Las variables más importantes utilizadas para determinar la calidad de la uva y su madurez para la producción de vinos espumosos son el volumen de alcohol probable (concentración de azúcar en g/L), la acidez total, el pH, el contenido en ácido glucónico (un índice del estado sanitario de la uva), y la concentración de nitrógeno asimilable [4]. Las variedades de uva utilizadas en la elaboración de vinos espumosos pueden ser blancas (*blanc de blancs*) o tintas (*blanc de noirs*). Para los vinos espumosos elaborados mediante el método tradicional, las diferentes denominaciones de origen sólo autorizan el uso de unas variedades concretas. Para el caso de la elaboración de cava las variades permitidas de uva blanca son: Xarel·lo, Parellada, Macabeo, *Chardonnay* y Malvasia, y de uva tinta: Garnacha negra, Monastrell, Pinot noir y Trepat (Reglamento D. O. Cava 1990). Esta última variedad sólo puede ser utilizada para la elaboración de cava rosado, el cual se produce por el método de sangrado del vino tinto. Con diferencia, las variedades más utilizadas para la elaboración de cava son Xarel·lo, Parellada y Macabeu.

La prevención de la oxidación de los compuestos fenólicos es fundamental para la producción de vinos blancos de mesa, y de especial importancia en el caso de los vinos espumosos, en los cuales se lleva a cabo una segunda fermentación y un envejecimiento más o menos prolongado. Por eso, las uvas se transportan hacia la bodega con sumo cuidado en cajas perforadas de capacidad limitada y se prensan lo más rápidamente posible a fin de minimizar procesos de pardeamiento y fermentaciones incontroladas.

El prensado para la obtención del mosto se realiza de manera fraccionada (prensado *champenoise*). El mosto producido con presiones suaves se usa para producir los vinos espumosos de más calidad, mientras que el producido incrementando la presión se utiliza para vinos espumosos de menos calidad y para la elaboración de otros vinos (vinos de mesa) [5]. A las salida de las prensas, y para evitar la oxidación del mosto, éste se sulfita a razón de 5 a 10 mg/L, según la calidad de la vendimia [3]. El mosto es también desfangado preferiblemente mediante un método estático (sedimentación durante 12-24 horas), aunque algunos productores utilizan métodos dinámicos (filtración a vacío o centrifugación). Posteriormente, se puede corregir la acidez con ácido tartárico y/o ácido cítrico y adicionarse bentonita para facilitar las precipitaciones proteicas y la eliminación parcial de polifenoles. En el caso de mostos elaborados en climas fríos, donde la concentración de azúcares no es suficiente para obtener un grado alcohólico correcto en el vino base, se recurre a la adición de azúcares o mosto concentrado (chaptalización).

La primera fermentación a menudo se lleva a cabo en grandes depósitos de acero, aunque algunos productores usan pequeñas barricas y toneles de madera para fermentar todo o parte del vino base, lo que aumenta la estructura del vino sin aumentar considerablemente la astringencia [6]. La temperatura se mantiene por debajo de los 20 ºC (normalmente entre los 15 -18 ºC), a fin de evitar la pérdida de volátiles que podría afectar el desarrollo del aroma. Las levaduras utilizadas habitualmente son *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas por la bodega. Las levaduras completan la fermentación en pocos días, obteniéndose un vino turbio y seco, con una concentración de azúcar residual inferior a 1,5 g/L. Durante la maduración del vino, los coloides sedimentan, haciendo el vino más limpio y brillante. Si la clarificación mediante decantado no es suficiente, se recurre a agentes clarificantes clásicos (bentonita, gelatina, caseinatos, etc.) o a otros más novedosos (proteína vegetal, quinina, polivinilpirrolidona, etc.).

La fermentación maloláctica se realiza si la acidez del vino es excesiva (superior a 15 g/L), o para prevenir que ocurra posteriormente en la segunda fermentación. La estabilización tartárica es necesaria para evitar la precipitación de cristales de bitartrato de

potasio y tartrato de calcio durante el envejecimiento, y se realiza disminuyendo la temperatura del tanque por debajo de 0 ºC y filtrando el vino a través de membranas de 0,45 μm [4].

Los vinos base destinados a la producción de cava tienen que cumplir los siguientes requisitos analíticos que se describen en el Reglamento de la Denominación "Cava" y de su Consejo Regulador (1991):

- Graduación alcohólica adquirida: 9,5 – 11,5 % v/v
- Acidez total mínima (en ácido tartárico): 5,5 g/L
- Extracto seco no reductor: 13 – 22 g/L
- Acidez volátil real (en ácido acético): inferior a 0,60 g/L
- Anhídrido sulfuroso (máximo): 140 mg/L
- Cenizas: 0,70 -2 g/L
- pH: 2,8 – 3,3.

Los vinos utilizados para los espumosos Charmat suelen ser vinos del año, con un grado alcohólico entre 10 y 10,5 % v/v, con poco azúcar residual, buena acidez total (6,5 – 7,5 g/L de ácido tartárico) y un contenido normal de acidez volátil (0,3 – 0,4 g/L en ácido acético) [3].

2.1.1.2 Segunda fermentación y envejecimiento sur lie

Una vez se obtienen los vinos base comienza la etapa más característica de la elaboración de vinos espumosos: la segunda fermentación y el envejecimiento *sur lie*. Entre los diversos métodos para obtener vinos espumosos, los que se utilizan en mayor medida y tienen mayor reputación son los elaborados mediante el método *Champenoise*, tradicional o clásico, y en segundo lugar los elaborados mediante el método Charmat o granvás.

MÉTODO TRADICIONAL

Las primeras referencias fiables a la elaboración de vinos espumosos datan del siglo XVIII en la región de Champagne y son atribuidas al abad Pierre Perignon, que por primera vez estudia en profundidad su proceso de preparación y establece sus fundamentos. Dado el

gran éxito de estos vinos y el impulso de su consumo entre la nobleza y la burguesía, este método de elaboración se extiende por la región de Champagne, y a finales del siglo XIX se introduce en Cataluña de la mano de Joan Raventós, propietario de las bodegas Codorniu. Todos los espumosos elaborados por este método se llaman champanes, hasta el año 1958 en que se funda el Consejo Regulador de la Denominación de Origen *Champagne*, que sólo permite a los espumosos elaborados en dicha zona y por unas determinadas bodegas ostentar la denominación de *champagne*.

El método tradicional se basa en que la segunda fermentación y la crianza *sur lie* se realizan íntegramente en la misma botella donde se comercializa el producto final. En la figura 2-1 se encuentra esquematizado el proceso de elaboración de vinos espumosos mediante el método tradicional. Las etapas se describen a continuación:

Cupaje. Dependiendo de los atributos de los vinos estabilizados, el enólogo prepara una mezcla o cupaje adecuados para obtener el vino base final. El cupaje, que puede ser mezcla de vinos base de diferente variedad o añada, es a menudo realizado porque es difícil que un vino base de una añada y una variedad concreta esté perfectamente balanceado en composición y aroma para conseguir un vino espumoso de calidad. El cupaje se realiza con los siguientes objetivos: para obtener un vino base con la suficiente consistencia en aroma y calidad; para aumentar la calidad de los vinos individuales, y para la producción de suficiente vino base [6].

Tiraje. Consiste en la adición a la mezcla de vinos base (cupaje) de los azúcares y levaduras necesarios para la segunda fermentación. Estos azúcares y levaduras se añaden mediante el 'licor de tiraje', que está compuesto de 500 g/L de azúcar, entre 1 – 2 millones/mL de células de levadura, 0,1 a 0,2 g/L de bentonita, y fosfato de amonio y otros compuestos para estimular el crecimiento de las levaduras. Aproximadamente se dosifican entre 40 y 42 mL de licor de tiraje por botella, lo suficiente para conseguir entre 3 y 4 bares de sobrepresión en el producto final. La cantidad de dióxido de azufre no debería exceder de 25 mg/L, para no entorpecer la proliferación de levaduras. Después de la adición del licor de tiraje al vino base y de su perfecta homogeneización, se procede al embotellado.

Las levaduras que se utilizan para la elaboración de vinos espumosos deben de reunir una serie de características particulares [3]:

- Facultad de fermentar a baja temperatura.
- Tendencia a aglomerarse entre sí y no adherirse a las paredes de la botella.
- Resistencia al alcohol y al anhídrido sulfuroso.
- Rendimiento alcohólico elevado.
- Buen potencial aromático.
- Agotamiento completo de azúcares.
- Baja producción de acidez volátil.
- Capacidad fermentativa a presión alta (5-6 atmósferas) y baja temperatura (12-14 ºC).
- No productoras de SH_2.

Segunda fermentación y crianza biológica. Las botellas cerradas herméticamente se colocan dentro de las cavas en posición horizonal (rima), y comienza la segunda fermentación. Las condiciones dentro de la cava son controladas; la temperatura debe ser baja, entre 10 y 15 ºC, para que la segunda fermentación se produzca de forma lenta y conseguir una espuma fina y persistente. La humedad también debe de ser baja y las botellas deben de protegerse de la luz.

El tiempo necesario para completar la segunda fermentación es variable, depende de la temperatura de las botellas y de la graduación alcohólica del vino. En términos generales oscila entre 1 y 3 meses, en los cuales se forma dióxido de carbono hasta una presión de 5 – 6 bares y se aumenta el grado alcohólico del vino base en 1,5 grados. Después de acabada la segunda fermentación, las levaduras dejan de ser viables, pasando a denominarse “lías”. Los vinos se mantienen en posición horizontal, madurando en contacto con sus lías durante un tiempo determinado, nunca inferior a 9 meses. Esta maduración o crianza *sur lie* es fundamental para otorgar al vino espumoso sus características organolépticas propias; un envejecimiento *sur lie* más prologado está relacionado con una mejor calidad en el vino espumoso final [4].

Removido. Finalizada la fase de crianza biológica, las botellas se someten a la etapa del removido con el fin de separar completamente las lías de la pared de la botella y llevarlas a la punta para poder eliminarlas después en la fase de degüelle. Para ello, se realizan una serie de movimientos rotativos sucesivos y a la vez las botellas se posicionan progresivamente de manera vertical invertida (en punta). Este proceso puede ser manual (pupitre clásico) o automatizado, pero al final del mismo el vino espumoso ha de tener una gran limpidez. Las botellas en posición en punta pueden permanecer un día, un mes e incluso un año hasta el degüelle. Durante esta fase las botellas se adhieren al tapón y el buqué se afina.

Degüelle. Esta operación elimina definitivamente las lías depositas en el cuello de la botella. Se procede a congelar el vino que contiene las lías en el cuello de la botella mediante inmersión en solución de etilenglicol al 45 % a una temperatura de -25 ºC durante 10 minutos. Posteriormente las botellas se colocan en posición vertical y se retiran el tapón corona y el obturador, de manera que la presión interna del vino espumoso expulse el depósito de lías junto con una pequeña parte del vino.

Dosificación del licor de expedición y acabado. A la salida del degüelle, todos los vinos espumosos elaborados mediante el método tradicional reciben la adición del licor de expedición, necesario para rellenar las pérdidas de vino que tuvieron lugar. De forma general, el licor de expedición suele estar formado por vino, SO_2 y azúcares (excepto para la calidad brut nature). Con esta adición del licor de expedición se puede ajustar el contenido en azúcares de acuerdo a la legislación vigente (tabla 2-1). Una vez se ha adicionado el licor de expedición se tapa la botella con el tapón de corcho definitivo y se coloca un bozal de alambre que lleva una placa metálica.

Las botellas se someten a agitación para homogeneizar el vino con el licor de expedición. Terminado todo el proceso, las botellas deben de permanecer en posición vertical, en locales acondicionados, durante 15 días como mínimo y a una temperatura de 10 ºC. En el momento de salir al mercado, se aconseja su consumo en un plazo corto, preferiblemente inferior a un año, tanto en los espumosos jóvenes como en los espumosos reserva.

EL CAVA

En España el vino espumoso por excelencia es el Cava. La Denominación de Origen "Cava" incluye bodegas de diferentes regiones españolas, con gran predominio de Cataluña en cuanto a superficie cultivada y volumen de producción, donde la mayoría de las bodegas elaboradoras se sitúan en la región del Penedés. Fuera de Cataluña, la producción de Cava queda restringida a otras zonas vinícolas dentro de La Rioja, Campo de Borja, Navarra, Burgos, Almendralejo y Valencia. Los vinos espumosos elaborados por el método tradicional, que por no estar comprendida su zona de producción entre las acogidas a la Denominación de Origen, no pueden usar el término cava y se comercializan como "vinos espumosos de calidad elaborados por el método tradicional".

El Cava es un VECPRD, es decir, un "vino espumoso de calidad producido en una región determinada", y está protegido legalmente por el Reglamento de la Denominación "Cava" y de su Consejo Regulador (1991). Esta legislación delimita las zonas de producción de cava anteriormente descritas, autoriza el uso de unas variedades de uva determinadas y obliga a las bodegas a cumplir con una serie de parámetros de calidad concretos, tanto del vino base como del cava final producido. De esta manera, en el Reglamento de la Denominación "Cava" se especifican los siguientes parámetros analíticos para el cava:

- Graduación alcohólica adquirida: mínima 10,8 % (v/v) y máxima 11,8 % (v/v)
- Acidez total mínima (en ácido tartárico): 5,5 g/L
- Extracto seco no reductor: mínimo 13 g/L y máximo 22 g/L
- Acidez volátil real (en ácido acético): inferior a 0,65 g/L
- Anhídrido sulfuroso total: inferior a 160 mg/L
- Cenizas: mínimo 0,70 g/L y máximo 2 g/L
- pH: mínimo 2,8 y máximo 3,3
- Sobrepresión mínima: 3,5 bares a 20 ºC.

También se especifican los diferentes tipos de cava en función de su contenido en azúcares:

Tipo	Contenido en azúcares (g/L)
Brut nature (*)	< 3
Extra brut	< 6
Brut	< 12
Extra-seco	12-20
Seco	17 - 35
Semi-seco	33 - 50
Dulce	> 50

Tabla 2-1. Tipos de cava según su contenido en azúcares. (*) Sin adición de azúcares

Un parámetro de calidad muy importante de los vinos espumosos elaborados mediante el método tradicional es el tiempo que ha transcurrido desde el tiraje hasta el degüelle, donde estará incluido el tiempo que ha permanecido en envejecimiento *sur lie* el vino espumoso. Para la denominación "Cava", ese tiempo es de 9 meses como mínimo, y para que el cava pueda tener la indicación de "Reserva", al menos de 15 meses.

La indicación de Cava "Gran Reserva" está restringida a los Cava del tipo Brut Nature, Extra Brut y Brut, con un tiempo mínimo transcurrido desde el tiraje hasta el degüelle de 30 meses, y que se haya realizado en la misma bodega.

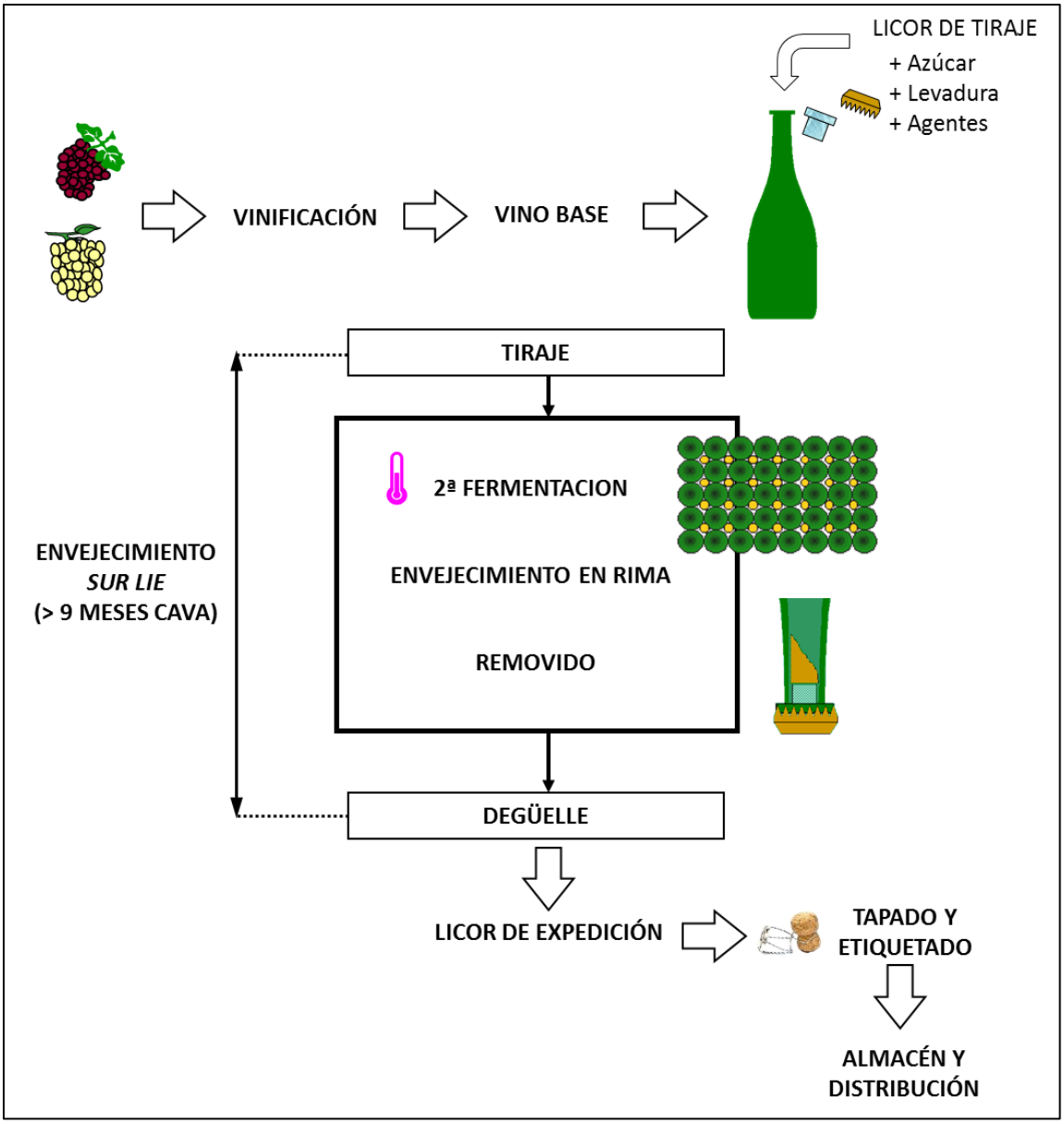


Figura 2-1. Elaboración de vino espumoso mediante el método tradicional.

MÉTODO CHARMAT O GRANVÁS

El método Charmat, granvás, *cuvée close* o método continuo (según el país productor), consiste básicamente en desarrollar la segunda fermentación y el envejecimiento *sur lie* del vino espumoso dentro de grandes recipientes isobáricos, con embotellado final a la presión alcanzada. Este sistema data de 1851, pero fue en 1907 cuando Jean-Eugène Charmat lo

perfeccionó, convirtiéndolo en verdaderamente funcional y de completa utilización industrial. Posteriormente ha sufrido varias modificaciones que lo han llevado a un nivel de alta perfección técnica.

Con sus grandes depósitos presurizados e interconectados, el método Charmat presenta claras ventajas económicas frente al método tradicional: se pueden producir grandes volúmenes, no hay pérdidas de presión y el tiempo de envejecimiento *sur lie* puede ser inferior. Todo esto permite elaborar espumosos de precio inferior, aunque a menudo no tan valorados organolépticamente como los tradicionales. El método consta de las siguientes fases ilustradas en la figura 2-2:

Segunda fermentación. La segunda fermentación transcurre en autoclaves que pueden resistir presiones de más de 13 bares a 20 ºC [4]. El cupaje se añade al depósito de mezcla que ya contiene las levaduras activas (se preparan con vino para adaptarlas a la presencia de alcohol). Se dosifica posteriormente el jarabe (que contiene un 50 % de sacarosa) y se deja que comience la fermentación, tras lo cual se trasvasa a los autoclaves.

La temperatura ideal para la segunda fermentación es de 12 – 13 ºC, ya que permite un perlaje más fino y duradero. Los tanques poseen agitadores y controladores de la temperatura que permiten que la fermentación transcurra más rápida y homogéneamente que en botella. Cuando se alcanzan las 4 atmósferas de presión deseadas, la temperatura del tanque se reduce a 8 ºC para detener la fermentación, dejando aproximadamente un 10 % de azúcares residuales. Una vez alcanzada la presión final, el tiempo mínimo que el autoclave debe de permanecer cerrado hasta que se embotella el vino es de 30 días (Charmat corto), aunque algunos pueden permanecer en contacto con las lías varios meses e incluso años (Charmat largo) [3].

Transvase isobárico. La bajada de temperatura provoca que las lías se depositen en el fondo del autoclave por decantación. Las lías se separan del vino por trasvase a otro tanque bajo presión. Cuando el vino es trasferido a otro tanque, se centrifuga o se filtra para eliminar

las lías. La ejecución de este trasvase se realiza mediante sobrepresiones gaseosas utilizando aire comprimido o nitrógeno (el CO_2 está prohibido).

Estabilización del vino espumoso. Para inducir la estabilización tartárica se baja la temperatura del vino hasta –4 ºC durante 10 días. En este método también se adiciona licor de expedición para obtener diferentes vinos espumosos según su contenido en azúcares. Finalmente, se realiza una filtración esterilizante interponiendo un filtro en línea con la embotelladora.

Embotellado isobárico. En primer lugar, la botella se llena con nitrógeno, y posteriormente se añade el vino a una temperatura entre 0 y 4 ºC, procurando que la pérdida de presión sea mínima. El tapón puede ser de corcho, generalmente de inferior calidad e incluso de aglomerado, de polietileno recubierto de corcho o de plástico. Estos vinos espumosos se pueden diferenciar por tener una circunferencia en la base del tapón.

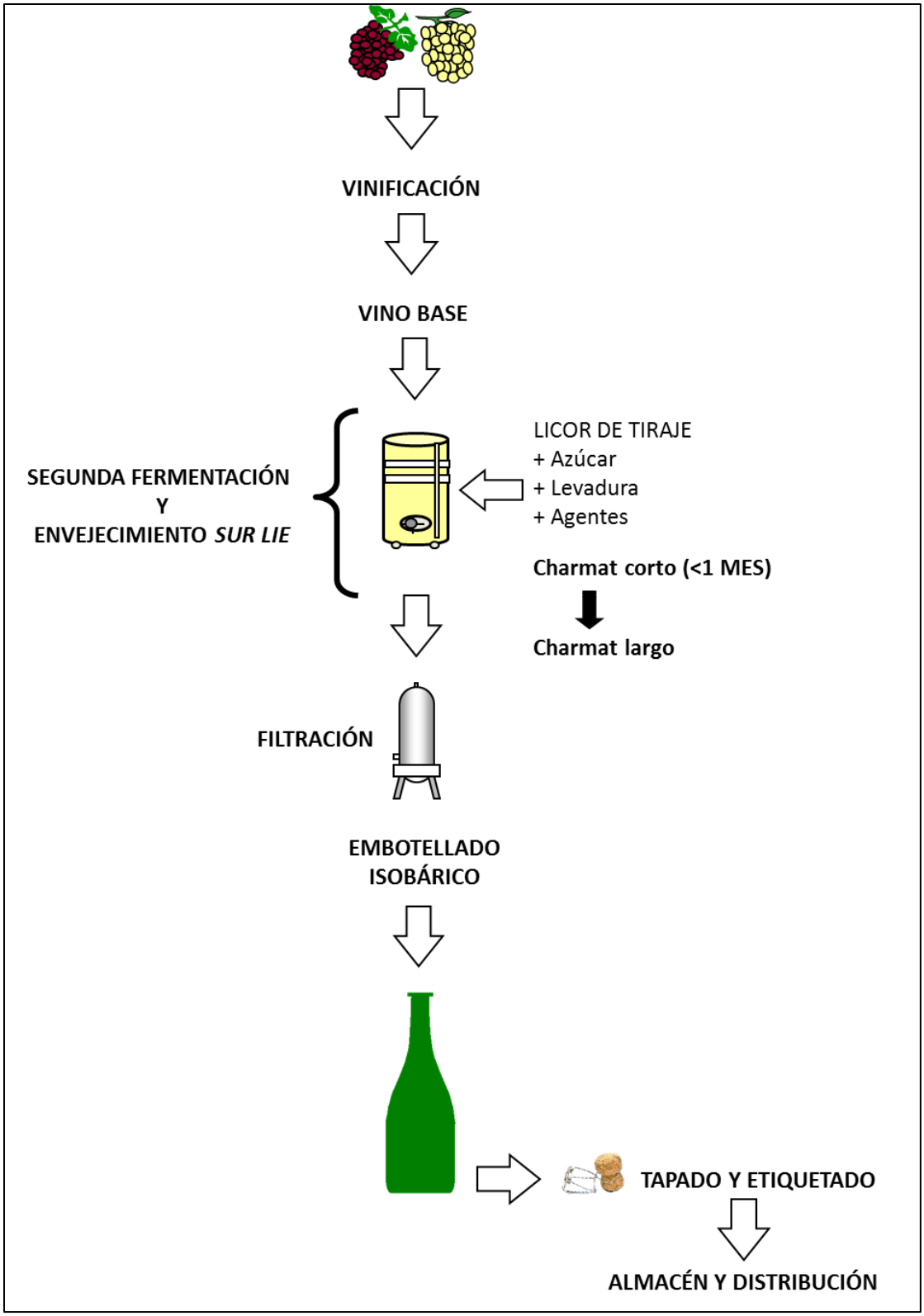


Figura 2-2. Elaboración de vino espumoso mediante el método Charmat.

2.1.2 Propiedades antioxidantes de los vinos espumosos

Las propiedades antioxidantes del vino se han estudiado en profundidad en las últimas décadas, poniéndose especial atención en su protección frente al cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Estos efectos beneficiosos del vino se relacionan con su alto contenido en fenoles, compuestos antioxidantes que han demostrado inhibir la agregación plaquetaria [7], prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [8], y mejorar los procesos inflamatorios y carcinogénicos [9].

Los estudios sobre actividad antioxidante, tanto *in vitro* como *in vivo*, se han realizado sobre todo con vinos tintos y vinos blancos, siendo escasas las publicaciones donde se analiza la actividad antioxidante de vinos espumosos [10]–[14]. Aunque los compuestos fenólicos son los principales agentes antioxidantes de los vinos espumosos, también pueden contener otras sustancias con propiedades antioxidantes, ya sean de origen natural (como el ácido ascórbico) o aditivos añadidos (como el SO_2). Es importante tener en cuenta que los compuestos contenidos en el vino pueden tener respuestas diferentes a los reactivos específicos usados en los métodos de análisis de la actividad antioxidante, lo que hace necesario el uso de varios métodos para una determinación más completa de la actividad antioxidante.

2.1.2.1 Métodos para determinar la actividad antioxidante

Un antioxidante biológico se define como "cualquier sustancia que, cuando se presenta a bajas concentraciones comparadas con el sustrato oxidable, significativamente previene o disminuye la oxidación de ese sustrato" [15]. Los antioxidantes pueden interferir con el proceso de oxidación, mediante reacción con radicales libres, quelando metales catalíticos y también por captación de oxígeno.

Hay una gran variedad de métodos para evaluar la actividad antioxidante de los alimentos, pero, desafortunadamente, no hay ningún método estándar. Cada método está basado en unas reacciones y condiciones particulares y los antioxidantes se encuentran en la

mayoría de casos en unas matrices alimentarias complejas, influenciadas a su vez por las condiciones del ensayo. Además, los compuestos medidos individualmente no reflejan necesariamente la actividad antioxidante total ya que se ha documentado que los antioxidantes pueden actuar de manera sinérgica con otros antioxidantes [16], [17]. Por lo tanto, los valores de actividad antioxidante dependerán del método aplicado, las condiciones del ensayo y la matriz alimentaria, por lo que será necesario el uso de varios métodos de análisis de la actividad antioxidante que proporcionen una información diferente y complementaria.

Dependiendo de los mecanismos de las reacciones implicadas, los métodos *in vitro* de análisis de la actividad antioxidante se clasifican generalmente en dos tipos: ensayos basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en transferencia de electrones (ET) (tabla 2-2) [17]. La mayor parte de los ensayos HAT aplican un esquema de reacción competitiva; el antioxidante y el sustrato compiten por los radicales peroxilo térmicamente generados a través de la descomposición de compuestos azo. Entre estos ensayos se encuentran la inhibición de la autooxidación de la lipoproteína de baja densidad, capacidad de absorbancia de radical oxígeno (ORAC), parámetro antioxidante de atrapamiento de radical (TRAP), y ensayos de blanqueamiento de crocina. Los ensayos de ET miden básicamente la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante mediante una reacción colorimétrica, por lo que el cambio de color se relaciona con la capacidad antioxidante de la muestra. Entre los ensayos ET encontramos el método de Folin-Ciocalteau, la capacidad antioxidante de trólox (TEAC), el poder antioxidante de reducción de iones férricos (FRAP), el ensayo de potencial antioxidante total con complejo Cu(II) como antioxidante, y el método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Otros ensayos no clasificados como HAT o ET, se basan en la reacción con oxidantes biológicamente relevantes como el oxígeno singlete, el anión superóxido, peroxinitritos, y radical hidroxilo.

Entre los métodos más utilizados para el análisis de la actividad antioxidante de vinos espumosos, se encuentran los métodos DPPH y FRAP por su aplicabilidad a pH ácidos (DPPH a pH 5,5 y FRAP a pH 3,5) [13]. Desde que Singleton y Rossi extendieron su uso [18]-[19], el

método de Folin-Ciocalteau se utiliza habitualmente para la determinación de fenoles totales en todos los tipos de vinos, incluidos los vinos espumosos. Considerando que el reactivo es inespecífico y también puede reducirse por otros componentes, realmente el método mide la capacidad reductora de la muestra [20].

Métodos *in vitro* de análisis de la Actividad Antioxidante	
Ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno $ROO\cdot + AH \longrightarrow ROOH + A\cdot$ $ROO\cdot + LH \longrightarrow ROOH + L\cdot$	ORAC (capacidad de absorbancia de radical oxígeno) TRAP (parámetro antioxidante de atrapamiento de radical) Ensayo de blanqueamiento de Crocina Inhibición de la oxidación de ácido linoleico Inhibición de la oxidación de las LDL
Ensayos de transferencia de electrones $M(n) + e^-(\text{de } AH) \longrightarrow AH^{+\cdot} + M(n-1)$	TEAC (capacidad antioxidante de trólox) FRAP (poder antioxidante de reducción de iones férricos) DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) Capacidad de reducción de Cu (II) Folin-Ciocalteau (determinación de polifenoles totales)
Otros ensayos	TOSC (capacidad total secuestrante de radicales oxígeno) Reacción de inhibición de la reacción oscilante de Briggs Rauscher Quimioluminiscencia

Tabla 2-2. Métodos in vitro comunes de análisis de la Actividad Antioxidante. $ROO^{\cdot}$=radical; AH=antioxidante; LH=sustrato; M(n)=oxidante.

2.1.2.2 Actividad antioxidante y contenido en compuestos fenólicos

Los fenoles son una serie de compuestos de gran importancia en la química del vino. Por una parte contribuyen de manera decisiva en sus características sensoriales, particularmente color [21], astringencia y amargor [22], y por otra, como ya se indicó al comienzo del apartado, están relacionados con sus propiedades antioxidantes y beneficiosas para la salud.

Los fenoles son un grupo muy extenso de compuestos que contienen anillos bencénicos y uno o más grupos hidroxilo asociados (en la mayoría de casos) a estos anillos

bencénicos. Se dividen en no flavonoides (derivados del fenilpropanoide), y flavonoides (figura 2-3). Son compuestos antioxidantes porque reaccionan fácilmente con radicales para formar un radical anión muy estable [23].

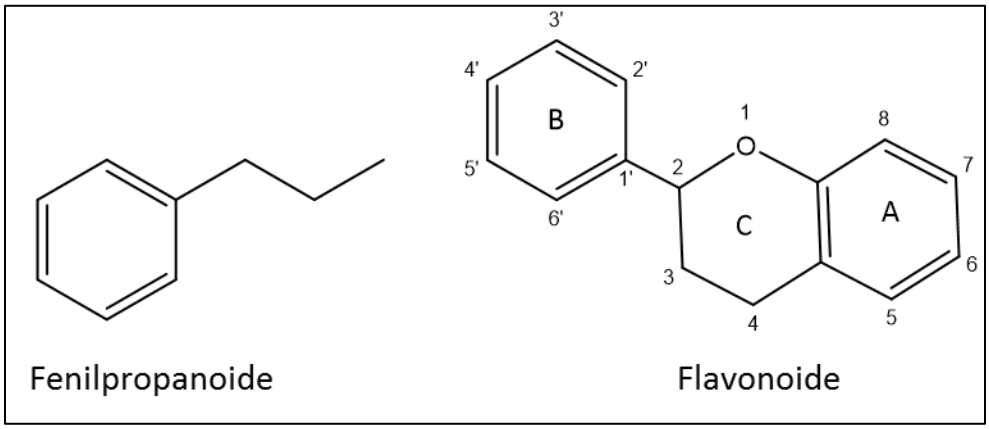


Figura 2-3. Estructura química del fenilpropanoide y estructura básica de los flavonoides.

Los vinos espumosos son en general ricos en fenoles [24]–[26]. Su contenido depende de varios factores, incluyendo variedad de uva, condiciones de cultivo y vendimia, calidad del vino base, levaduras utilizadas y tiempo de crianza *sur lie* [27]–[29]. En los vinos espumosos elaborados con vinos base blancos se han encontrado fenoles totales en cantidades similares al vino blanco: entre 130 y 200 mg/L [12], [14], [24]. Los fenoles más abundantes, al igual que en el vino blanco, son los ésteres tartáricos del ácido hidroxicinámico (no flavonoides), especialmente los ácidos t-caftárico, c-coutárico, t-coutárico y ferúlico (figura 2-4). El tirosol, un producto del metabolismo de la levadura, es otro de los fenoles presentes en mayores concentraciones [12], [25], [26] (figura 2-5). Del grupo de los flavonoides, la catequina y la epicatequina son los más abundantes [6], [8] (figura 2-5).

Como en el caso del vino tinto y el vino blanco, la actividad antioxidante de los vinos espumosos se ha asociado principalmente con su contenido en compuestos fenólicos. No hay consenso de si la actividad antioxidante de los vinos está ligada a la concentración de polifenoles totales o de ciertos fenoles individuales [14]. Satué-Garcia [12] correlacionó la actividad de los vinos espumosos cava con su contenido en compuestos fenólicos totales pero también con el contenido en ácido cafeico, ácido coumárico, ácido protocatéquico y

quercetina-3-glucurónido. Dichos autores concluyen además que los vinos espumosos cava testados a la misma concentración de fenoles totales que los vinos tintos tienen valores similares de capacidad antioxidante.

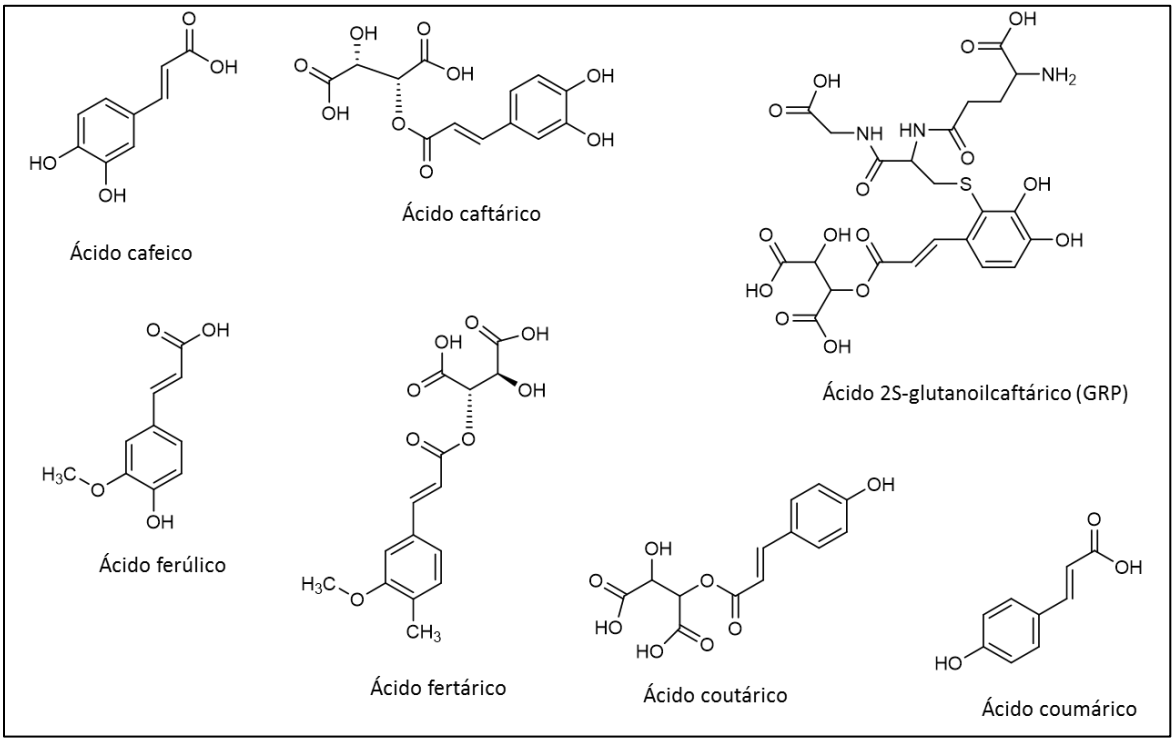


Figura 2-4. Ácidos hidroxinámicos y sus derivados (hidroxicinamatos) más habituales en vinos espumosos.

Jordão [14] investigó los contenidos de las diferentes fracciones de proantocianidinas (polímeros de catequina y epicatequina y sus ésteres de ácido gálico) y la actividad antioxidante de vinos espumosos portugueses (Denominación de Origen *Bairrada*) blancos y tintos. La capacidad antioxidante se correlacionó con todas las fracciones de proantocianidinas y con los polifenoles totales, obteniéndose correlaciones más altas para los vinos espumosos tintos.

Algunos autores creen que la capacidad antioxidante no depende exclusivamente del contenido en compuestos fenólicos totales; hay indicios de que algunos polifenoles cuando se unen con carbohidratos disminuyen su capacidad antioxidante [11], [30]. Stefenon [11] obtuvo valores de capacidad antioxidante para vinos espumosos Charmat brut superiores a

Charmat semiseco y altas correlaciones negativas entre las concentraciones de algunos polifenoles glicosilados y la actividad antioxidante.

Los fenoles a lo largo de la rima parecen tener un comportamiento variable [25], [26], [31]. Hasta la fecha, el único estudio que ha analizado la actividad antioxidante y los fenoles totales e individuales durante el periodo *sur lie* es el de Stefenon [10]. En sus resultados se muestra que la actividad antioxidante disminuye con el tiempo de envejecimiento, relacionándose con la disminución de polifenoles totales y flavonoides. La influencia del envejecimiento *sur lie* es mayor para los vinos elaborados por el método tradicional que para los espumosos Charmat, ya que la diminución con el tiempo fue mucho más acusada para los primeros.

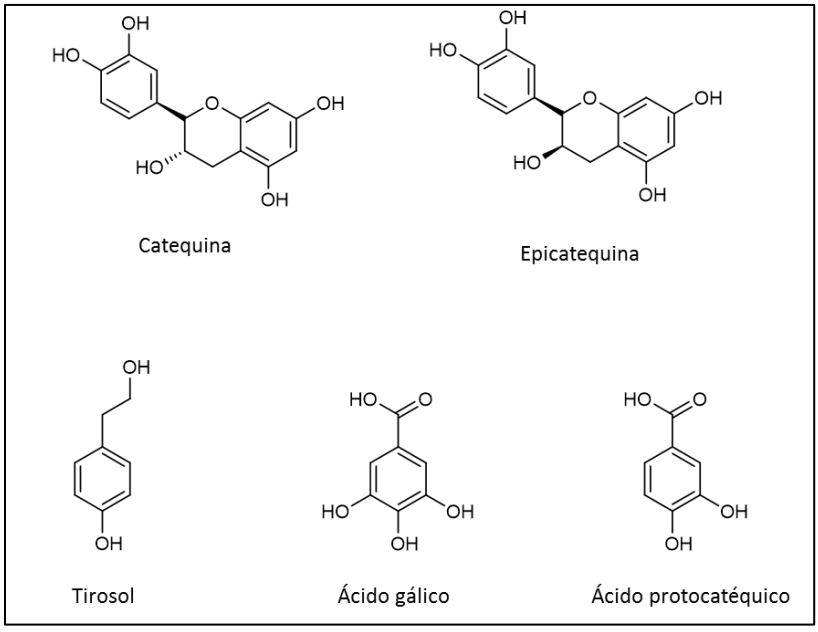


Figura 2-5. Otros fenoles habituales en vinos espumosos.

2.1.2.3 Actividad antioxidante relacionada con otros compuestos

A parte de los polifenoles, otras sustancias pueden actuar como antioxidantes en los vinos espumosos. Algunas de ellas están naturalmente presentes en la uva, otras provienen de la fermentación y envejecimiento en levaduras y otras son añadidas intencionadamente

como aditivos. El estudio de su actividad antioxidante está más ligado a su función conservadora y tecnológica en el vino que a sus propiedades saludables.

El dióxido de azufre o sulfito se ha utilizado tradicionalmente para evitar el daño por oxidación de los vinos. En el caso de los vinos espumosos, el dióxido de azufre se añade en varias etapas de la vinificación: al mosto, al vino base y al licor de expedición. Según la legislación europea, no debe superar en el vino espumoso comercial la concentración de 235 mg/L [32], y para el caso del cava, regulado por el Reglamento de la Denominación "Cava" y de su Consejo Regulador, la concentración máxima será de 160 mg/L. También la levadura *S. cerevisiae* puede sintetizar sulfito a partir de sulfato durante la fermentación alcohólica, normalmente en pequeñas cantidades (10-30 mg/L), aunque en algunos casos el sulfito proveniente de la levadura puede llegar a 100 mg/L [3].

Los sulfitos en los vinos están presentes en estado libre y en estado combinado. En estado libre pueden estar como gas (SO_2), ácido (H_2SO_3) bisulfito (HSO_3) y sulfito (SO_3^{2-}), y en estado combinado pueden formar parte de combinaciones inestables con polifenoles, azúcares o ácidos (éstas son reversibles y constituyen la reserva de sulfito libre cuando decaen sus valores), o de combinaciones estables con el acetaldehído, ácido pirúvico y ácido 2-cetoglutárico. Las dos formas, libre y combinada, están en equilibrio, sobre el cual influye el pH y la temperatura; a mayor pH y temperatura mayor proporción de dióxido de azufre libre. La suma del dióxido de azufre libre y del combinado representa el dióxido de azufre total y las únicas formas con actividad antioxidante son el dióxido de azufre gas y bisulfito.

El sulfito juega un papel importante como protector frente a la oxidación previniendo el pardeamiento del mosto mediante inactivación de enzimas [33], e inhibiendo reacciones de Maillard en el vino [27], [28]. Como antioxidante, actúa en presencia de metales reduciendo las quinonas formadas durante el proceso de oxidación a su forma fenólica, y reaccionando con peróxido de hidrógeno [36]. Aunque se ha pensado durante mucho tiempo que el dióxido de azufre reaccionaba directamente con oxígeno y de esta manera protegía a los constituyentes del vino de la oxidación [34], [35], se ha comprobado que el ratio de reacción es bajo y que probablemente no se dé en gran medida en el vino [36], [37].

El ácido ascórbico es otro compuesto que se añade en algunas ocasiones a los vinos espumosos para protegerlos de la oxidación y así poder reducir el dióxido de azufre, cuyo uso presenta algunos inconvenientes para la salud y defectos aromáticos en el vino a dosis elevadas. Su utilización también está regulada por la legislación europea, estableciéndose un límite aplicable de uso de 250 mg/L [38]. Una pequeña cantidad de ácido ascórbico puede provenir del mosto, pero también la levadura puede sintetizar un estereoisómero durante la fermentación, el ácido D-eritroascórbico, con propiedades antioxidantes similares al ácido L-ascórbico [39].

El beneficio principal del ácido ascórbico es su capacidad para reaccionar con el oxígeno molecular antes de que éste reaccione y oxide los compuestos fenólicos [40]. Además, puede reducir los productos de oxidación de los polifenoles (orto-quinonas) a su estado original fenólico [41], aunque se ha comprobado en estudios electroquímicos que este modo de acción es mínimo [42]. La oxidación del ácido ascórbico genera ácido dehidroascórbico y peróxido de hidrógeno. El ácido dehidroascórbico es un compuesto inestable que puede degradarse en una variedad de productos, entre los cuales destaca la xilosona, compuesto que en presencia de flavanoles como la catequina puede generar polímeros precursores de pardeamiento [43], [44]. El peróxido de hidrógeno puede oxidar otros sustratos del vino, especialmente polifenoles, por lo que es necesario su uso combinado con dióxido de azufre para que éste reaccione con el peróxido de hidrógeno formado.

Existen varios productos enológicos derivados de levaduras que se han venido utilizando recientemente en la producción de vinos blancos y espumosos para mejorar su capacidad antioxidante y prevenir el pardeamiento. En general este tipo de preparaciones son ricas en glutatión, un tripéptido intracelular antioxidante de origen no proteico (L-γ-glutamil-L-cisteinil glicina), presente naturalmente en uvas y mostos. En vinos, la concentración de glutatión puede ser muy variable, desde valores no detectables hasta concentraciones superiores a 70 mg/L [45]–[48].

La utilización de glutatión puro durante la vinificación no está permitida por la legislación actual, pero sí existen varias publicaciones científicas que han investigado los

efectos de su adición en vinos antes del embotellado. En algunos casos, el glutatión demostró reducir significativamente el pardeamiento durante el envejecimiento y proteger algunos aromas frente de la oxidación [49], [50], sin embargo, en otros casos no limitó el pardeamiento [51], [52], o incluso lo aumentó [53].

El glutatión puede ser suplementado en el vino mediante el uso de derivados de levadura, cuyo uso está aprobado por la legislación actual (Reglamento CEE Nª 643/2006 de la Comisión). Aplicados en vinos blancos, los derivados de levadura protegen eficazmente del pardeamiento durante periodos de almacenamiento de ocho meses [53]. Rodríguez-Nogales [13] evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de vinos espumosos elaborados con diferentes derivados enológicos de levadura: *β*-glucanasas, autolisado de levaduras, paredes de levaduras y manoproteínas. En todos los casos, los vinos producidos con derivados enológicos mostraron valores de actividad antioxidante significativamente superiores a los del vino control, siendo los valores más altos los correspondientes a los espumosos elaborados con manoproteínas. Se encontraron altas correlaciones entre la actividad antioxidante y el contenido en proteínas y carbohidratos. Estos resultados indican que las preparaciones de levadura pueden ser excelentes coadyuvantes para la producción de vinos espumosos de alto valor añadido.

2.2 LEVADURAS Y LÍAS

La fermentación alcohólica, la etapa crucial en la elaboración de cualquier vino, se ha llevado a cabo durante milenios por levaduras. Aunque en ella pueden estar envueltas varias especies e incluso géneros, el principal papel lo juegan las especies del género *Saccharomyces* [35]. La razón de ello es su eficacia en metabolizar medios con alta concentración de azúcares y bajo contenido en compuestos nitrogenados. En vinos espumosos es habitual el uso de las especies *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus y S. bayanus* [54].

2.2.1 Citología de *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son microorganismos eucariotas unicelulares, de los cuales se han descrito en la actualidad alrededor de 1500 especies [55]. Las células de *Saccharomyces cerevisiae* tienen generalmente una forma elipsoide con un diámetro mayor entre 5 y 10 µm y uno menor entre 1-3 y 1-7 µm. La compartimentalización subcelular de esta eucariota se presenta esquemáticamente en la figura 2-6. Los componentes macromoleculares de la levadura comprenden proteínas, glucoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos [56].

2.2.1.1 Citoplasma y membrana

El citoplasma de la levadura es un fluido coloidal y ácido (pH 5,25) que principalmente contiene iones, compuestos orgánicos de bajo y medio peso molecular y macromoléculas solubles (enzimas, factores, glucógeno, etc.). Como todas las células eucariotas, el citoplasma está organizado por un citoesqueleto interno constituido por proteínas que polimerizan en estructuras filamentosas. Se han encontrado tres tipos diferentes de filamentos: microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios. Los microfilamentos son largos y flexibles polímeros de una única proteína, la actina, con diámetros entre 5 y 7 nm, situados como “parches” en la periferia celular y como cables a lo largo de la célula. Los microtúbulos son polímeros de tubulina de 25 nm de diámetro, que se extienden desde el exterior al interior del núcleo celular ya que intervienen en el movimiento de éste durante el ciclo celular. Finalmente, los filamentos intermedios son proteínas fibrosas de doble bucle de diversa longitud y de 10 nm de diámetro [57].

El citoplasma celular está protegido por la envuelta celular, la cual está constituida por (de dentro hacia fuera): la membrana plasmática, el espacio periplasmático y la pared celular. En *S. cerevisiae*, la envuelta celular representa el 15 % del volumen total de la célula y controla sus propiedades osmóticas y de permeabilidad [58].

La membrana plasmática es un orgánulo altamente selectivo, formado principalmente por lípidos y proteínas (40 y 50 % respectivamente). Tiene un grosor aproximado de 7,5 nm, con algunas invaginaciones en el citosol. Como otras membranas, es una bicapa lipídica con proteínas insertadas o atravesando la bicapa como proteínas transmembrana con varias funciones. La composición lipídica comprende mayoritariamente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, con menor proporción de fosfatidilinositol, fosfatidilserina o fosfatidilglicerol. Los ácidos grasos son de composición variable, entre 14 y 24 átomos de carbono destacando los C_{16} y C_{18} que pueden ser insaturados o bien presentar una o dos saturaciones. En cuanto a los esteroles, destaca el ergosterol, y en menor medida, el dehidroergosterol y zimosterol [56].

Las proteínas son muy variadas y modifican su composición relativa en respuesta a las necesidades de la célula. Entre las funciones de la membrana destaca el control de intercambios entre el medio interno y externo. La síntesis de glucanos y quitina se lleva a cabo en la membrana donde se encuentran enzimas como la quitina sintasa y la β-1,3 glucanasa. Finalmente, hay proteínas de la membrana que actúan como receptores, participando en la comunicación de la célula con su entorno.

El espacio periplásmico es una región delgada (35-45 Å), externa a la membrana plasmática y asociada a la pared celular. Principalmente contiene enzimas extracelulares segregadas (manoproteínas) que son incapaces de permear la pared celular, y ejercen funciones esenciales hidrolizando sustancias que no atraviesan la membrana plasmática. Tal es el caso de la β-frutofuronidasa (invertasa) y la fosfatasa ácida, las cuales tienen un largo componente de manano similar en estructura a los mananos de la pared celular [59].

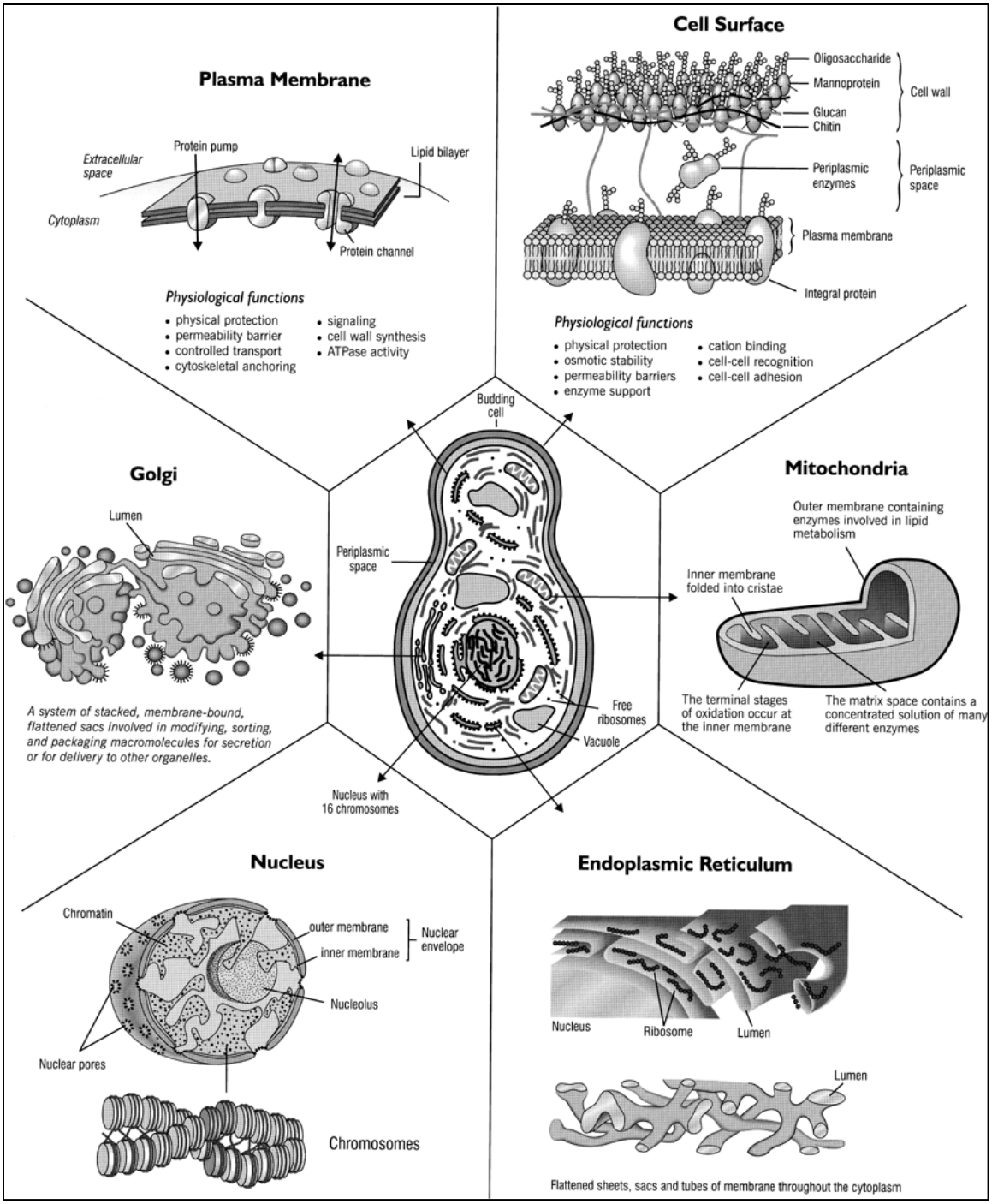


Figura 2-6. Representación esquemática de la levadura S. cerevisiae y de su compartimentalización subcelular [60]. La envuelta celular, que comprende la pared celular, el espacio periplásmico y la membrana plasmática, rodea y protege el citoplasma celular. La organización estructural en el interior de la célula, que contiene los orgánulos celulares, se mantiene con el citoesqueleto.

2.2.1.2 Pared celular. Composición y organización molecular

La pared celular de *S. cerevisiae* es una estructura rígida que envuelve a la célula y que representa aproximadamente el 30 % de su peso seco (figura 2-6). Entre sus funciones principales están la estabilización de las condiciones osmóticas internas, la protección frente a estrés físico, el mantenimiento de la forma celular, y permitir interacciones de tipo molecular tales como la unión sexual, la floculación y el factor *killer* [61]. Tiene la capacidad de modificar su estructura y composición para responder a las necesidades del organismo y a factores de tipo ambiental [62].

Está compuesta básicamente por polisacáridos (alrededor del 85 %) y proteínas (aproximadamente el 15 %) [63]. Análisis bioquímicos exhaustivos han indicado que los residuos de glucosa, N-acetilglucosamina y manosa representan el 80-90 %, 1-2 % y 10-20 % del total de polisacáridos, respectivamente. Estos residuos, junto a las proteínas, se organizan en los tres tipos principales de componentes de la pared: β-glucanos, manoproteínas y quitina. La parte interna de la pared de la célula está compuesta por cadenas de β-glucanos unidos entre sí por puentes de hidrógeno, donde se entrecruzan las manoproteínas, formando la capa más externa. La quitina, que representa porcentualmente una parte minoritaria, quedaría entre las fibras de glucano.

Los β-glucanos son polímeros de glucosa unidos por enlaces β-1,3 y β-1,6, que representan entre el 40 y 60 % del peso seco de la pared (tabla 2-3). Se pueden dividir en tres categorías según su composición y estructura [35]:

Glucano β-1,3 de tipo fibroso. Es altamente insoluble en agua, ácido acético y medio básico. Se encuentra poco ramificado, y cuando se presentan ramificaciones, se producen por enlaces β-1,6. En el microscopio electrónico se observa una estructura altamente fibrosa. Presenta conexiones con la quitina en sus extremos no reductores, con enlaces de tipo β-1,4, responsables de su estabilidad y de su insolubilidad en medio básico. Esta estructura sirve de esqueleto y asegura rigidez a la pared, ayudando a mantener su forma.

Glucano β-1,3 de tipo amorfo. También es insoluble en agua, pero puede solubilizarse en medio alcalino. Al igual que el fibroso, está poco ramificado y en el microscopio presenta un aspecto amorfo. Entre sus funciones estaría servir de reserva extraprotoplasmática, dar estabilidad a la célula y servir de sitio de anclaje a las manoproteínas. Ambos glucanos β-1,3 son cadenas largas con un grado de polimerización de 1500 unidades de glucosa/cadena.

Glucano β-1,6. De aspecto amorfo, es soluble en agua, está densamente ramificado y es más pequeño que los anteriores (150 unidades de glucosa/cadena). Estabiliza y conecta entre sí los elementos de la pared, formando uniones covalentes con el glucano β-1,3, quitina y con manoproteínas. Se obtiene a partir del glucano insoluble en medio básico, por extracción con ácido acético.

Las manoproteínas, también llamadas Proteínas de la Pared Celular (CWPs), constituyen entre el 30 – 50 % del peso seco de la pared celular (tabla 2-3). Colectivamente forman los mananos de levadura, la capa fibrosa más externa de la célula y que aparece más densa bajo el microscopio electrónico [64]. Se tratan de proteínas de diversas medidas (pesos moleculares entre 20 – 450 kDa), con un variado grado de glicosilación con manosa.

Las cadenas de manosa se pueden unir a las proteínas mediante enlace N-glucosídico y/o O-glucosidíco. El enlace de tipo N-glucosídico se forma entre un dímero de N-acetilglucosamina unido a un oligosacárido y un residuo de asparragina de la proteína, mientras que en el caso del enlace O-glucosídico son los grupos hidroxilo de los residuos de serina o treonina los que se unen a cadenas cortas de manosa [65]. Las cadenas polisacáridas de las proteínas N-glucosiladas son más largas y forman una estructura altamente ramificada que, junto con la presencia de puentes disulfuro entre las proteínas, son las responsables en parte de que la capa externa de mananos sea menos permeable a macromoléculas que la capa interna de glucanos [66]. Las cadenas unidas por enlace O-glucosídico, las cuales no son ramificadas y contienen la mayoría entre 4 o 5 residuos de manosa, son cortas en comparación con las N-glucosiladas. Sin embargo, el número de cadenas unidas por enlaces O-glucosídicos por proteína puede ser grande, por lo que la o-manosilación de las proteínas en *S. cerevisiae* es bastante significativa [67].

En *Saccharomyces cerevisiae*, al igual que en otras especies, la porción glucosídica de las manoproteínas no está compuesta exclusivamente por manosa y N-acetilglucosamina, sino también por oligosacáridos ácidos que contienen manosilfosfato, situados a final de las cadenas o uniendo dos manosas mediante un puente fosfodiéster (figura 2-7). Estos residuos confieren una carga negativa neta a la pared celular, cambiando las propiedades y el medio ambiente de la superficie celular [68].

Las manoproteínas pueden unirse de varias formas a los constituyentes de la pared. Aunque existen proteínas asociadas débilmente a la pared mediante enlaces no covalentes o través de puentes disulfuro con otros componentes, las principales se unen covalentemente estableciéndose dos tipos de proteínas según esta unión [62]:

Proteínas de la pared GPI-dependientes. Se anclan mediante un remanente de glicosil-fosfatidil inositol (GPI) unido covalentemente al extremo carboxilo de la proteína. La estructura básica de este remanente está formada por etanolamina, fosfato y un tetrámero de manosa, aunque puede ser sustituido con etanolamina y grupos fosfato adicionales (estructura 5 del apartado B de la figura 2-7) [69]. Las proteínas de la pared GPI-dependientes pueden estar unidas indirectamente a β-1,3 glucanos o a la quitina mediante un residuo β-1,6 glucano y el remanente GPI. En el genoma de *S. cerevisiae* entre 60 – 70 proteínas GPI han sido identificadas. Sobre 40 se destinan a la membrana plasmática, mientras que el resto forman parte de la pared. A menudo contienen regiones repetidas ricas en serina y treonina, por lo que forman enlaces o-glucosídicos con las cadenas de manosa.

Las proteínas GPI pueden agruparse en diferentes clases teniendo en cuenta sus funciones. Muchas de ellas tienen una función estructural, interaccionando con glucanos y otros componentes y colaborando en la resistencia de la pared, mientras que otras pueden actuar de enzimas, como glucanasas, fosfolipasas o proteasas. Varias proteínas GPI contienen un dominio, que se expone en la superficie celular y que media en la adhesión celular o la formación del biofilm. En esta última categoría se encuentran las floculinas y aglutininas sexuales [70]. Las proteínas GPI pueden aislarse de las paredes específicamente mediante

rotura del enlace fosfodiéster del remanente de GPI con fluoruro de hidrógeno-piridina o fosfodiesterasa [61].

Proteínas sensibles a medio alcalino. Están unidas directamente a β-1,3 glucanos a través de un enlace sensible a álcali. Dentro de este tipo de proteínas de pared se incluye la familia de las proteínas-*pir* (proteínas con repeticiones internas) [71]. En *S. cerevisiae* se han encontrado cuatro clases principales de proteínas *pir*, organizadas de manera similar, con un péptido señal N-terminal seguido de una región con 11 repeticiones ricas en serina y treonina, y un carboxilo terminal altamente conservado con cuatro residuos de cisteína. Mientras que las proteínas GPI-dependientes se encuentran en la zona más exterior de la pared, las proteínas-*pir* parecen estar distribuidas a través del esqueleto de β-1,3 glucanos, interconectando cadenas y contribuyendo a su rigidez [72]. Las proteínas-*pir* están enlazadas de forma múltiple con las cadenas de β-1,3 glucanos mediante un enlace éster entre un residuo de glutamina desaminada de la proteína y un grupo hidroxilo glucosídico (marcado como "X" en apartado A y estructura 4 del apartado B de la figura 2-7) [73]. Algunas proteínas GPI también tienen la estructura repetida *pir*, uniéndose a los β-1,3 glucanos mediante este tipo de enlace éster y contribuyendo a dar estabilidad estructural [61].

A parte de las proteínas-*pir*, hay otro grupo de proteínas que también se extraen en medio básico suave. Estas proteínas carecen de las repeticiones internas características de las proteínas-*pir*. No se conoce el tipo de enlace que establecen con los glucanos [71].

La quitina es un componente minoritario de la pared (tabla 2-3). Consiste en polímeros lineales de N-acetilglucosamina unidos por enlaces de tipo β-1,4, que se concentra sobre todo en las cicatrices de gemación y en el septum durante la reproducción. En la pared celular, entre el 40 y 50 % de las cadenas de quitina están conectadas con los extremos no reductores de β-1,3 glucanos vía enlace β-1,4 con el extremo reductor de la cadena de quitina [74]. La estructura cristalina de la quitina confiere resistencia a la pared celular [65].

Macromolécula	% en masa de pared celular	Grado de polimerización medio (kDa)
Manoproteínas	30 – 50	Altamente variable
β-1,6 glucanos	5 – 10	150
β-1,3 glucanos	30 – 45	1500
Quitina	1,5 - 6	120

Tabla 2-3. Macromoléculas de la pared celular de S. cerevisiae [61]. Los componentes de la pared se presentan en el orden en que se encuentran en la pared celular, desde el exterior al interior.

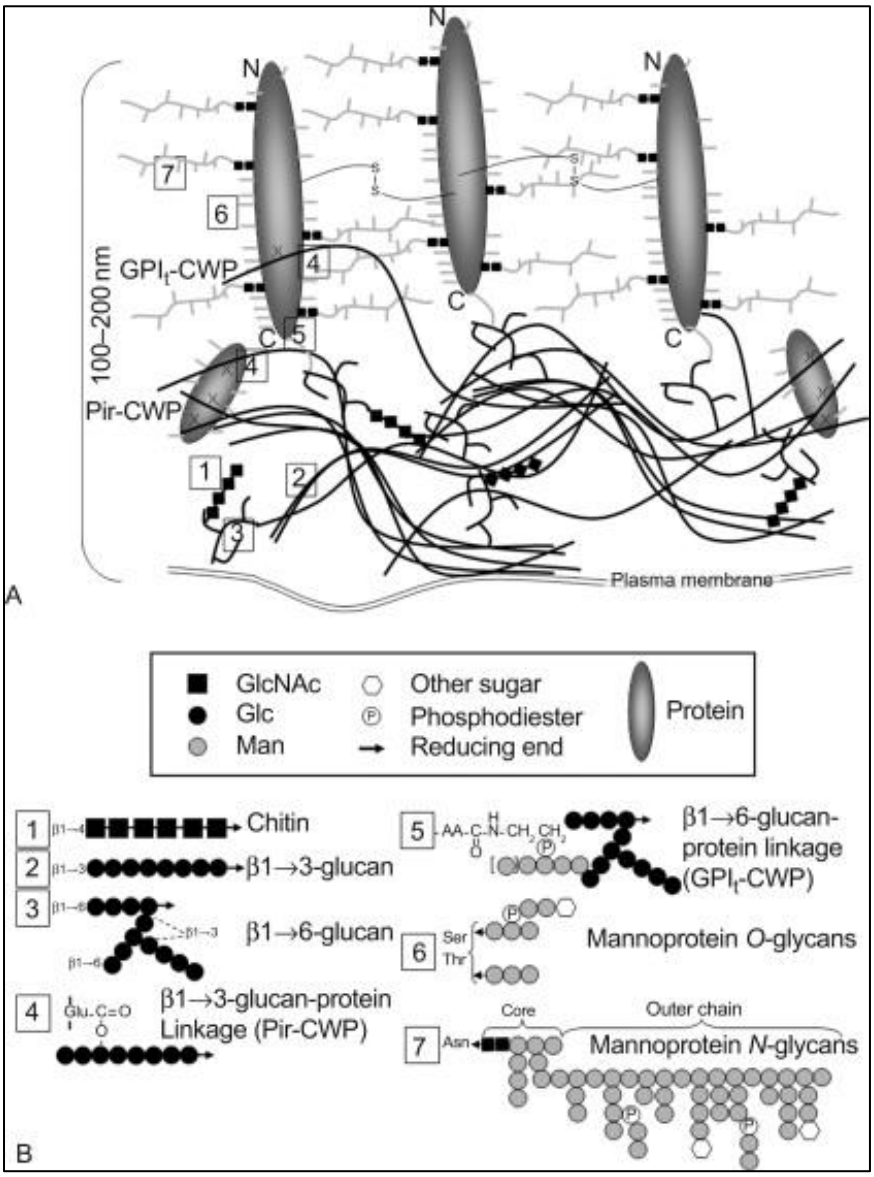


Figura 2-7. Representación de la superficie celular y sus componentes [75]. Disposición general de la superficie (A) y estructuras y enlaces básicos de glucanos y manoproteínas (B). Enlaces disulfuro (S); enlaces éster entre proteína y β-1,3 glucano (X).

2.2.2 Autolisis y envejecimiento *sur lie*

La composición química de las levaduras cambia durante el envejecimiento de los vinos espumosos, etapa en la que tiene lugar el proceso de autólisis. El término "autolisis" literalmente significa "autodestrucción"; supone la destrucción de los componentes celulares por los propios enzimas y está asociada a la muerte celular. En el proceso de autólisis, el medio vino se enriquece en compuestos provenientes de la célula.

2.2.2.1 Mecanismos de la autolisis

La autolisis es un término usado para describir las reacciones que ocurren en las levaduras no viables (células que han perdido su capacidad de multiplicarse) presentes en las lías. Se trata de un proceso lento e irreversible donde se hidrolizan los biopolímeros intracelulares por las endohidrolasas de la célula, formándose compuestos de bajo peso molecular [76]. La autolisis generalmente comienza al final de la fase de crecimiento estacionaria y normalmente está asociada a la muerte celular. Babayan [76] dividió el mecanismo de la autolisis en cuatro pasos:

1. En primer lugar, se degradan las endoestructuras celulares, liberándose proteasas de las vacuolas en el citoplasma.
2. En segundo, las proteasas liberadas son inicialmente inhibidas por inhibidores específicos celulares, pero se activan después cuando se degradan estos inhibidores.
3. Después se hidrolizan los polímeros intracelulares, acumulándose los productos de esta hidrólisis en el espacio interno de la pared.
4. Finalmente, los productos de la hidrólisis son cedidos al medio cuando sus masas moleculares son suficientemente pequeñas para atravesar los poros de la pared celular.

Aunque este mecanismo es válido para la mayoría de los procesos de autolisis, la autolisis natural es diferente de la autolisis inducida. La autolisis inducida se usa ampliamente en aplicaciones industriales para la producción de extracto de levaduras, enzimas, medios de

cultivo, etc. La autolisis en procesos industriales se induce mediante tratamientos físicos (aumento de temperatura, congelado y descongelado alternativo y presión osmótica), químicos (pH, detergentes, antibióticos), o biológicos (aireación y eliminación de nutrientes). El proceso autolítico industrial puede ser muy rápido, entre 48 y 72 horas, dependiendo del tratamiento. La autolisis natural, sin embargo, lleva mucho más tiempo. Esto es especialmente cierto en el caso de los vinos, en los cuales las condiciones de autolisis (pH entre 3 y 4, 15 ºC y la presencia de etanol), están lejos de las condiciones óptimas (45 ºC a pH 5).

CAMBIOS BIOQUÍMICOS DURANTE LA AUTOLISIS

La autolisis en la producción de los vinos espumosos generalmente comienza entre el segundo y el cuarto mes después de la finalización de la segunda fermentación [77], [78]. Las proteasas son las primeras enzimas en actuar al comienzo de la autolisis y también las más estudiadas. Los estudios de Luton [79] sugirieron la proteasa A (Saccharopepsin P07267) como principal enzima implicada en la proteólisis durante la autolisis en vinos modelo, siendo responsable del 80 % del nitrógeno cedido, a pesar de la gran cantidad de enzimas proteolíticos presentes en la levadura. Posteriormente, Alexandre [80] demostró que en vino la actividad de la proteasa A aumentaba 6 veces después del agotamiento de azúcares, pero disminuía al comienzo de la autolisis, no teniendo la actividad proteasa preponderante. Al pH del vino, la proteasa A activa otras proteasas, como la carboxipeptidasa, que sólo se ha detectado al comienzo del envejecimiento biológico en lías [81]. Probablemente, a parte de la proteasa A, otras proteasas ácidas que no se vean inhibidas por las condiciones de elaboración de los vinos también estén involucradas. En vinos espumosos, la actividad proteolítica es baja durante la fermentación y en los meses siguientes, mientras que, una vez superado este periodo (unos 9 meses), la actividad se incrementa drásticamente dependiendo de la cepa de levadura [82], [83].

Las glucanasas también actúan durante la autolisis degradando la pared celular. Las β-glucanasas clasificadas en endo- y exoglucanasas, hidrolizan los enlaces β-O-glucosídicos de las cadenas de β-glucanos cediendo al vino glucosa, oligosacáridos y manoproteínas.

Stefenon [10] evaluó la actividad enzimática de β-glucosidasa durante el envejecimiento *sur lie* de vinos espumosos, observando que ésta no cambiaba. No hay disponible más información ni de la cinética ni de la actividad de las β-glucanasas durante el proceso de autolisis en vino o de los parámetros enológicos que la afectan; la acción de estos enzimas se ha deducido de los compuestos cedidos al medio [84].

A parte de proteínas y glucanos, del mismo modo durante la autolisis se degradan ácidos nucleicos. El resultado de su hidrólisis son los mononucleótidos fosfato, oligonucleótidos, nucleósidos y bases, entre otros. Los estudios que han medido la degradación de los ácidos nucleicos en la levadura durante la autolisis se han realizado tanto en medios de cultivo [85], [86], como en condiciones enológicas [83]. En los estudios en medios de cultivo se encontró que el ADN era sólo parcialmente degradado, con unas disminuciones entre 35 y 55 %, mientras que el ARN lo era de manera mucho más extensa, con disminuciones superiores al 95 %. Tanto las enzimas involucradas en la degradación de los ácidos nucleicos como los productos de esta degradación, se vieron afectados por la temperatura y el pH. En condiciones enológicas, concretamente durante el envejecimiento de *champagne*, se han observado disminuciones mucho menores de los ácidos nucleicos, alrededor del 16 % del contenido, situándose estas diminuciones predominantemente durante los primeros 5 meses [83].

Los lípidos son el último tipo de compuestos celulares que también se degradan durante la autolisis. Piton [87] analizó los cambios en la fracción lipídica de levaduras con diferentes tiempos de envejecimiento en *Champagne*: en el momento del tiraje, a las 6 semanas y a los 19 años. En general, durante el envejecimiento se observó una disminución drástica en lípidos polares y una acumulación de lípidos neutros. Después de seis semanas de envejecimiento, los lípidos polares y los ácidos grasos libres disminuyeron en gran medida, mientras que los acilglicerolípidos (triacilgliceroles, diacilgliceroles y monoacilgliceroles) se incrementaron. Después de 19 años, se vio otra disminución de lípidos polares con una simultánea acumulación de ácidos grasos libres y una conversión de diacilgliceroles y monoacilgliceroles en triacilgliceroles, que se acumulan en grandes vesículas en el interior

celular. El contenido en lípidos polares, principalmente localizados en las membranas celulares, fue 6 veces inferior al encontrado en las células en el momento del tiraje. Teniendo en cuenta que la membrana citoplasmática permaneció inalterada, esta disminución probablemente estuviese relacionada con la destrucción de membranas de orgánulos.

CAMBIOS MORFOLÓGICOS

Los cambios morfológicos generales que acontecen en la levadura durante la autolisis son una disminución del tamaño, una degradación de la pared celular y una pérdida de contenido citoplasmático [87]–[89]. Estos procesos van acompañados con una consiguiente disminución del peso seco de la célula [81].

Los estudios de los cambios morfológicos de las levaduras durante la autolisis se han realizado tanto en medios artificiales, mediante autolisis inducida [76], [90], como en condiciones enológicas reales [87], [89]. La comparación de ambos tipos de estudios es difícil debido a las grandes diferencias entre las condiciones culturales y las de elaboración de vinos espumosos. A fin de correlacionar los periodos de incubación en medio artificial con los tiempos de envejecimiento *sur lie*, en el estudio de Martínez-Rodríguez [88] se compararon células de levadura en autolisis inducida en vino modelo y en autolisis real después de 12 meses de envejecimiento en vino espumoso. Utilizando microscopía de rastreo y criofractura, se pudo observar que las levaduras envejecidas en condiciones enológicas conservaban mayor contenido citoplasmático que las levaduras envejecidas por autolisis inducida. En la superficie celular de ambos tipos de levaduras autolisadas se observaron arrugas y surcos, aunque mayores en el caso de las levaduras envejecidas en condiciones reales (figura 2-8). Con sus resultados se constató que los medios sintéticos difícilmente pueden igualar el ritmo de autolisis real, que ocurre a una velocidad mucho más baja.

La información más detallada que se tiene sobre la ultraestructura de las levaduras durante el envejecimiento *sur lie* de vinos espumosos es la proporcionada por los estudios de Piton [87] y los de Tudela [89]. En el estudio llevado a cabo por Piton [87] se analizaron los

cambios que se producen en levaduras de *Champagne* mediante el uso de microscopía de transmisión.

Una vez se pudo considerar que ya no existían células viables (después de 6 semanas de la inoculación), las vesículas con lípidos aumentaron de tamaño, los orgánulos endomembranosos (retículo endoplasmático) se redujeron y no se observaron mitocondrias. A partir del tercer mes, todas las células estaban plasmolizadas y la membrana se encontraba claramente separada de la pared. Antes de los 6 meses ya había comenzado la transformación de las paredes de levadura mediante la desaparición de la capa interna. Entre los 8 y los 11 años, los mananos de la capa externa también fueron atacados. La degradación continuó muy lentamente hasta los 15 años, donde todavía se mantenía la estructura, pero altamente degradada. En el citoplasma, la doble membrana plasmática y las grandes vesículas lipídicas son las únicas estructuras que permanecieron después de 15 años.

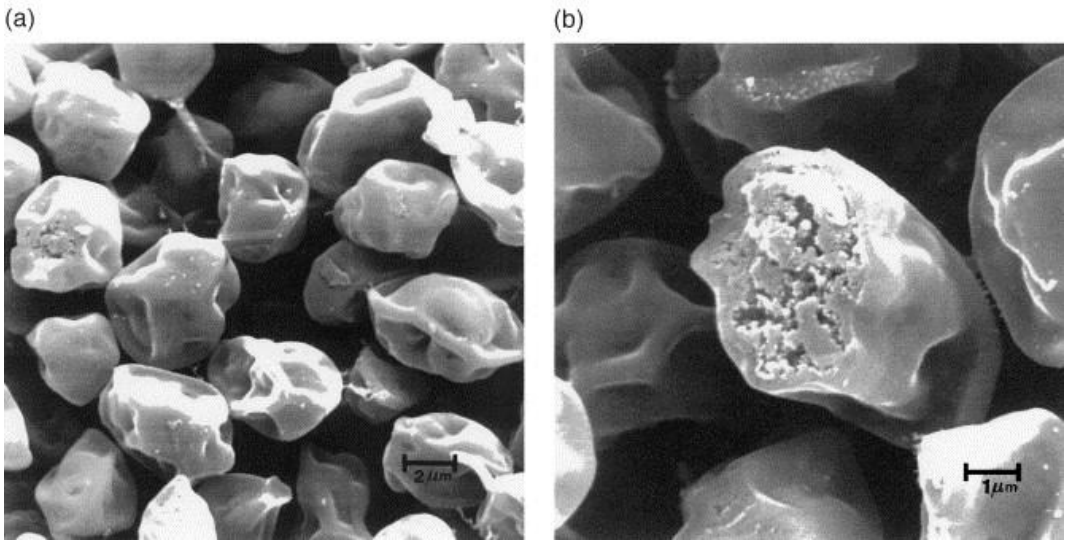


Figura 2-8. Imágenes de microscopía electrónica de baja temperatura de las células de levadura que han estado en envejecimiento sur lie durante 12 meses [88]. (a) Ultraestructura superficial. (b) Imágenes de levaduras fracturadas.

En el trabajo de Tudela [89] se estudiaron los cambios ultraestructurales y la degradación celular de levaduras envejecidas en tres series de vinos espumosos durante 4 años mediante microscopía de transmisión electrónica. Después de 1 mes de fermentación en botella, las levaduras alcanzaron la fase estacionaria. Seguían siendo similares en

apariencia a las del cultivo inicial, aunque se observaron por primera vez evidencias de autofagia en las vesículas celulares. A los 9 meses en envejecimiento, la mayoría de las células ya estaban plasmolizadas, con la membrana plasmática separada de la pared. La técnica de enfriamiento a alta presión utilizada permitió observar que la capa interna de la pared celular consistía a su vez en dos capas: una capa fibrosa interior y otra capa amorfa situada en la zona intermedia de la pared (figura 2-9). Después de 18 meses de envejecimiento, la capa fibrosa apareció más difusa y la zona intermedia degradada, diferenciándose mucho menos entre sí. A partir de los 30 meses, las paredes consistían en una estructura enmarañada de fibras. También en este estudio las paredes de levadura mantuvieron su integridad durante los 4 años de envejecimiento de los vinos.

La evolución de las paredes celulares fue globalmente más homogénea que los cambios en el contenido citoplasmático de las células con el mismo tiempo de envejecimiento, por lo que fue más difícil establecer una secuencia temporal en este caso. Después de 9 meses de envejecimiento, podían observarse profundas invaginaciones y algunas roturas en la membrana plasmática, aunque su ultraestructura se conservó a lo largo de los 4 años. Como en estudios anteriores, la autolisis se acompañó de grandes pérdidas y extensiva desorganización del citoplasma, encontrándose fragmentos de doble capa lipídica de membranas de orgánulos en el citoplasma (figura 2-10). La degradación del contenido interno de la célula fue un proceso que se extendió durante todo el envejecimiento, estando todavía incompleto después de 4 años, lo que coincidió con los resultados de Piton [87].

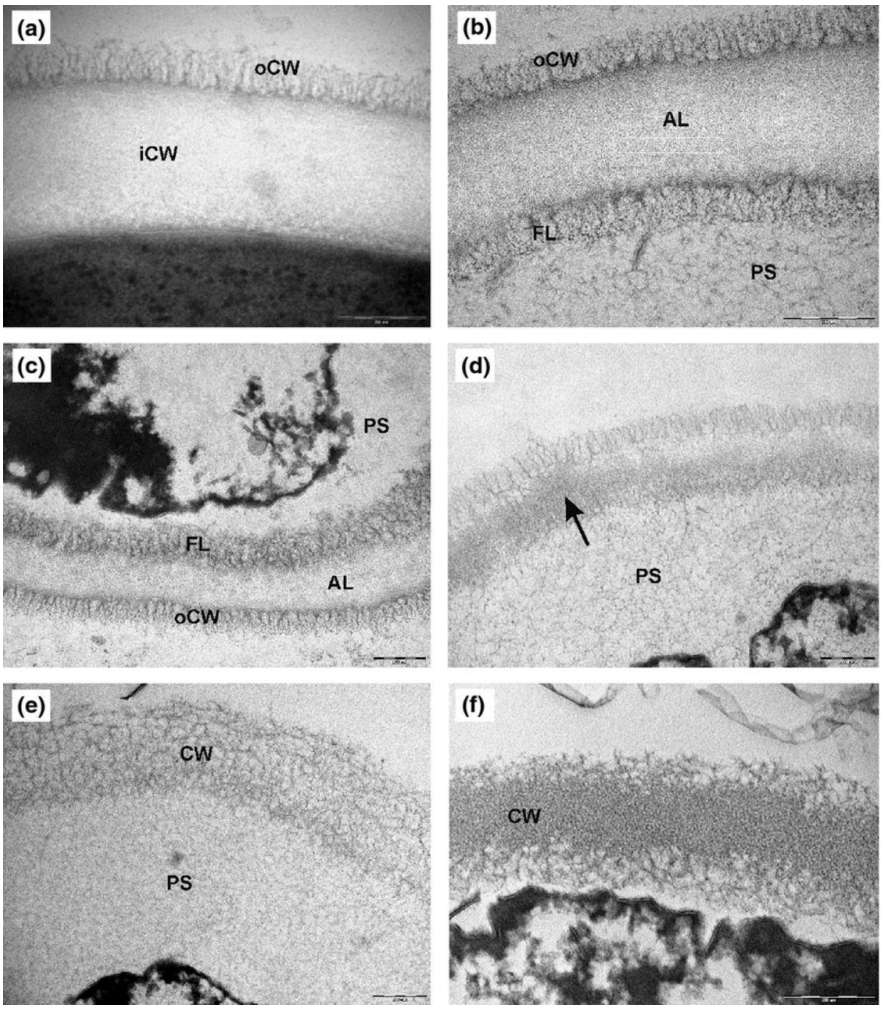


Figura 2-9. Ampliaciones de secciones ultrafinas de paredes celulares de Saccharomyces cerevisiae recolectadas a 1 mes (a), 9 meses (b), 13 meses (c), 18 meses (d), 30 meses (e), y 48 meses (f) de envejecimiento. Códigos: oCW= pared celular externa; iCW=pared celular interna; PS=espacio periplasmático; FL=capa fibrosa; AM=matriz amorfa. Barras: 200 nm. [89].

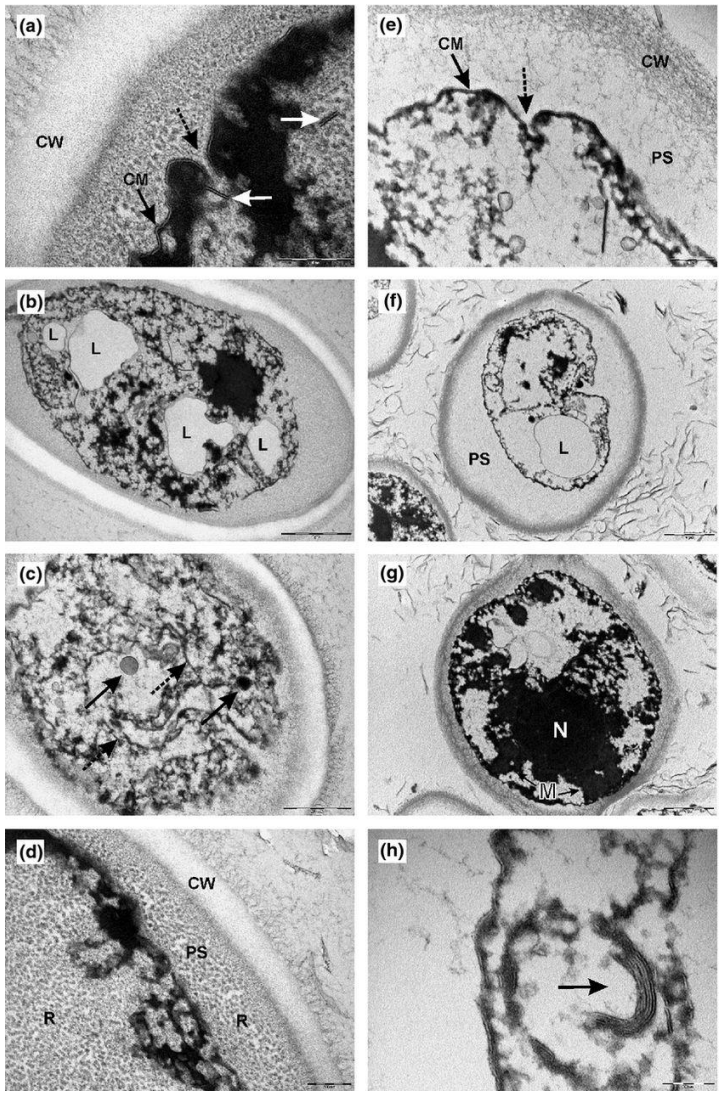


Figura 2-10. Secciones ultrafinas de Saccharomyces cerevisiae mostrando diferentes estadios de autolisis después de 9 meses (a-d) y 48 meses (e-h). Células de la misma muestra muestran diferentes grados de autolisis. Códigos: CW= pared celular; PS=espacio periplasmático; CM=membrana citoplasmática; L=vesículas lipídicas; R=ribosomas; N=núcleo. Barras: (a) 200 nm, (b) 1 µm, (c) 500 nm, (d) 200 nm, (e) 200 nm, (f) 1 µm, (g) 1 µm, (h) 100 nm [89].

2.2.2.2 Productos de la autolisis cedidos al vino

Después de la caída en la viabilidad celular, la autolisis de las levaduras implica que se cedan al medio vino productos de degradación provenientes de la célula. Estos compuestos son esencialmente compuestos nitrogenados como aminoácidos, oligopéptidos y polipéptidos, pero también polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos. La cesión de estos compuestos contribuye a las características organolépticas y físicoquímicas de los vinos espumosos. Los productos de la autolisis pueden ser de dos tipos: 1) los primarios de la autolisis, los cuales actúan directamente en el vino, y 2) los productos de reacciones secundarias con otros componentes del vino.

SUSTANCIAS NITROGENADAS

Las sustancias nitrogenadas se consideran generalmente los productos mayores de la autolisis. Los estudios de estas sustancias durante la autolisis muestran que se ceden primero proteínas y péptidos, y que éstos son hidrolizados extracelularmente para dar aminoácidos libres [91]–[93]. Moreno-Arribas [93] estudió la evolución de las diferentes fracciones nitrogenadas durante el envejecimiento de un vino espumoso elaborado mediante el método tradicional. Entre los 3 y los 9 meses después del tiraje, no se observaron diferencias en la concentración de aminoácidos libres. A partir de los 9 meses, su concentración aumentó.

El contenido en péptidos fluctúa durante el envejecimiento, alcanzando un máximo después de 12 a 15 meses de envejecimiento, para después disminuir. La cantidad de péptidos cedidos durante la autolisis de la levadura es muy variable y depende de la variedad y el tiempo de envejecimiento [93]. La naturaleza de los péptidos también cambia con el tiempo de envejecimiento, disminuyendo su tamaño a lo largo de éste [91]. Se ha demostrado que el origen de estos péptidos está en la levadura, existiendo una mayor presencia los aminoácidos treonina y serina en ellos, los cuales están envueltos en las uniones glicosídicas entre proteínas y mananos de la pared celular [62].

La evolución del contenido en proteínas durante la autolisis parece depender de la cepa de levadura. Leroy [83] comparó dos cepas diferentes de levadura y encontró que el

contenido en proteínas permanecía estable durante los primeros 9 meses de envejecimiento para una cepa, mientras que para otra el contenido en proteínas disminuía en gran medida desde el final de la segunda fermentación. Un estudio similar llevado a cabo por Nunez [94] mostró que los niveles de proteínas y polipéptidos se incrementaban durante los primeros tres meses y después disminuían, lo que se atribuyó a la actividad proteasa. El contenido en proteínas y péptidos se incrementó entonces de nuevo después de 6 meses. Por otra parte, los resultados de Todd [78] mostraron que la concentración de proteínas era estable durante 90 días después de la fermentación secundaria, y se incrementaba ligeramente después, entre el 8 y el 13 %.

El enriquecimiento en compuestos nitrogenados es importante para que los vinos espumosos alcancen sus características particulares. De esta manera, el enriquecimiento en aminoácidos está relacionado con el potencial aromático, ya que algunos aminoácidos actúan de precursores de compuestos volátiles [82]. En cuanto a los péptidos, tienen sabores dulces y amargos, y sus propiedades sulfactantes se cree que pueden tener un papel importante en los vinos espumosos. Por otra parte, la hidrofobicidad de ciertos péptidos puede influir en las propiedades de la espuma [95].

POLISACÁRIDOS

Los polisacáridos cedidos debido a la acción de las glucanasas pero también de las proteasas, son el otro grupo de compuestos mayoritarios de la autolisis. Estas macromoléculas contienen principalmente glucosa (74 %) y manosa (26 %). Los mananos de la pared celular son cedidos sin hidrólisis previa, mientras que los glucanos se hidrolizan en cadenas cortas o monómeros [81].

El análisis de la glucosa y de la manosa en vinos espumosos se puede utilizar para estimar los glucanos y los mananos cedidos durante el envejecimiento [96]. De esta manera, Martínez-Lapuente [97] encontró que el contenido en manosa se incrementaba durante los 6 primeros meses de envejecimiento en botella, mientras que el contenido en glucosa se incrementaba sólo entre el tercer y sexto mes. Este hecho puede ser debido a que las

manoproteínas están atrapadas o ligadas en la superficie del esqueleto de glucanos (véase apartado 2.2.1.2), lo que implica que son cedidas en primer lugar. El contenido en glucanos y mananos se mantienen constantes o decrecen gradualmente después de 6 meses de envejecimiento, por lo que su contenido final en algunos casos es menor que en el vino base correspondiente. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Moreno-Arribas [97] y Andrés-Lacueva [98], que observaron un aumento de polisacáridos ácidos y neutros a partir de los 15 meses de envejecimiento. Estas diferencias pueden ser debidas a fenómenos de precipitación de los polisacáridos con otros componentes del vino, formándose coloides inestables.

Las manoproteínas y los peptidomananos tienen un efecto significativo en las cualidades sensoriales de los vinos espumosos, particularmente en el tamaño y persistencia de las burbujas [77]. Además, se ha visto que la cesión de manoproteínas tiene un efecto positivo en la estabilidad de los vinos.

ÁCIDOS NUCLEICOS

La hidrólisis de los ácidos nucleicos durante el envejecimiento en lías de los vinos espumosos ha sido menos investigada que la hidrólisis de las proteínas. Uno de los intereses de su estudio es que algunos nucleótidos actúan como potenciadores del sabor, en concreto los 5'-nucleótidos. Durante el envejecimiento del *champagne*, Leroy [83] reportó un incremento muy importante en la concentración total de ácidos nucleicos, lo cual se correlacionaba con la disminución de los mismos en la levadura durante el primer año de envejecimiento [83]. Las medidas de los ácidos nucleicos se realizaron mediante espectrofotometría, por lo que esos niveles totales deben de tomarse con precaución ya que los nucleótidos en el vino están presentes como mezclas complejas con ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, péptidos, etc. [99]. Posteriormente, Aussenac [100] desarrolló un método para identificar y cuantificar inequívocamente mononucleótidos fosfato en vino espumoso. Mediante ese método, Charpentier [101] analizó los nucleótidos y nucleósidos cedidos durante el envejecimiento de *champagne*, observando que la concentración máxima de nucleótidos totales era muy baja, con un máximo de 3 mg/L en vinos envejecidos durante

9 años. En vinos jóvenes el nucleótido más importante fue el 5'-UMP, pero después de 2 años su concentración disminuyó y aumentó lentamente la de 5'-GMP.

Recientemente, Tudela [102] ha reportado la evolución de los catabolitos del ARN durante el envejecimiento en lías de vinos espumosos cava. La uridina fue el nucleósido más abundante, y su contenido se incrementó con el envejecimiento. Las purinas parecen tener un origen fermentativo, siendo la xantina el más abundante. Comparando vinos cava envejecidos con lías y sin lías, se pudo comprobar que, en ausencia de lías, los catabolitos permanecían inalterables, enfatizando el importante papel de las lías en el envejecimiento de los vinos espumosos.

LÍPIDOS

Los lípidos son importantes componentes de los vinos espumosos porque constituyen un gran reservorio de aromas y contribuyen a la estabilidad de la espuma. Durante la segunda fermentación y el envejecimiento en botella se incrementa el contenido lipídico [87], [103]. Se ha observado que durante la segunda fermentación del *champagne* (5 semanas en botella), la levadura cede triacilgliceroles al vino, los cuales se oxidan y degradan a diacilgliceroles, que posteriormente se vuelven a degradar, al igual que los ácidos grasos libres [103]. Los estudios que se han hecho sobre la evolución de los lípidos durante la autolisis han sido en vino modelo y en condiciones aceleradoras [104]. Los niveles de triacilgliceroles, 1,3-diacilgliceroles, 2-monoacilgliceroles, ácidos grasos libres y esteroles se incrementaron después de 2 días de autolisis, para disminuir después, probablemente debido a la acción de enzimas hidrolíticos. No se cedieron fosfolípidos al medio, lo cual está en concordancia con resultados anteriores [87], [90].

2.2.2.3 Derivados comerciales de levadura para incrementar los productos de la autolisis

Los productos cedidos durante el envejecimiento *sur lie* tienen un favorable efecto en la estabilidad y la calidad de los vinos, pero es un proceso lento y caro. En los últimos años se han desarrollado toda una serie de derivados comerciales de levadura que incrementan la cantidad presente de estos productos durante el envejecimiento. Como los derivados de

levadura habituales que se utilizan en la industria alimentaria no son apropiados para su aplicación en la elaboración de vinos, se ha tenido que desarrollar una tecnología específica para su obtención. Los derivados de levadura para enología se obtienen de cepas de *S. cerevisiae* enológicas mediante procesos autolíticos, plasmolíticos o hidrolíticos, secándose posteriormente para dar las fórmulas comerciales. Algunos de ellos se han formulado específicamente para vinos espumosos. Estos productos se venden bajo diferentes nombres (paredes de levadura, estabilizador tartárico, potenciador del aroma, etc.), y su composición no se conoce siempre, siendo a veces mezcla de diferentes productos [105]. Sin embargo, pueden clasificarse en cuatro grupos [106]:

Levaduras inactivas obtenidas mediante inactivación térmica

Se utilizan como reserva de nutrientes para las levaduras, para reducir la astringencia mediante reacción con taninos, para mejorar el *mouthfeel* de los vinos, para estabilizar el color de vinos tintos y para prevenir la oxidación prematura de vinos blancos. Las levaduras inactivas ceden esteroles y polisacáridos específicos de la pared.

Autolisados y extractos de levadura

Los autolisados se obtienen por inactivación térmica y por un proceso de incubación, en el que los enzimas se ceden de las vacuolas para degradar el contenido intracelular. Los extractos consisten en el extracto soluble después de la total degradación del contenido citoplasmático. Los extractos y autolisados de levadura proporcionan nitrógeno, proteínas, aminoácidos y polisacáridos, acelerando la maduración de vinos espumosos y mejorando la calidad aromática y la efervescencia [107].

Manoproteínas de levadura

Se extraen mediante tratamiento térmico o por tratamiento enzimático con β-1,3 glucanasa o β-1,6 glucanasa. Se han descrito las siguientes funciones para las manoproteínas: reducción de la astringencia y el amargor [108]; potenciadores del aroma [109]; inhibidores de la cristalización de tartratos y estabilizadores de las proteínas del vino [110].

PAREDES DE LEVADURA

Se trata del componente insoluble de la levadura formado por las paredes, sin el contenido citoplasmático. Constituye un potenciador de la calidad del vino similar a las manoproteínas, que puede eliminar compuestos indeseables del vino y que contribuye a la estabilidad tartárica y coloidal.

2.2.3 Las lías como subproducto

Las lías del vino son definidas por el reglamento EEC nº 337/79 como "el residuo formado en el fondo de los recipientes que contienen vino, después de la fermentación, durante el almacenamiento o después de tratamientos autorizados, así como el residuo obtenido después de la filtración o la centrifugación de este producto".

Pocos estudios han descrito la composición exacta de las levaduras el vino, que es muy variable dada la diversidad de vinos con sus respectivas levaduras y su diferente evolución con el tiempo. En términos generales, las lías contienen como promedio un 25 % de residuo seco, el cual se compone de [81]:

- 25 a 35 % sales de ácido tartárico,
- 35 a 45 % microorganismos (predominantemente levaduras),
- 30 a 40 % de residuos orgánicos.

Existen varias publicaciones donde se analizan lías y otros subproductos vinícolas desde un punto de vista agronómico. Bustamante [111] realizó un estudio sobre la composición de lías provenientes de 12 bodegas diferentes repartidas por todo el territorio español. Las principales características analíticas de las lías como residuo agronómico fueron unos valores de pH entre 3 y 7, una conductividad eléctrica entre 4 y 13,8 dS/m, una cantidad de materia orgánica entre 60 y 90 % (peso seco), y una cantidad de nitrógeno total entre 1,7 y 6 % (en peso seco). En comparación con otros residuos vitivinícolas, Bustamante también encontró en lías altos valores de fósforo, cobre y potasio [111].

La composición de las lías depende enormemente de si son de vino tinto o de vino blanco. En la figura 2-11 puede verse un esquema de ambos tipos de vinificación y de los subproductos que se obtienen. La diferencia más importante reside en que en la vinificación en tinto se fermenta el mosto en contacto con hollejos y pepitas, mientras que en la vinificación en blanco el mosto se extrae y separa antes de la fermentación [112]. Esto implica que las lías de vino tinto contienen parte de estos hollejos y pepitas (figura 2-12).

Además del tipo de vinificación, la composición de las lías depende también en el número de decantaciones realizadas. Bustos [113] encontró que los contenidos en sólidos totales, cenizas, nitrógeno y carbono fueron generalmente mayores en las lías de primer decantado que en las de segundo, debido a que las primeras contienen más levaduras muertas y sólidos en suspensión (junto a otros microorganismos y materia orgánica). También encontró mayores concentraciones de metales (cobre, magnesio, hierro, manganeso, calcio, aluminio y zinc) en las lías de vinos tintos que en las obtenidas de vinos blancos, probablemente debido al contacto del mosto en fermentación con los hollejos de uva.

Figura 2-11. Diagrama de elaboración de vinos blancos y tintos donde se indican los puntos en los que se eliminan lías (adaptado de [114]).

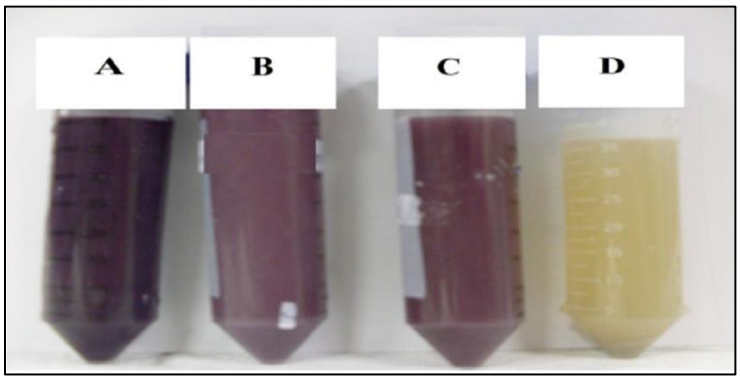


Figura 2-12. Imagen donde se muestran lías de vino tinto de las variedades morada (A), Cabernet sauvignon (B), Cabernet franc (C) y de vino blanco de la variedad Lorena (D) [115].

Como ya se indicó anteriormente, las lías también contienen compuestos fenólicos procedentes del vino. Hay pocas publicaciones en relación a este contenido ya que la mayoría se centran en los compuestos fenólicos que se pueden extraer de hollejos y pepitas de la vinificación [116]–[118], que se comercializan como nutraceúticos [119].

Las lías contienen polifenoles tanto en el vino residual y residuos de la uva como absorbidos en su superficie. De esta manera, las paredes celulares de la levadura han demostrado su capacidad de retención de derivados de flavanoles y de productos generados de la condensación fenólica y la oxidación de vinos blancos [120]. En el caso de los vinos tintos, las lías provenientes del envejecimiento retienen taninos condensados y antocianos [28], [29]. También los esteroles de membrana están relacionados con la habilidad de la levadura de absorber compuestos fenólicos, además de compuestos incoloros intermedios de reacciones de pardeamiento [121].

Alonso [122] analizó el contenido en polifenoles de varios subproductos de la vinificación, entre ellos lías de vinos tintos y blancos. En la tabla 2-4 pueden verse los resultados para las diferentes variedades; las lías de vinos tintos (Syrah, Tempranillo y Cabernet Sauvignon) contienen en general mayor cantidad de polifenoles totales que las de variedades blancas (Moscatel y Palomino fino). Las lías obtenidas de la variedad Syrah destacan frente a las demás, tanto en contenido total como individual de polifenoles. Los hidroxicinámicos son el grupo de polifenoles que predominan en todas las variedades. Pérez-Serradilla [123] también estudió el contenido en polifenoles de lías recuperadas de vinos Syrah, optimizando su extracción mediante microondas y su secado por *spray-drying*, a fin de minimizar la oxidación de compuestos fenólicos y mejorar el rendimiento del proceso. Se analizaron los fenoles más representativos en los subproductos de la uva, encontrándose como antociano más abundante el malvidín-3-glucósido, y destacando entre los flavonoles la miricetina, la quercetina y la quercetina-3-glucósido, en concentraciones similares a las obtenidas previamente en semillas de uva (tabla 2-5). Al igual que ocurre con los resultados de Alonso, los polifenoles totales determinados por espectrofotometría son muy superiores a la suma de los identificados por HPLC, lo cual puede deberse a la unión de antocianinas a

otras moléculas formando derivados de alto peso molecular, los cuales son retenidos en las filtraciones previas al análisis por HPLC [116].

	Syrah	Tempranillo	C. Sauvignon	Moscatel	Palomino
Polifenoles totales	2000	1000	750	900	200
Tirosol				2,09	
Catequina	1,36				
Ácido vainíllico	2,93				
Ácido siríngico	3,22		1,47		
Isovainillina	1				
Ácido caftárico	6,23			0,95	
Ácido cis-coutárico				0,36	
Ácido trans-coutárico	1,93				
Ácido clorogénico	0,59				2,63
Ácido cafeico	11,59			3,86	
Ácido cis-p-coumárico	0,38				
Siringaldeido	0,54	0,48			
Ácido trans-p-coumárico	2,87	0,3			
Ácido ferúlico	0,44	0,56	0,49		

Tabla 2-4. Contenido de polifenoles en lías (mg/L). Polifenoles totales en mg GAE/L [122].

	Concentración en el extracto seco
Polifenoles totales	36,4[a]
Antocianos	
Malvidín-3-glucósido	91[b]
Cm-Mv3G	11729[c]
Otros	
Miricetina	4292[d]
Quercetina	13656[b]
Quercetina-3-b-glucosido	8900[b]
Ácido cafeico	663[b]
Ácido p-Coumárico	2449[b]
Total	4,18[d]

Tabla 2-5. Resultados del análisis de extracto seco de levadura en polvo [123]. [a] mg GAE por 100 mg de extracto de levadura en polvo. [b] µg del correspondiente estándar por gramo de extracto de levadura en polvo. [c] µg de Malvidín-3-glucósido por gramo de extracto de levadura en polvo. [d] mg de fenoles identificados por HPLC por 100 mg de extracto de levadura en polvo.

2.2.4 Las lías como agente antioxidante

Las lías pueden contener sustancias antioxidantes propias de la levadura, tanto en su citoplasma como en su pared. Además, también tienen la capacidad de retener algunos compuestos del vino con potencial antioxidante, principalmente polifenoles. Varios estudios han indicado que las lías durante el envejecimiento de los vinos espumosos protegen a estos del pardeamiento, proceso relacionado con la oxidación de ciertos componentes. Esto implica que las lías podrían actuar como antioxidantes durante este proceso.

2.2.4.1 Acción de enzimas y biomoléculas del citoplasma

Las levaduras tienen toda una serie de elementos de defensa antioxidante, enzimáticos y no enzimáticos, que se encuentran en el citoplasma y cuya función es mantener la integridad de los componentes celulares frente al daño por radicales libres. Entre las enzimas antioxidantes más importantes se encuentra las catalasas, las superóxido dismutasas, y las peroxidasas [124]. Las catalasas reducen el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno molecular. Existen dos tipos: catalasa A, localizada en los peroxisomas, y catalasa T, localizada en el citoplasma. La levadura también tiene dos tipos de superóxido dismutasas (SOD): la MnSOD y la Cu/ZnSOD. Ambas se encuentran en el citoplasma y su función es desproporcionar el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno. Las peroxidasas principales son las glutatión peroxidasas, que catalizan la reducción de hidroperóxidos utilizando el glutatión, y la tioredoxina peroxidasas, algunas localizadas en los peroxisomas, que reducen peróxido de hidrógeno y peróxidos de alquilo [125].

Las defensas antioxidantes no enzimáticas de la levadura a menudo consisten en pequeñas moléculas solubles en agua o en lípidos, que actúan neutralizando radicales libres. Entre los componentes no enzimáticos antioxidantes de la levadura tenemos los siguientes:

GLUTATIÓN

El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina (γ-L-glutamil-Lcistinilglicina). GSH reacciona por su grupo sulfidrilo con los oxidantes para

producir glutatión reducido (GSSG). El glutatión es una sustancia antioxidante muy importante en las levaduras, representando alrededor del 1 % de su peso seco [126]. En *S. cerevisiae*, el glutatión también puede usarse como fuente de nitrógeno y azufre en condiciones de depleción de nutrientes [126], [127].

Fitoquelatinas

Las fitoquelatinas son péptidos con la estructura (γ-glutamilcisteina)n-glicina capaces de quelar iones metálicos. *S. cerevisiae* las sintetiza bajo exposición a metales pesados [128].

Poliaminas

Las poliaminas son derivados de aminoácidos también implicados en la protección de las levaduras frente al estrés oxidativo. Se ha encontrado que la espermina y la espermidina son esenciales durante el crecimiento aeróbico de *S. cerevisiae* [129].

Ácido eritroascórbico

Aunque bajo ciertas condiciones *S. cerevisiae* puede sintetizar ácido L-ascórbico, en condiciones normales sintetiza ácido eritroascórbico, con propiedades antioxidantes similares al anterior [39].

Proteínas ricas en cisteína

Hay varios tipos de proteínas ricas en cisteína en la levadura que pueden actuar como antioxidantes. Entre ellas tenemos las metalotioneínas, capaces de unirse a diferentes iones metálicos [130], la glutaredoxina, que actúa en combinación con la ribonucleótido reductasa [131], y la tioredoxina, que la utiliza como reductor la enzima tioredoxina peroxidasa y también la ribonucleótido reductasa.

Santiago [124] examinó la actividad antioxidante de la fracción enzimática y no enzimática de un homogenado de *S. cerevisiae***.** Algunos de los métodos utilizados fueron los habituales para alimentos: DPPH, radical hidroxilo y radical superóxido. Sus resultados

mostraron que entre el 85 y 95 % de la actividad antioxidante del homogenado de levadura estaba en los compuestos no enzimáticos. Por lo tanto, estos componentes serían más determinantes en la actividad antioxidante de la levadura como aditivo antioxidante, mientras que en condiciones biológicas los enzimas también jugarían un papel muy importante.

Las lías de segunda fermentación una vez que dejan de ser viables, podrían contener enzimas u otras sustancias en su citoplasma con potencial antioxidante. De esta manera, el papel protector de las lías podría venir en parte de estos componentes [132]. Para ello sería necesario que la parte intracelular entrara en contacto con la parte extracelular, pero como ya se indicó en el apartado anterior, la pared celular mantiene su integridad durante largos periodos de envejecimiento, limitando la salida de componentes. Serían necesarios nuevos estudios que determinasen la evolución de los componentes antioxidantes del citoplasma, enzimáticos y no enzimáticos, durante el envejecimiento *sur lie* de los vinos.

2.2.4.2 Acción de lípidos de membrana

La composición de la membrana lipídica de *S. cerevisiae* es importante para conferir a la célula resistencia al estrés oxidativo, de manera que una cantidad mayor de ácidos grasos saturados protege mejor frente a la oxidación que altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados.

Las lías en el vino pueden ejercer una actividad antioxidante mediante el consumo de oxígeno disuelto [133]. El impacto de la membrana plasmática sobre este consumo fue estudiado por Salmon [134] en vino modelo. Las modificaciones de la membrana se evaluaron mediante la determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS), y por análisis indirectos de los cambios de la composición de la doble capa lipídica. Parece que los lípidos de membrana y los constituyentes de las lipoproteínas se alteran reaccionando con el oxígeno disuelto en el vino [134].

El efecto protector de la membrana frente a la oxidación tiene algunos detalles que merecen aclararse. En primer lugar, aunque existe correlación entre la aparición de ROS en

la célula y la desaparición de oxígeno disuelto en el vino, no tiene por qué ser un mecanismo único [132]. Otros elementos, constitucionales de la pared o absorbidos, como los polifenoles, podrían actuar también de antioxidantes superficiales. Por otra parte, los peróxidos generados durante la oxidación de los lípidos podrían oxidar a su vez a los componentes del vino, no actuando como antioxidantes propiamente dichos.

2.2.4.3 Acción de elementos constitucionales o absorbidos por la pared

La pared de *S. cerevisiae* contiene elementos, como glucanos y manoproteínas, que pueden ejercer actividad antioxidante [135], [136]. Jaehring [136] llevó a cabo estudios donde se fraccionaban sistemáticamente las paredes celulares de levadura recuperada de la fabricación de cerveza mediante procedimientos enzimáticos y fisicoquímicos. Las fracciones proteínicas fueron las que claramente mostraban más capacidad antioxidante. Posteriormente, los mismo autores realizaron otro estudio [135] donde se evaluaba específicamente el papel antioxidante de los glucanos y cómo cambia según las condiciones de crecimiento del medio. De esta manera, se pudo observar la influencia del medio de cultivo en la composición y la actividad antioxidante de la pared.

Otra propiedad de las paredes de levadura es que pueden absorber compuestos en su superficie. Esta capacidad se ha observado para aromas [137], compuestos pardos [120], y polifenoles [138], como ya se indicó en un apartado anterior. Los polifenoles son compuestos que han demostrado ser antioxidantes, por lo que, absorbidos en la superficie celular, modificarían su capacidad antioxidante.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Experimenta despacio que tengo prisa.
-Napoleón Bonaparte. Adaptación -

3.1 VINOS ESPUMOSOS

3.1.1 Diseño experimental y muestreo

Los vinos espumosos analizados fueron elaborados industrialmente por la empresa Freixenet S.A. mediante el método tradicional y el método Charmat. Se partió de dos cupajes diferentes (A y B) de vinos blancos de las variedades de uva Macabeu, Xarel·lo y Parellada, que para el cava fueron embotellados después de la adición del licor de tiraje y para el Charmat fueron depositados en el autoclave, previa dosificación del jarabe y del pie de cuba. Para el estudio de la capacidad antioxidante a lo largo de la rima, se tomaron de cada cupaje tres botellas de cava a los siguientes tiempos de envejecimiento: 1 semana, 1, 3, 6, 9, 12, 17, 21 y 30 meses, y tres muestras de Charmat en los tiempos de envejecimiento: 1 semana, 1, 3, 6, 9, 12 y 17 meses (figura 3-1). Las lías fueron retiradas de los vinos mediante centrifugación a 1410xG y 4 ºC durante 15 minutos (Rotina 48CR), y los vinos fueron desgasificados mediante agitación constante durante 15 minutos y congelados inmediatamente hasta su análisis.

Para el estudio de la evolución de la actividad antioxidante durante la vida comercial, 30 botellas de cava, 15 de cada cupaje inicial A y B, envejecidas durante 9 meses en lías y 24 botellas, 12 de cada cupaje inicial A y B, en rima durante 17 meses (cava reserva), fueron sometidas a degüelle, adición de licor de expedición y cierre. Estas botellas se almacenaron a

a temperatura constante de 14 ºC, abriéndose para la línea envejecida 9 meses tres botellas a los siguientes tiempos de vida comercial: 0, 4, 8, 12 y 21 meses, y para la línea envejecida 17 meses en lías: 0, 4, 12 y 30 meses. El vino elaborado según el método Charmat se envejeció durante 9 meses en rima, se eliminaron las lías mediante filtración y se embotellaron 30 botellas que se almacenaron a temperatura constante de 14 ºC, abriéndose tres botellas en los siguientes tiempos: 0, 4, 8, 12 y 21 meses. Todos los vinos, una vez abiertos, fueron desgasificados mediante agitación constante durante 15 minutos y congelados inmediatamente hasta su análisis.

En total, se obtuvieron 96 muestras de vinos espumosos en envejecimiento *sur lie* y 84 muestras de vinos espumosos comerciales.

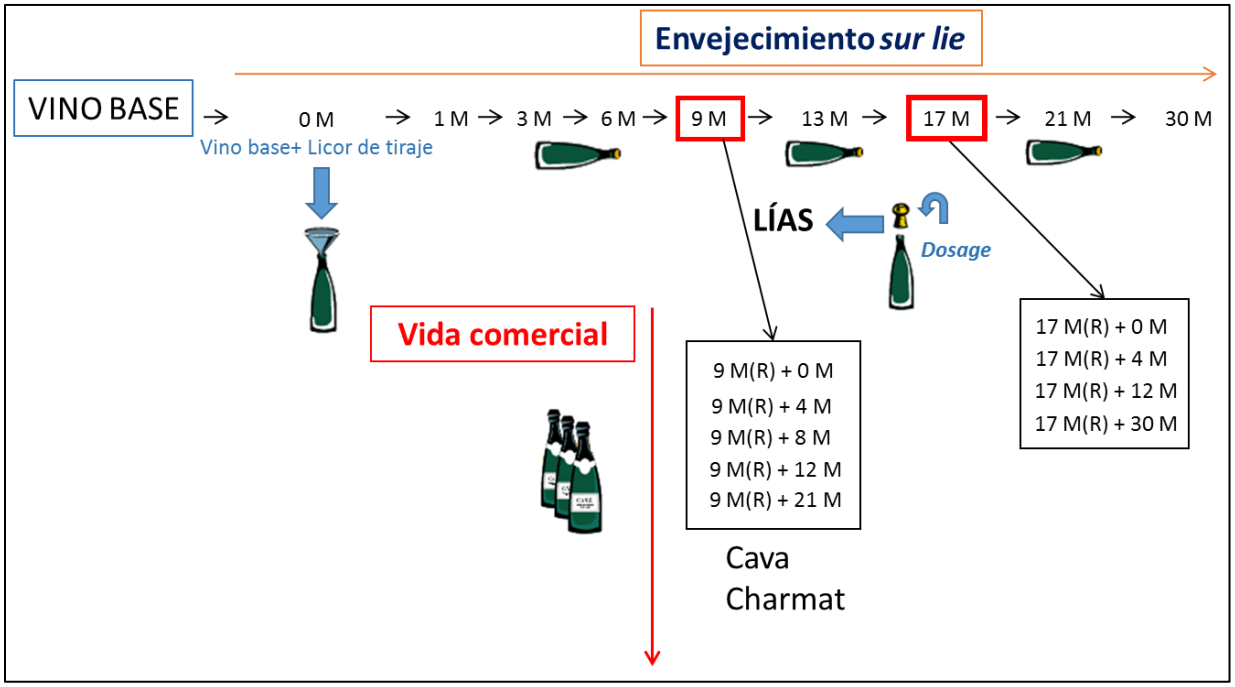


Figura 3-1. Esquema del muestreo aplicado a los vinos espumosos.

3.1.2 Técnicas analíticas aplicadas

3.1.2.1 Parámetros enológicos generales

Los siguientes parámetros físico-químicos comunes en enología se determinaron en los vinos base y en los vinos espumosos en envejecimiento *sur lie* y comerciales a tiempo 0 de acuerdo con los métodos oficiales de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) [139]: azúcares totales, grado alcohólico, sobrepresión de CO_2, acidez total, glicerol, y los ácidos cítrico, málico, láctico, glucónico y tartárico. Los análisis se realizaron en los laboratorios de la bodega proveedora de muestras, Freixenet S.A.

3.1.2.2 Determinación del sulfito libre y total

Los sulfitos son los principales agentes conservantes del vino debido a sus propiedades antisépticas y antioxidantes. Aunque pueden generarse durante la fermentación, en los vinos espumosos los sulfitos presentes provienen, por una parte, del sulfitado realizado durante la elaboración del vino base, y por otra, de la adición de metabisulfito de potasio al licor de expedición a fin de evitar procesos oxidativos indeseables.

Se analizó el sulfito libre y total de todos los vinos espumosos mediante el método de Ripper que basa en una valoración yodométrica directa (figura 3-2). Los análisis se realizaron por duplicado.

Procedimiento:

a) Dióxido de azufre libre. En un matraz se introducen 50 mL de vino, 5 mL de ácido sulfúrico 1/3 (p/V) y 1 mL de solución de almidón al 2% (p/P). Se valora con solución de yodo 0,01M hasta coloración azul que persista durante 15 s.

b) Dióxido de azufre total. En un Erlenmeyer se introducen 10 mL de hidróxido de potasio 1M y 20 mL de vino, se tapa, se agita y se deja en reposo durante 15 min para que se produzca la hidrólisis alcalina de los complejos entre el SO_2 y algunos componentes del vino como el acetaldehído. Pasado este tiempo, se añaden 5 mL de

ácido sulfúrico, 1 mL de la solución de almidón al 2% y se valora rápidamente con la solución de yodo hasta la aparición de la coloración azul persistente (15 s).

Figura 3-2. Reacción yodométrica de Ripper.

3.1.2.3 Determinación de polifenoles totales

La determinación colorimétrica de Folin-Ciocalteau se basa en la reducción química del reactivo de Folin-Ciocalteau, una mezcla de óxidos de tungsteno y molibdeno. Los productos de la reducción de estos óxidos metálicos tienen un máximo de absorbancia a 765 nm, con lo que la medida de la absorbancia a dicha longitud de onda está relacionada con los compuestos antioxidantes de la muestra. Singleton y Rossi [18] adaptaron este método para el análisis de polifenoles en vino, y la Organización Internacional de la Viña y del Vino (OIV) lo adoptó como método oficial de análisis de niveles de polifenoles totales en vino (OIV Compendium 1990).

Procedimiento y cuantificación: para el análisis de los polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteau se siguió la metodología propuesta por López-Tamames [140], que supone una ligera modificación del método oficial. En matraz de 25 ml se añadió 15 ml de agua ultrapura, 1 ml de muestra, 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteau (Panreac química S.A., Barcelona) y 3 ml de solución saturada de Na_2CO_3. Se agitó vigorosamente, se tapó y se dejó reaccionar durante 60 minutos. Después se enrasó con agua ultrapura y se midió la absorbancia a 765 nm con espectrofotómetro (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany). Se realizó una recta de calibrado con ácido gálico y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico/L (mg GAE/L). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.1.2.4 Determinación de los hidroxicinamatos totales

Los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados (hidroxicinamatos) tienen una absorbancia característica alrededor de 320 nm debida a la conjugación entre el doble enlace

del carbono 7 y el grupo carbonilo [141]. La absorbancia a 320 nm puede considerarse un índice válido del contenido en hidroxicinamatos totales en vinos [142].

Procedimiento y cuantificación. Los hidroxicinamatos totales se cuantificaron mediante medida de la absorbancia a 320 nm (espectrofotómetro Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany), utilizando cubetas de cuarzo de 1mm de camino óptico, y como blanco agua destilada. Los resultados se expresaron como mg/L de ácido cafeico (mg caf/L). Todos los análisis fueron realizados por duplicado.

3.1.2.5 Determinación de flavanoles totales

El ensayo de la vainillina es un método habitual para el análisis de los flavanoles totales. La vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído) en medio ácido reacciona con los flavanoles formando un cromóforo de color rojo que absorbe a 500 nm. La principal desventaja de este método consiste en que con el grado de polimerización de las proantocianidinas (polímeros de catequina) se reduce la capacidad de reaccionar con la vainillina, porque la reacción se da preferentemente con las unidades terminales [143].

Procedimiento y cuantificación. Los flavanoles totales se cuantificaron mediante el ensayo modificado de la vainillina descrito por Sun [144]. Brevemente; 1 mL de muestra se mezcló con 2,5 mL de disolución de vainillina en metanol al 1%, y con 2,5 mL de ácido sulfúrico 4,5 M en metanol. Se agitó y se dejó reaccionar 15 minutos a 30 ºC. Finalmente, se midió la absorbancia a 500 nm en espectrofotómetro (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany). Se realizó una recta de calibrado con catequina y los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina/L (mg cat/L). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.1.2.6 Determinación de la actividad antioxidante

MÉTODO FRAP

El ensayo FRAP analiza la actividad antioxidante mediante la reducción del complejo de hierro (III) con tripiridil triazina (Fe(III)-TPTZ) a hierro (II) (Fe(II)-TPTZ), el cual tiene un intenso color azul y absorbe a 593 nm (figura 3-3). El método FRAP se basa en una reacción

redox en la cual un oxidante fácilmente reducible (el potencial redox de Fe (III) es 0,70 V en condiciones ácidas) se usa en exceso estequiométrico y los antioxidantes actúan como reductores, midiendo por lo tanto la capacidad reductora de estos compuestos y no la capacidad quelante de radicales como en otros métodos antioxidantes [17].

Procedimiento y cuantificación**.** El ensayo FRAP se realizó de acuerdo a una modificación del método original de Benzie y Strain [145]. La disolución FRAP se preparó diariamente con 25 ml de tampón acetato (pH 3,6, 0,3 M), 2,5 mL de disolución de cloruro férrico hexahidratado (20 mM), y 2,5 mL de disolución TPTZ (10 mM en 40 mM de HCl). Después de un atemperado a 37ºC, 900 µL de disolución FRAP se mezcló con 30 µL de muestra diluida al 20% o patrón, y 90 µL de agua desionizada. Se dejó reaccionar a 37ºC y oscuridad durante 8 minutos, tras lo cual se midió su absorbancia a 593 nm (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany). Se realizaron curvas de calibrado con Trólox y los resultados se expresaron como µM equivalentes de Trólox. Los análisis se realizaron por triplicado.

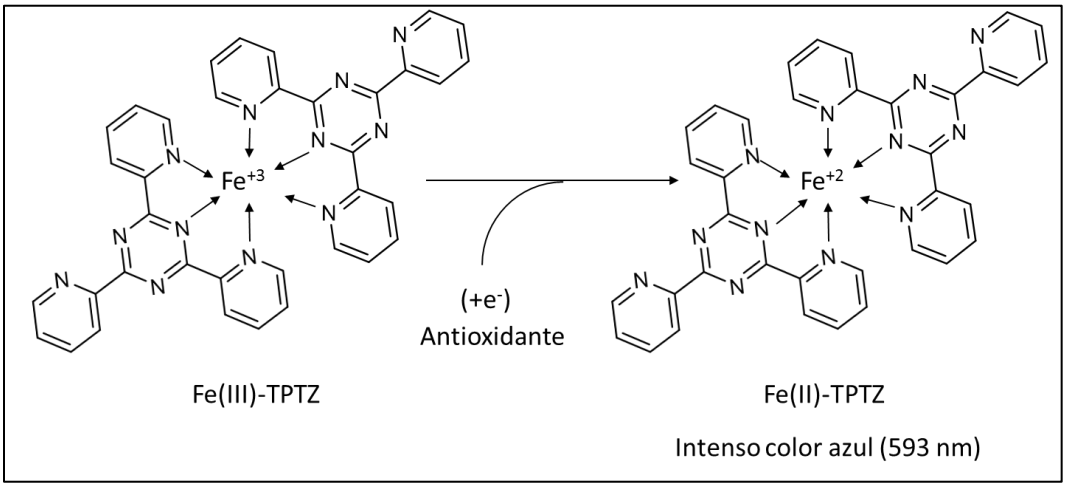


Figura 3-3. Reacción que tiene lugar al aplicar el método FRAP.

MÉTODO DPPH

Es un método espectrofotométrico que se basa en la reacción con el radical DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), el cual es un radical comercial estable con un color violeta intenso y un máximo de absorbancia a 517 nm [146] (figura 3-4). Un sustrato donante de

protones como un antioxidante, reacciona con el DPPH reduciéndolo a la forma no radical $DPPH_2$, que tiene una tonalidad ligera amarilla y no absorbe a 517 nm. La disminución de absorbancia es proporcional a la actividad antioxidante de la muestra.

Procedimiento y cuantificación. Para el análisis de la actividad antioxidante mediante el método DPPH, se siguió la metodología propuesta por Brand-Williams [147]. Brevemente, 20 µL de muestra de vino se mezcló con un volumen de disolución de DPPH 0,094 mM en metanol, hasta completar un volumen final de 1 mL. La mezcla se agitó, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente en vial cerrado. Después de 30 minutos, se midió la absorbancia a 517 nm (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany). Se realizaron curvas de calibrado con Trólox y los resultados se expresaron como µM equivalentes de Trólox. Los análisis se realizaron por triplicado.

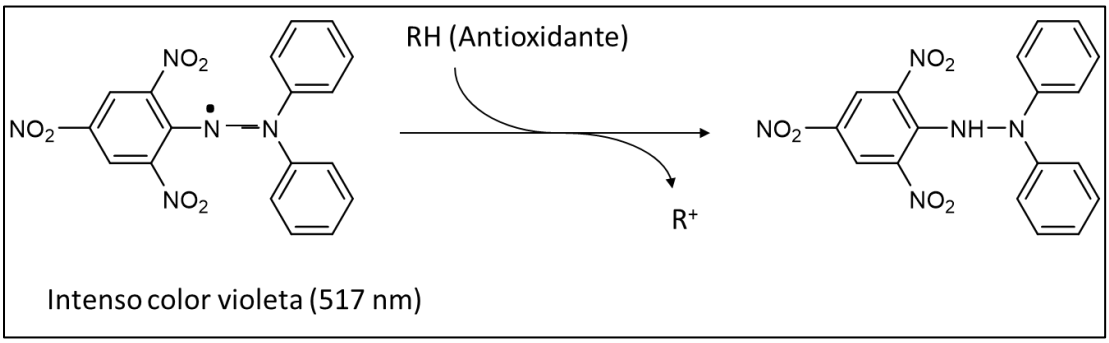


Figura 3-4. Reacción que tiene lugar al aplicar el método DPPH.

3.2 LÍAS

3.2.1 Tipos de muestras

El estudio de la composición y la actividad antioxidante se realizó con lías recuperadas de la elaboración de vinos espumosos: primera fermentación, segunda fermentación de cava y segunda fermentación de Charmat, y una preparación comercial de paredes que se utiliza en la elaboración de vinos espumosos por sus propiedades antioxidantes.

Las lías recuperadas de la elaboración de vinos espumosos fueron obtenidas industrialmente de la empresa Freixenet S.A. Estas lías provenían de la levadura *S.cerevisiae* (cepa F11), perteneciente a la colección privada de la bodega. Las lías fueron filtradas a través de un tamiz de 100 µm de haz de luz, lavadas 5 veces en vino modelo (pH 3, 5 g/L de ácido tartárico y 12% etanol), y resuspendidas en vino modelo hasta una concentración aproximada de 2,5 g (lía fresca) en 10 mL finales.

La muestra de paredes de levadura seca inactiva (LSI) fue proporcionada por la empresa SEPSA Enartis (Vilafranca del Penedès, España). Se realizó una suspensión de estas cortezas a la misma concentración final que las muestras de lía (en base seca). De acuerdo con el fabricante, esta preparación está basada en cortezas de levadura ricas en manoproteínas y aminoácidos tiólicos.

3.2.2 Tratamientos para la obtención de fracciones

Se realizaron tres tratamientos diferentes para la obtención de fracciones: 1) una disrupción celular, para separar entre el interior (citoplasma) y el exterior (pared celular) de las muestras, 2) un fraccionamiento completo de la pared, y 3) una separación de las manoproteínas del resto de la pared celular en un solo paso.

3.2.2.1 Disrupción celular

Se realizó una disrupción mecánica de las muestras de lías y LSI con perlas de vidrio lavadas con ácido (diámetro 0,5 mm) en un molino de bolas Retsch Mixer MM 400 (Düsseldorf, Alemania) (Figura 3-5). Las condiciones de disrupción fueron 30 minutos y 30 Herzios de frecuencia. La pared celular de levadura fue separada por centrifugación (1410 G, 4ºC,15 minutos) en una centrífuga Rotina 48CR, obteniéndose un sedimento consistente en paredes celulares y un sobrenadante con el contenido del interior celular. Los sedimentos fueron lavados tres veces y resuspendidos en vino modelo hasta el mismo volumen inicial (10 mL). Se tomó una muestra de levadura entera (WY), levadura rota (DY), sobrenadante (Cyt) y de pared celular de levadura (YCW), y se conservó a 4 ºC para su posterior análisis.

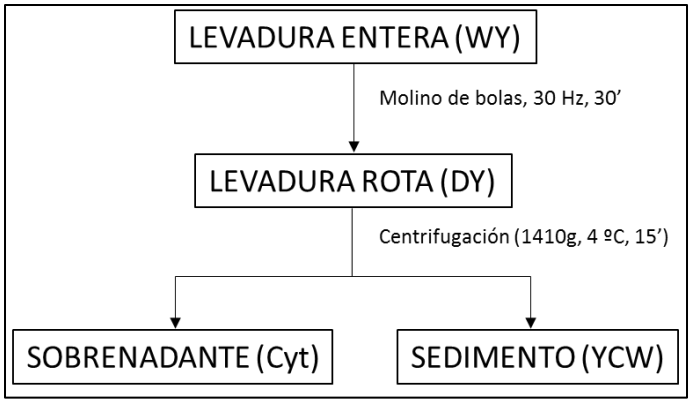


Figura 3-5. Proceso de disrupción celular.

3.2.2.2 Fraccionamiento de la pared

Después de la disrupción, las paredes fueron separadas en sus componentes por una combinación de alta temperatura y tratamiento enzimático según el método descrito por Jaehrig [136]. El proceso esquemático se muestra en la figura 3-6.

TRATAMIENTO CON CALOR

Una porción de las paredes celulares lavadas de cada muestra fue suspendida en agua y ajustada a pH 7 con hidróxido sódico (30 % w/w) (volumen final 10 mL). Las suspensiones se calentaron a 110 ºC en un termobloque Selecta (Abrera, España) durante 5 horas para extraer los componentes más solubles. Después, fueron centrifugadas (1410 G, 4ºC, 15 minutos), obteniéndose unos sedimentos (Figura 3-6, sedimento 1) y unos sobrenadantes (Figura 3-6, F1), que fueron congelados para su posterior análisis.

TRATAMIENTO CON PROTEASA

Los sedimentos previamente obtenidos fueron suspendidos en agua hasta un volumen final de 10 mL y sometidos a un tratamiento con proteasa con el objetivo de extraer los péptidos y aminoácidos. Para ello, las suspensiones fueron calentadas hasta 45 ºC y el pH ajustado a 10,5 con hidróxido sódico (30% w/w), añadiéndose bajo agitación un volumen de 7,5 µL de proteasa de *Bacillus sp*p. [EC 3.4.21.14] (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a tres tiempos: 0, 1,5 y 3 horas. Después de 5 horas en agitación continua, las suspensiones fueron

centrifugadas (1410 G, 4ºC, 15 min.), obteniéndose sedimentos (Figura 3-6, Sedimento 2) y sobrenadantes (Figura 3-6, F2), que fueron congelados para su posterior análisis.

TRATAMIENTO CON LIPASA

Posteriormente los sedimentos fueron suspendidos en agua hasta un volumen final de 10 mL y tratados con 50 µL de Lipasa de *Thermomyces lanuginosus* [EC 3.1.1.3] (Sigma-Aldrich, USA) durante 3 horas a 45 ºC y pH 10,5 para extraer los componentes lipídicos. Después, las suspensiones fueron centrifugadas, los sobrenadantes obtenidos (Figura 3-6, F3) congelados para su posterior análisis, y los sedimentos remanentes fueron suspendidos en agua hasta un volumen final de 10 mL (Figura 3-6, F4).

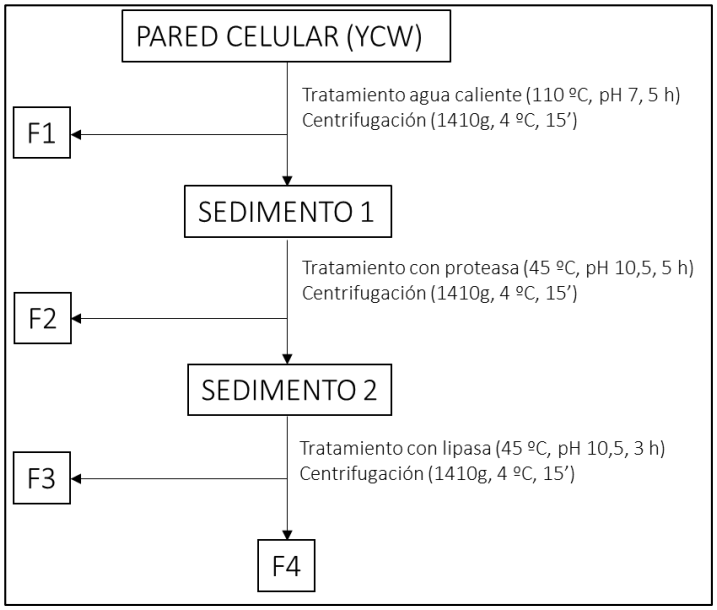


Figura 3-6. Proceso de fraccionamiento de las paredes celulares

3.2.2.3 Obtención de manoproteínas

Se realizaron dos tratamientos diferentes a las paredes celulares de las lías de segunda fermentación y LSI para la obtención de manoproteínas:

EXTRACCIÓN EN CONDICIONES BÁSICAS SUAVES

Se siguió la metodología propuesta por Yin [148]. Brevemente: se suspendieron 200 mg de peso fresco de pared en NaOH 30 mM, y se enrasó hasta 5 mL finales. Se incubó durante 17 horas a 4 ºC y agitación constante, y finalmente se centrifugó (1410 G, 4ºC, 15 minutos). Sobrendantes y precipitados se guardaron en congelador (- 20 ºC).

EXTRACCIÓN CON B-GLUCANASA

Se siguió la metodología propuesta por Kipple [149] con ligeras modificaciones: se suspendieron 200 mg de peso fresco de pared en tampón de acetato de sodio (150 mM, pH 6,5) que contenía 2 mg de β-glucanasa [EC 3.2.1.39] (Sigma-Aldrich), y se enrasó hasta 5 mL finales. Se incubó durante 17 horas a 37 ºC y agitación constante, y finalmente se centrifugó (1410 G, 4ºC, 15 minutos). Sobrendantes y precipitados se guardaron en congelador (- 20 ºC).

3.2.3 Técnicas de microbiología aplicadas

3.2.3.1 Microscopía óptica confocal

La microscopía óptica confocal es una técnica de visualización de células y objetos muy superior a la microscopía óptica convencional. En los microscopios ópticos convencionales, la luz es reflejada por todas las capas de la muestra, por lo que no se puede conseguir una representación nítida de un plano individual de interés. Por otra parte, existe dispersión de la luz, lo que reduce el contraste y la resolución. Un microscopio confocal utiliza dos diafragmas confocales (uno antes de la muestra y otro después) capaces de enfocar la iluminación en un único punto, eliminando el reflejo difuso y mejorando la calidad de la imagen [150]. Se utiliza un láser como fuente luminosa, y con él se va barriendo la muestra por todo su volumen, plano a plano, creando muchas imágenes bidimensionales que un ordenador interpreta, pudiendo generar finalmente una imagen tridimensional del objeto.

Procedimiento. Las muestras se visualizaron mediante un microscopio confocal TCS SP2 Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) de la unidad de microscopía óptica

avanzada de los servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona. Se usó láser de argón a 488 nm, y el detector 1 PMT de luz transmitida. Para efectuar el estudio de las muestras se trabajó con los objetivos de 40 x, 63 x y 100 x, y aceite de inmersión (n = 1.518). Se analizaron las muestras atendiendo a la reflexión de la luz emitida por las células y no se utilizaron, por tanto, marcadores fluorescentes.

3.2.3.2 Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método general para el análisis rápido de un gran número de células individualmente usando medidas de dispersión y fluorescencia. A diferencia de otras herramientas analíticas en las cuales los datos obtenidos son integrales, es decir, un único valor interpreta una población entera, la citometría de flujo permite obtener datos segregados que representan diferentes subpoblaciones.

En la citometría de flujo las células pasan de una en una a través de un haz láser (o luz de lámpara de mercurio) que es ortogonal al flujo. Cuando este haz incide sobre la célula, se dispersa frontalmente ("forward-scattered") o lateralmente ("sideways-scattered"). La dispersión frontal está relacionada con el tamaño celular y la dispersión lateral con las características del citoplasma [151]. El haz láser incidente también puede excitar una serie de fluorocromos presentes en las células. Las señales de luz dispersada y luz emitida por lo fluorocromos se recogen posteriormente por diferentes detectores. Las señales de dispersión y fluorescencia se pueden combinar de varias maneras para poder diferenciar entre subpoblaciones.

Procedimiento. Se realizó una caracterización inicial de la disrupción de las muestras de lías de segunda fermentación de cava mediante un citómetro de flujo por impedancia Multisizer TM Coulter Counter (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA), con 70 µm de apertura. Para ello, la muestra se diluyó en vino modelo hasta las siguientes concentraciones: 50, 150, 350, 450 y 550 mg de lía húmeda/mL. Estas suspensiones fueron sometidas a diferentes tiempos de dirupción en molino de bolas (Retsch Mixer MM 400, Düsseldorf, Alemania): 0, 10, 20 30 y 40 minutos. La frecuencia fue la misma en todos los ensayos, 30 Hz. Las

suspensiones después de la disrupción se diluyeron apropiadamente en tampón fosfato salino y se midió en el citómetro Multisizer la distribución de tamaños de cada una de ellas por triplicado. El número de células/mL se estableció dividiendo el número de eventos por el volumen de paso por el citómetro (0,5 mL).

El análisis poblacional de todas las muestras de lías y de levadura seca inactiva se llevó a cabo en un citómetro de flujo por fluorescencia Gallios (Coulter Corporation, Miami, Florida). Para ello, se realizaron las diluciones apropiadas de las muestras en tampón fosfato salino. Estas diluciones se marcaron con dos fluorocromos para ácidos nucleicos: SYTO 13, que absorbe a 490 nm y emite a 525 nm (verde), y yoduro de propidio, que absorbe a 536 nm y emite a 617 nm (rojo), ambos de Life Technologies (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). El SYTO 13 es permeable a las membranas celulares por lo que marca todas las células, mientras que el yoduro sólo puede atravesar las membranas si éstas están rotas; por lo tanto, el yoduro marcará sólo las células no viables. En 2 mL de muestra diluida se añadieron 2 µL de SYTO 13 de concentración 500 µg/mL, y 5 µL de yoduro de propidio de concentración 1mg/mL.

La fuente luminosa fue un láser de argón de 488 nm de 15 mW de potencia. Las medidas de dispersión de luz se utilizaron para seleccionar (realizar un "gattering") la población de *Saccharomyces cerevisiae,* y las medidas de fluorescencia para diferenciar entre células viables o no de la población seleccionada. Antes de las medidas, el citómetro se calibró con perlas fluorescentes de 10 µm (Immunocheck, Epics Division). Estas perlas fueron también utilizadas para el contaje absoluto a una concentración de 10^5 partículas/mL.

3.2.4 Técnicas analíticas aplicadas

3.2.4.1 Contenido en sólido o peso seco

El peso seco es el concentrado de materia orgánica e inorgánica después de una evaporación del agua a 105 ºC. El peso seco de todas las suspensiones fue determinado de la siguiente manera: 1 mL de suspensión fue secado a 105 ºC en vial de cristal (previamente

tarado) hasta peso constante (aproximadamente 2 horas). Estas muestras fueron almacenadas en desecadores y pesadas (el peso seco de 1 mL de vino modelo fue tenido en cuenta). El peso seco se expresó como mg/L de suspensión.

3.2.4.2 Determinación del contenido en ácido tartárico

El ácido tartárico es el más abundante y característico de los ácidos que se encuentran en la uva y, consecuentemente, en el mosto y el vino. Durante la elaboración del vino precipita principalmente como bitartrato de potasio y, en menor medida, como tartrato de calcio [152]. El método colorimétrico de Rebelein para el análisis de ácido tartárico en vino [153] se utiliza ampliamente en laboratorios porque permite el análisis simultáneo de numerosas muestras, a pesar de no ser el método oficial de la Oficina Internacional de la Viña y del Vino (OIV) [154]. Este método se basa en la determinación espectrofotométrica a la longitud de onda de 500 nm por formación de un complejo cromóforo amarillo-naranja, al reaccionar el ácido tartárico con metavanadato en medio ácido.

Procedimiento y cuantificación. El contenido de ácido tartárico en las lías sin lavar y las lías lavadas fue analizado mediante el método de Rebelein modificado [153]. Para ello se tomaron alícuotas de 1 mL de cada una de las muestras y se liofilizaron (Telstar Cryodos, Spain). Una vez liofilizadas, se pesaron, se redisolvieron en HCl 0,1 N hasta un volumen final de 50 mL, se sonicaron durante 30 minutos y se filtraron a través de un filtro Whatman Nº2. Una alícuota de 100 µL de esta disolución se mezcló con 1mL de disolución I (30 % de ácido acético (v/v) y 1 mL de disolución II (85 mM metavanadato de amonio, 150 mM hidróxido sódico y 656 mM de acetato sódico). Después de 10 minutos a temperatura ambiente, se midió su absorbancia a 500 nm (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany). Se construyó una recta de calibrado con ácido tartárico, y los resultados fueron expresados como % (w/w) de ácido tartárico respecto al peso seco de las suspensiones.

3.2.4.3 Determinación de polifenoles individuales por HPLC

La cromatografía de alta eficacia HPLC (High Performance Liquid Chromatography) o de ultra eficacia (UHPLC), es una técnica instrumental muy utilizada en el análisis de alimentos,

y en particular, en el análisis de su contenido en polifenoles [155]. Consiste en la separación de compuestos según su afinidad a una fase móvil (eluente) o a una fase estacionaria (columna). Una vez separados, se lleva a cabo la detección y cuantificación de éstos mediante el uso de detectores. Existen diversos tipos de detectores, que se seleccionan dependiendo de las características del analito [156].

Uno de los detectores más utilizados en análisis de rutina es el detector de *foto-diode array* (DAD o PDA), que se basa en la espectroscopia de absorción molecular, en la cual se mide la transmitancia o absorbancia a una determinada longitud de onda según el analito involucrado. El detector DAD no es destructivo, y por lo tanto se le puede acoplar otro detector a la salida de éste. Puede ser útil para identificar compuestos a partir de su espectro de absorción, o utilizado para cuantificar el contenido de un analito a partir de una recta de calibrado externa de patrón. La principal ventaja de la técnica de HPLC en el análisis de polifenoles es que puede proveer una rápida respuesta, ofreciendo a la vez alta sensibilidad y eficacia de separación en una matriz alimentaria muy compleja.

Procedimiento y cuantificación

1. Extracción de polifenoles: los polifenoles de las lías antes y después del acondicionamiento se extrajeron usando el método descrito por Mazauric y Salmon [29], con las siguientes modificaciones: 20 mg de lía liofilizada se añadió a 10 mL de una mezcla de metanol/agua/ácido trifluoroacético (80/20/0,05), y se colocó en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se aisló mediante centrifugación (15 minutos, 2000G, 4 ºC). La extracción se realizó por duplicado en cada muestra.
2. Condiciones cromatográficas: la determinación de los polifenoles se realizó por inyección directa del extracto metanólico previamente filtrado (filtro de nylon de 0,45 µm Waters) en un cromatógrafo líquido Alliance 2695 (Waters, PA, USA), equipado con un detector diodo-array Waters 2996 (220 nm – 450 nm). La columna utilizada fue una Symmetry C18 (Waters, PA, USA), 15 x 3,9 cm, de 5 µm de tamaño de partícula.

El volumen de la muestra inyectada fue de 20 µl y el análisis fue llevado a cabo a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en un eluente A, una disolución de ácido fórmico 0,5 % en agua, y un eluente B, una disolución de ácido fórmico 0,5 % en acetonitrilo. Las condiciones del gradiente fueron las siguientes: 0'-5% B, 3'-5% B, 20'-35% B, 21'-90% B, 23'-90% B, 24'-5% B, 30'-5% B, a un flujo de 1 mL/min. La identificación y cuantificación se realizó mediante patrón externo. Los resultados se expresaron en µg/mg de peso seco.

3.2.4.4 Determinación de polisacáridos totales

El método del fenol-sulfúrico [157] es un método colorimétrico simple y rápido para determinar los carbohidratos totales de una muestra. El método detecta inespecíficamente toda clase de carbohidratos, incluyendo los mono-, di-, oligo- y polisacáridos. Los aminoácidos y proteínas presentan poca interferencia en el ensayo [158]. En este método el ácido sulfúrico concentrado reduce cualquier polisacárido, oligosacárido o disacárido a monosacárido. En presencia de ácido sulfúrico concentrado, las pentosas se deshidratan a furfural y las hexosas a hidroximetilfurfural. Ambas posteriormente reaccionan con fenol para dar compuestos amarillo-dorados que pueden medirse espectrofotométricamente a 490 nm.

Procedimiento y cuantificación. Una alícuota de 0,5 mL de suspensión o sobrenadante fue mezclada con 0,5 mL de fenol al 5 % (w/w). Después se añadió 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se calentó a 30 ºC durante 30 minutos. Finalmente, las muestras fueron medidas a 490 nm (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany). Se realizó una recta estándar con galactosa, y los resultados fueron expresados como % (w/w) de polisacáridos. Los análisis fueron realizados por triplicado.

3.2.4.5 Determinación de proteína total

El método de Bradford es uno de los ensayos de cuantificación de proteínas más utilizados en los laboratorios. Esta técnica es más simple y rápida, y está sujeta a menos interferencias por reactivos de uso común y componentes no proteicos, que el método de Lowry [159]. El método se basa en la formación de un complejo entre el colorante, Azul de

Coomassie G, y las proteínas en disolución. El azul de Coomassie G puede existir en cuatro formas iónicas diferentes , tres de las cuales se encuentran al pH ácido del ensayo: catiónica (roja), neutra (verde) y aniónica (azul) [160]. Por su carga negativa, la forma iónica azul es la que se considera que forma el complejo con las proteínas mediante interacciones con las cadenas laterales de arginina y lisina. El complejo con la proteína muestra un cambio en el máximo de absorción desde 464 hasta 595 nm, de tal modo que el incremento en la absorbancia a 595 nm puede utilizarse para medir la concentración de proteínas.

Procedimiento y cuantificación. Una alícuota de 50 µL de fracción líquida se añadió a 1,5 mL de reactivo comercial Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente, la absorbancia a 595 nm fue medida en espectrofotómetro (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany). Se realizó una recta de calibración estándar con albúmina de suero bovina (BSA). Los resultados fueron expresados como % (w/w) de proteína (BSA).

Para las suspensiones (levaduras enteras, levaduras rotas, paredes de levadura y fracción F4), fue necesaria una extracción previa de las proteínas. Para ello, se añadió NaOH 0,05 M a las suspensiones, y se calentó a 90 ºC durante 40 minutos [161]. Después se centrifugó, y la proteína en el sobrenadante fue determinada según el método de Bradford aplicado a las muestras líquidas. Los resultados fueron expresados como % (w/w) de proteína (BSA).

3.2.4.6 Determinación de aminoácidos libres y péptidos

El método de la ninhidrina es un ensayo clásico introducido por Moore y Stein en 1948 para la determinación cuantitativa de aminoácidos [162]. El método ha sido adaptado y ampliamente utilizado para el análisis de compuestos con grupos amino en alimentos y otros tipos de muestras [163]–[165]. La ninhidrina (2,2-Dihydroxy-1,3-indanedione) reacciona con grupos amino en medio ácido (pH 3-4) a alta temperatura. El mecanismo de reacción más aceptado actualmente consiste en la formación de una base de Shiff entre la ninhidrina y el

aminoácido, la descarboxilación de esta base y la condensación con otra molécula de ninhidrina formándose el cromóforo Púrpura de Ruhemann [166].

DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES

El contenido en aminoácidos libres de las suspensiones y los sobrenadantes fue analizado mediante una modificación del método del Cd-ninhidrina [167]. Una alícuota de 1 mL de reactivo de ninhidrina (en etanol: 50 mM ninhidrina, 5,5 mM $CdCl_2$, 10% v/V de ácido acético) se añadió a 0,5 mL de muestra convenientemente diluida. La mezcla fue calentada durante 5 minutos a 84 ºC, después enfriada en un baño de agua y filtrada. Finalmente, se midió la absorbancia a 507 nm (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany). Se construyó una recta de calibrado con L-leucina y los resultados fueron expresados como % (w/w) de aminoácidos libres.

DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS

Se utilizó el método convencional de la ninhidrina para analizar el total de péptidos y aminoácidos libres [167]. El reactivo de ninhidrina se preparó diariamente de la siguiente manera: en un matraz aforado de 20 mL se mezclaron 200 mg de ninhidrina, 20 mg de $SnCl_2$ y 10 mL de 2-metoxietanol, y se enrasó con disolución tampón de acetato-citrato (pH 5, 0,5 M ácido acético y 0,1 M ácido cítrico). La reacción se llevó a cabo mediante la adición de 0,4 mL de reactivo de ninhidrina a 0,2 mL de muestra convenientemente diluida. La mezcla se calentó en baño de agua hirviendo durante 20 minutos. Después, los tubos se enfriaron en baño de hielo y se añadió 1 mL de diluyente (acetona/0,1 M Na_3PO_4/agua; 4:2:4). Se midió la absorbancia a 570 nm (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany), y se construyó una recta de calibrado con L-leucina. Los péptidos se cuantificaron mediante la diferencia entre los resultados obtenidos con el método convencional y los resultados anteriores de aminoácidos libres. Los resultados fueron expresados como % (w/w) de péptidos.

3.2.4.7 Determinación de tioles totales

Los tioles reaccionan con 4-DTDP (4,4-ditiopiridina) formando el aducto tiólico 4-DTDP y el subproducto 4-TP (4-tiopiridona). La determinación espectrofotométrica de este subproducto indirectamente proporciona la cuantificación de los tioles. Debido a su pequeño tamaño, naturaleza anfifílica y a su ausencia de carga, el DTDP rápidamente reacciona con los sulfihidrilos de las proteínas [168].

Procedimiento y cuantificación. Una alícuota de 300 µL de suspensión o fracción líquida se mezcló con 1,7 mL de tampón acetato (pH 4,5, 0,1 N, EDTA 0,2 mM). Se añadió 125 µL de DTDP (4mM en 12 mM HCl), y después de 20 minutos de reacción a temperatura ambiente, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro. La absorbancia de los filtrados se determinó a 324 nm (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany). Se construyeron rectas de calibración con glutatión como estándar, y los resultados fueron expresados como % de glutatión (w/w).

3.2.4.8 Determinación de glutatión oxidado y reducido

El glutatión oxidado y reducido fue analizado enzimáticamente por triplicado mediante el ensayo colorimétrico comercial “Bioxytech GSH/GSSG-412” (Oxis International, Inc., Foster City, U.S.A.) según las instrucciones del fabricante. El método se basa en el ensayo de reductasa para la determinación de glutatión reducido descrita inicialmente por Tietze [169].

En presencia de DTNB (ácido 5,5’-ditio-bis(2-nitrobenzoico)) y glutatión reductasa, la adición de NADPH a la mezcla de reacción inicia la progresiva reducción de GSSG a GSH, que reacciona con DTNB y forma el producto coloreado TNB (ácido 2-nitro-5-tiobenzoico). El cambio de absorbancia a 412 nm, después de 3 o 4 minutos, es proporcional al glutatión total presente. Para determinar el glutatión oxidado GSSG, se añade el reactivo 1-metil-2-vinilpiridina trifluorometanosulfonato (M2VP), que bloquea el GSH presente para que no reaccione con el DTNB. El M2VP tiene dos ventajas fundamentales frente a otros reactivos

usados para el mismo fin: reacciona muy rápidamente con el GSH presente y no inhibe la enzima Glutatión reductasa.

3.2.4.9 Determinación de la actividad antioxidante

Los métodos aplicados para la determinación de la actividad antioxidante (FRAP y DPPH) fueron los mismos que los utilizados para los vinos espumosos, pero, dado que las muestras son suspensiones y no disoluciones verdaderas, estos métodos se modificaron según la metodología propuesta por Serpen [170]. También se aplicó el método Folin-Ciocalteau como ensayo de actividad antioxidante, con sus modificaciones oportunas.

MÉTODO FOLIN-CIOCALTEAU

Una alícuota de 200 µL de cada muestra o fracción fue mezclada con 6 mL de agua desionizada en un matraz aforado de 10 mL. Después de añadir 400 µL de reactivo Folin-Ciocalteau (Panreac, Barcelona) y 2,3 mL de disolución de carbonato de sodio (20 % w/w), se agitó y se enrasó con agua destilada. Los matraces aforados se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 60 minutos, agitándose cada 10 minutos. Después se centrifugaron durante 2 minutos a 10000×g y 4 °C en centrífuga eppendorf 5804R. La absorbancia de los sobrenadantes se midió a 765 nm (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany). Se realizó una curva de calibrado con Trólox como estándar, y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de Trólox/g peso seco (mg TEQ F-C/g DW). Los análisis se realizaron por triplicado.

MÉTODO FRAP

El ensayo FRAP aplicado a las muestras y sus fracciones envuelve los siguientes procedimientos: el reactivo FRAP se preparó diariamente mezclando 2,5 mL de disolución de TPTZ (2,5 mL, 10 mM en 40 mM HCl), 25 mL de tampón acetato (pH 3,6, 0,3 M), y 2,5 mL de $FeCl_3 \cdot H_2O$ (20 mM). Después de su calentamiento a 37 ºC, 900 µL de reactivo FRAP se mezcló con 30 µL de muestra y 90 µL de H_2O en un vial de reacción. Después de 4 minutos se agitó en vórtex, y a los 8 minutos totales de reacción a 37 ºC se centrifugó durante 2 minutos a

10000g y 4ºC en centrífuga eppendorf 5804R. La absorbancia de los sobrenadantes se midió a 593 nm frente a un blanco de vino modelo (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany). Se realizaron curvas de calibración usando Trólox como estándar y los resultados fueron expresados como mg Trólox equivalentes/g seco (mg TEQ/g DW). Los análisis se realizaron por triplicado.

MÉTODO DPPH

Brevemente, 300 µL de muestra convenientemente diluida se mezcló con un volumen de disolución de DPPH 0,094 mM en metanol hasta completar un volumen final de 2 mL. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente en vial cerrado, y se agitó durante 1 minuto a los 0, 15 y 25 minutos para facilitar la reacción superficial. Después de la centrifugación a 10000g y 4 ºC durante 2 minutos en centrífuga eppendorf 5804R, se midió la absorbancia a 517 nm (Shimadzu® UV-3600, Duisburg, Germany). Se realizaron curvas de calibrado con Trólox y los resultados se expresaron como mg Trólox equivalentes/g seco (mg TEQ/g DW). Los análisis se realizaron por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descubrir lo que está delante de nuestras narices requiere de una lucha constante.
-George Orwell–

En primer lugar, se expondrán los resultados de evolución y actividad antioxidante de vinos espumosos, que constituye una evaluación indirecta del potencial antioxidante que las lías demuestran durante el proceso de envejecimiento *sur lie*. Posteriormente, se describirán las características morfológicas y poblacionales de las muestras de lías atendiendo a las imágenes obtenidas por microscopía confocal y a los resultados de citometría de flujo. Por último, se analizarán los resultados correspondientes a composición y actividad antioxidante de las muestras de lías y de sus fracciones obtenidas mediante los diferentes procesos de separación de sus componentes (disrupción, fraccionamiento de la pared y obtención de manoproteínas). Todos los apartados se han finalizado con unas conclusiones parciales, a modo de resumen, que pretenden resaltar aquellos aspectos más destacables.

4.1 COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE VINOS ESPUMOSOS

Se analizó la composición y la actividad antioxidante de vinos espumosos industriales cava y Charmat con diferentes tiempos de envejecimiento *sur lie* (con lías) y diferentes tiempos de almacenamiento comercial en bodega (sin lías). Se compararon las evoluciones de las diferentes series a lo largo del tiempo para determinar el papel de las lías en la actividad antioxidante de los vinos espumosos.

4.1.1 Parámetros enológicos generales

Para caracterizar enológicamente los vinos base y los vinos espumosos en los puntos iniciales de comparación, se analizaron parámetros enológicos generales como pH, grado alcohólico, glicerol, etc. En la tabla 4-1 se pueden ver los resultados para los vinos base de los cupajes A y B. Ambos cupajes cumplen con los requisitos analíticos establecidos para vinos espumosos cava y Charmat (véase apartado *2.1.1 Elaboración de vinos espumosos*). El ácido glucónico proviene de uva afectada con botritis. Los niveles de los vinos base se pueden considerar bajos, por lo que las uvas se encontraban en un estado sanitario adecuado durante la vendimia. Los niveles de anhídrido sulfuroso libre y total están por debajo de los límites permitidos, lo que también indica que las uvas estaban en un buen estado sanitario y se realizaron buenas prácticas de fabricación de vinos.

	A	B
pH	2,92	2,94
Azúcares totales (g/L)	0,31	0,42
Alcohol (% vol)	10,8	11
Acidez titulable (g/L)	5,7	5,5
Ácido cítrico (g/L)	0,17	0,19
Ácido málico (g/L)	0,66	0,63
Ácido láctico (g/L)	0,39	0,36
Ácido tartárico (g/L)	3,96	3,54
Ácido glucónico (g/L)	0,18	0,3
Glicerol (g/L)	4,37	4,57
Sulfito libre (mg/L)	7	6
Sulfito total (mg/L)	79	66

Tabla 4-1. Parámetros enológicos generales de los vinos base de los cupajes A y B.

Las tablas 4-2 y 4-3 muestran los valores obtenidos para los vinos espumosos *sur lie* a los 9 meses de envejecimiento y los obtenidos para vinos espumosos comerciales en el punto

0. Los datos obtenidos para 17 meses de envejecimiento *sur lie* (punto 0 de comparación con los cavas reserva), son muy similares a los de los 9 meses. No hay diferencias destacables entre los valores de espumosos *sur lie* y comerciales, a excepción del contenido en azúcares totales. Estas diferencias se deben a la adición del licor de expedición después del degüelle, que se dosifica con la concentración adecuada de azúcares según el tipo de vino espumoso. En general, los datos obtenidos presentan unos valores acordes con los encontrados frecuentemente en bodega.

	Cava *sur lie*		Charmat *sur lie*	
	A	B	A	B
pH	3,02	3,02	3,01	2,99
Azúcares totales (g/L)	0,21	0,71	0,32	0,68
Alcohol (% vol)	11,6	11,6	11,5	11,5
Sobrepresión (bar)	7,1	7,1	6,1	6,2
Acidez titulable (g/L)	3,7	3,6	3,5	3,4

Tabla 4-2. Parámetros enológicos generales de los vinos espumosos sur lie a los 9 meses de envejecimiento según cupaje A y B. n=2.

	Cavas comerciales		Cavas reserva comerciales		Charmats comerciales	
	A	B	A	B	A	B
pH	3,02	3,03	2,98	2,98	3,03	3,03
Azúcares totales (g/L)	9,8	10,2	9,5	9,3	11	10,8
Alcohol (% vol)	11,6	11,7	11,7	11,8	10,6	10,4
Sobrepresión (bar)	6,2	6,2	6	6,1	4,9	5,1
Acidez titulable (g/L)	3,6	3,6	3,5	3,5	3,3	3,4

Tabla 4-3. Parámetros enológicos generales de los vinos espumosos comerciales (sin lías) a tiempo 0 según cupaje A y B. n=2.

4.1.2 Evolución del contenido en fenoles

Los fenoles son los compuestos que más influencia tienen en la capacidad antioxidante de los vinos. Por ello, se analizaron los fenoles totales y los dos grupos de fenoles más abundantes en los vinos espumosos: los ácidos hidroxicinámicos y los flavanoles [12], [171]. Las tablas 4-4 y 4-5 muestran los valores medios de los fenoles totales, los ácidos hidroxicinámicos y los flavanoles totales de las muestras de vino en envejecimiento *sur lie* y comercial, respectivamente. Los subíndices indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre valores promedio según tiempo de envejecimiento, después de un análisis de la varianza simple (ANOVA) para cada tipo de vino espumoso y un test de rangos múltiples.

Se realizó un análisis de la varianza multifactorial (MANOVA) considerando como factores el tiempo de envejecimiento, el cupaje (A o B) y el tipo de vino (cava o Charmat). Los niveles de polifenoles totales en las muestras *sur lie* están influenciados por el tiempo y por el tipo de vino espumoso ($p<0,05$), y no hay interacción entre factores. La influencia del tiempo proviene del primer punto del muestreo, el punto cero, que es significativamente mayor que el resto de puntos, manteniéndose constantes los niveles de polifenoles totales después. Esta disminución de los polifenoles totales en el primer mes puede ser debida a la absorción de polifenoles por parte de las lías [25]. Por otra parte, los polifenoles totales iniciales (punto 0, que corresponde a una semana de envejecimiento) de las series de Charmat son más elevados que los de los cavas ($p<0.05$), cuando ambos proceden de los mismos vinos base. Esto puede ser a causa de una menor absorción en las paredes de las lías, ya que en el tiraje de los espumosos Charmat se añaden menor número de células de levadura y no se adiciona bentonita (clarificante).

Los valores de ácidos hidroxicinámicos son diferentes según el cupaje, siendo superiores para el cupaje A ($p<0,05$). A lo largo el tiempo de envejecimiento, se observa un incremento de los ácidos hidroxicinámicos. Previamente, durante la rima de vinos cava, se había reportado una disminución de los ácidos hidroxicinámicos hasta el mes 12 de envejecimiento *sur lie*, para luego aumentar progresivamente y disminuir nuevamente a partir de los dos años de envejecimiento [25]. Este comportamiento se asoció a la absorción

inicial de polifenoles por parte de la levadura, que se liberan posteriormente para finalmente oxidarse. Otros estudios sobre evolución de fenoles durante el envejecimiento *sur lie* de espumosos tradicionales y Charmat, no encontraron cambios en los ácidos hidroxicinámicos totales [10]. Es posible que los cambios encontrados se deban a reacciones de hidrólisis que aumentan el contenido en ácidos fenólicos libres [172].

Los niveles de flavanoles también se incrementan con el tiempo, no influyendo el tipo de vinos espumoso ni el cupaje ($p<0,05$). Es probable que este aumento se deba a la hidrólisis de las proantocianidinas y la aparición de flavanoles monómeros en los vinos mas que a un aumento de los flavanoles totales, ya que la reacción de la vainillina produce absorbancias más altas con la catequina monómera que con los polímeros de ésta [144], y se ha reportado un aumento de catequina con el tiempo de envejecimiento *sur lie* de cavas [31].

		Polifenoles totales (mg GAE/L)		**Hidroxicinamatos totales** (mg caf/L)		**Flavanoles totales** (mg cat/L)	
Tipo	Tiempo	A	B	A	B	A	B
Cava	0	$175,1_{a}$	$174,9_{a}$	$22,25_{ab}$	$21,33_{abc}$	$10,32_{a}$	$11,71_{a}$
	1	$161,5_{ab}$	$161,4_{a}$	$21,48_{b}$	$20,07_{b}$	$18,03_{bc}$	$13,68_{ab}$
	3	$155,3_{ab}$	$164,4_{a}$	$23,20_{bc}$	$20,91_{ab}$	$15,41_{b}$	$17,32_{ab}$
	6	$155,0_{ab}$	$161,5_{a}$	$22,12_{ab}$	$22,58_{bc}$	$14,87_{ab}$	$16,40_{ab}$
	9	$157,9_{ab}$	$160,4_{a}$	$23,62_{bc}$	$22,67_{bc}$	$16,42_{b}$	$16,55_{ab}$
	13	$150,1_{b}$	$161,3_{a}$	$23,82_{c}$	$21,79_{abc}$	$15,04_{ab}$	$19,62_{ab}$
	17	$160,0_{ab}$	$161,7_{a}$	$24,52_{c}$	$22,85_{bc}$	$22,00_{cd}$	$16,46_{ab}$
	21	$161,9_{ab}$	$155,5_{a}$	$24,65_{c}$	$21,22_{ab}$	$19,49_{bcd}$	$19,90_{b}$
	30	$160,8_{ab}$	$168,1_{a}$	$24,52_{c}$	$23,68_{c}$	$24,23_{d}$	$20,45_{b}$
Charmat	0	$199,5_{a}$	$193,8_{a}$	$21,04_{a}$	$21,15_{a}$	$13,34_{a}$	$16,37_{a}$
	1	$169,9_{b}$	$176,2_{ab}$	$22,05_{ab}$	$22,25_{a}$	$15,73_{abc}$	$18,14_{a}$
	3	$169,6_{b}$	$179,1_{ab}$	$22,61_{ab}$	$21,72_{a}$	$15,28_{ab}$	$17,75_{a}$
	6	$182,5_{ab}$	$182,3_{ab}$	$22,27_{ab}$	$23,09_{a}$	$15,70_{abc}$	$15,56_{a}$
	9	$186,1_{ab}$	$173,3_{b}$	$24,10_{b}$	$21,64_{a}$	$15,77_{abc}$	$16,78_{a}$
	13	$181,2_{ab}$	$177,4_{ab}$	$24,21_{b}$	$23,09_{a}$	$16,99_{bc}$	$19,82_{a}$
	17	$182,2_{ab}$	$183,0_{b}$	$22,91_{ab}$	$24,19_{a}$	$18,73_{c}$	$18,04_{a}$

Tabla 4-4. Valores medios de fenoles totales, hidroxicinamatos totales y flavanoles totales de vinos espumosos cava y Charmat a diferentes tiempos de envejecimiento sur lie (n=6 en cada punto de muestreo). Los subíndices diferentes indican diferencias significativas según test de rangos múltiples entre diferentes tiempos de envejecimiento (p<0,05).

Con los valores de polifenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavanoles de las muestras de vinos espumosos comerciales (sin lías) y los factores tiempo, cupaje y tipo (cava, cava reserva y Charmat) se realizaron dos análisis de la varianza multifactorial diferentes. En el primer análisis de la varianza multifactorial (Manova 1), se compararon los vinos cava (9 meses en envejecimiento *sur lie*) con los cavas reserva (17 meses de envejecimiento *sur lie*). Al igual que en el envejecimiento con lías, los valores de fenoles totales son superiores para el punto 0 de envejecimiento, y luego permanecen sin cambios ($p<0,05$). Los valores globales de fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavanoles son superiores para los cavas reserva, posiblemente por su periodo de envejecimiento *sur lie* mayor que, como se ha indicado en el apartado anterior, aumenta los niveles de ácidos hidroxicinámicos y flavanoles.

En el segundo análisis de la varianza multifactorial (Manova 2), se compararon los vinos cava con los Charmat. Ambos tipos de muestras tienen el mismo tiempo de envejecimiento en lías (9 meses), pero diferente ratio de contacto entre la lía y el vino, siendo mayor para el cava. En este caso, el factor "tipo" de vino espumoso también es importante, al igual que el tiempo de envejecimiento comercial. El cupaje sería un factor que tendría influencia en los valores de fenoles totales y los ácidos hidroxicinámicos ($p<0,05$). Los valores de fenoles totales y ácidos hidroxicinámicos del cava son superiores a los de Charmat.

		Polifenoles totales (mg GAE/L)		**Hidroxicinamatos totales** (mg caf/L)		**Flavanoles totales** (mg cat/L)	
Tipo	Tiempo	A	B	A	B	A	B
Cava	0	$194,2_{a}$	$191,4_{a}$	$23,28_{ab}$	$22,53_{a}$	$9,12_{a}$	$12,90_{a}$
	4	$162,8_{b}$	$167,3_{b}$	$21,48_{a}$	$20,78_{a}$	$9,54_{a}$	$8,55_{a}$
	8	$174,6_{ab}$	$175,8_{b}$	$23,18_{ab}$	$23,55_{a}$	$10,80_{a}$	$12,70_{a}$
	12	$182,6_{a}$	$179,3_{ab}$	$24,58_{ab}$	$19,68_{a}$	$9,84_{a}$	$8,50_{a}$
	21	$194,9_{a}$	$173,0_{b}$	$25,43_{b}$	$24,70_{a}$	$11,76_{a}$	$12,00_{a}$
Cava reserva	0	$194,8_{a}$	$192,3_{a}$	$23,70_{a}$	$23,65_{a}$	$13,81_{ab}$	$10,55_{a}$
	4	$201,5_{a}$	$189,1_{a}$	$25,10_{ab}$	$24,82_{ab}$	$13,62_{ab}$	$8,50_{ab}$
	12	$176,8_{b}$	$182,0_{a}$	$24,68_{a}$	$24,48_{ab}$	$11,55_{a}$	$9,15_{ab}$
	30	$197,5_{a}$	$184,6_{a}$	$27,78_{b}$	$26,23_{b}$	$17,15_{b}$	$7,65_{b}$
Charmat	0	$190,2_{a}$	$157,5_{a}$	$18,8_{ab}$	$17,25_{a}$	$11,75_{a}$	$8,59_{a}$
	4	$177,9_{a}$	$168,9_{a}$	$18,03_{a}$	$18,17_{a}$	$12,15_{ab}$	$11,00_{a}$
	8	$173,8_{a}$	$168,7_{a}$	$19,57_{ab}$	$18,92_{a}$	$13,25_{ab}$	$9,70_{a}$
	12	$170,7_{a}$	$163,9_{a}$	$19,15_{ab}$	$17,78_{a}$	$13,95_{ab}$	$10,50_{a}$
	21	$175,8_{a}$	$162,9_{a}$	$20,21_{b}$	$18,93_{a}$	$14,41_{b}$	$12,00_{a}$

Tabla 4-5. Valores medios de fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavanoles totales de los vinos espumosos cava y Charmat a diferentes tiempos de envejecimiento comercial (sin lías) (n=6 para cada punto de muestreo). Los subíndices diferentes indican diferencias significativas según test de rangos múltiples entre diferentes tiempos de envejecimiento ($p<0,05$).

4.1.3 Evolución del sulfito libre y total

El anhídrido sulfuroso es un aditivo antioxidante que se añade en varias etapas de la elaboración de vinos espumosos (véase apartado 2.1.1). Como compuesto antioxidante, es necesario analizarlo y tener en cuenta su concentración en estudios sobre capacidad antioxidante de vinos [173]. Se analizó el contenido en sulfito libre, el que está disponible para reaccionar y actúa de antioxidante en primer lugar, y el contenido en sulfito total, que es la suma del sulfito libre y combinado. El sulfito combinado puede estar reversible o irreversiblemente unido a otros compuestos del vino, como polifenoles (sulfito combinado reversiblemente) o aldehídos (sulfito combinado irreversiblemente). El sulfito combinado reversiblemente también puede reaccionar bajo las condiciones de los ensayos de actividad antioxidante, y su interferencia es mayor en el método FRAP que en el DPPH [174].

Los valores de sulfito libre de las muestras en envejecimiento *sur lie* son muy bajos, estando todos por debajo del límite de cuantificación del método (6 mg/L). La actividad de las levaduras genera acetaldehído que se combina irreversiblemente con el sulfito libre, lo que puede ser la causa de tan bajos niveles en estas muestras [41]. En los vinos espumosos en envejecimiento comercial sólo se encuentran valores de sulfito libre por encima de 6 mg/L en los puntos iniciales y a los cuatro meses de envejecimiento, 0 y 4 meses respectivamente (tabla 4-6).

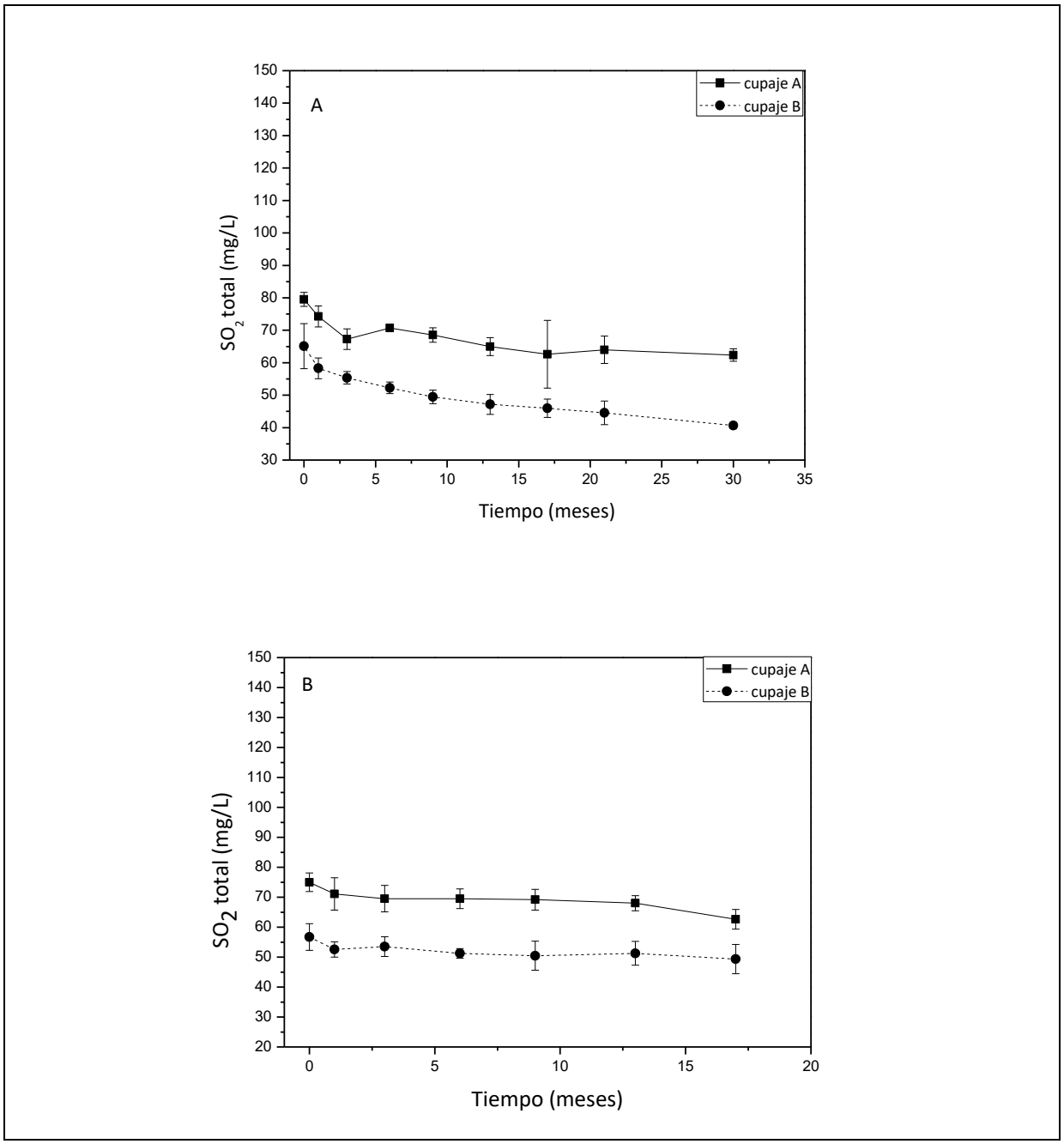
Tipo	Tiempo	A	B
Cava	0	18_a	17_a
	4	11_b	10_b
Cava reserva	0	18_a	15_a
	4	7_b	9_b
Charmat	0	18_a	22_a
	4	7_b	7_b

Tabla 4-6. Valores promedio de sulfito libre (mg/L) de los vinos espumosos en envejecimiento comercial (sin lías) (n=4). Los subíndices diferentes indican diferencias significativas según test de rangos múltiples entre diferentes tiempos de envejecimiento (p<0,05).

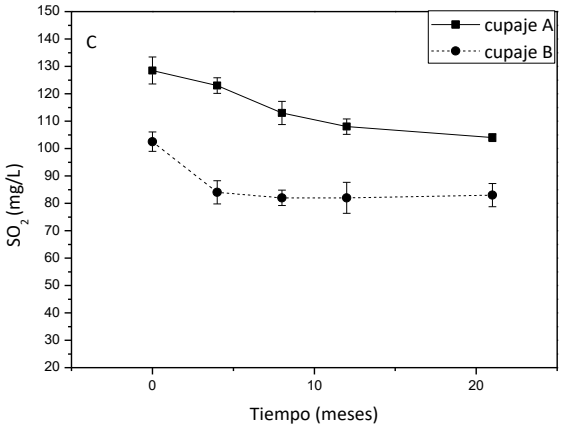
Las figuras 4-1 y 4-2 muestran la evolución del contenido en sulfito total de las muestras de vinos espumosos. Los valores iniciales son significativamente más bajos ($p<0,05$) en las muestras en envejecimiento *sur lie* respecto a las muestras comerciales, debido a que las segundas provienen de un degüelle en el que se ha añadido el licor de expedición que contiene sulfito. También existen diferencias en cuanto al cupaje; el cupaje A tiene valores más altos que el B ($p<0,05$), siendo esta diferencia mayor para las muestras en envejecimiento *sur lie*, alrededor del 25 %, debido a que el vino base de cupaje A contenía mayores valores de sulfito total (tabla 4-1).

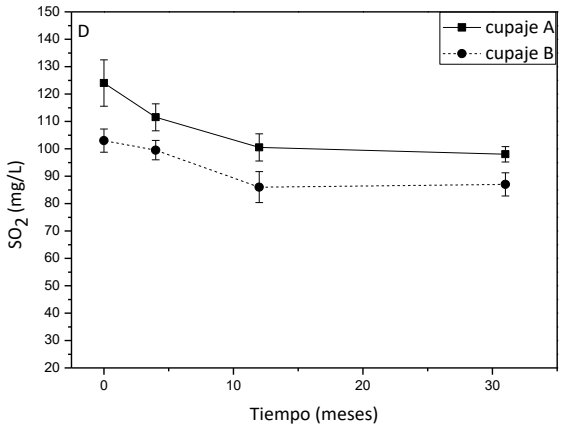
Tanto en envejecimiento en lías como comercial, a excepción de las muestras en envejecimiento *sur lie* de Charmat, en los cuatro primeros meses hay un descenso significativo ($p<0,05$) en los valores del sulfito total, igual que ocurre para el sulfito libre de vinos espumosos comerciales. Esto se justifica por la entrada de oxígeno inicial al embotellar las muestras, que reacciona en primer lugar con el sulfito libre, y a medida que éste se va gastando, con el sulfito combinado reversiblemente.

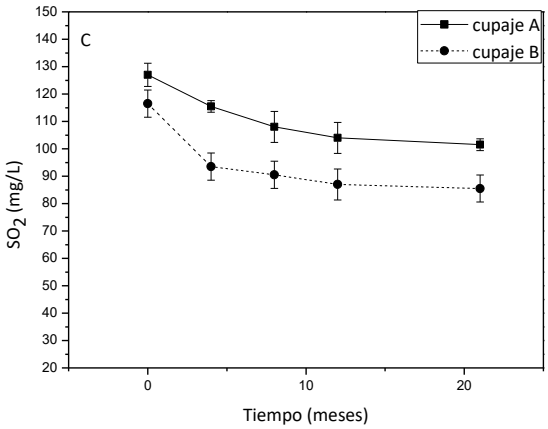
Las ratios de disminución en los vinos espumosos cava en rima se estabilizan a partir del mes 9 de envejecimiento, disminuyendo por debajo de 1 mg/L al mes, mientras que los Charmat permanecen constantes a lo largo de todo el envejecimiento. Para los vinos espumosos comerciales, la ratio de descenso promedio después de 4 meses de envejecimiento es algo mayor; 2 mg/L al mes para cava y 1,5 mg/L al mes para reserva y Charmat. Estas disminuciones son pequeñas comparadas con las que se ha encontrado en vinos blancos almacenados a 28 ºC, donde se han observado pérdidas de sulfito total de 24 mg/L al mes [175].



Figuras 4-1. Valores promedio y desviaciones estándar de los contenidos en sulfito total de los vinos espumosos en envejecimiento en lías (figura A: cava, figura B: Charmat); n=4.







Figuras 4-2. Valores promedio y desviaciones estándar del contenido en sulfito total de los vinos espumosos comerciales (sin lías) (figura C: cava envejecido 9 meses, figura D: cava reserva, figura E: Charmat); n=4.

4.1.4 Evolución de la actividad antioxidante

Las tablas 4-7 y 4-8 muestran los valores medios de las actividades antioxidantes medidas con los métodos FRAP y DPPH de las muestras de vino en envejecimiento *sur lie* y comercial, respectivamente. Los subíndices indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre valores promedio según tiempo de envejecimiento después de la aplicación de un análisis de la varianza simple y un test de rangos múltiples. Los resultados de las actividades antioxidantes obtenidos mediante los dos métodos aplicados mostraron valores comparables y una correlación global significativa (coeficiente de correlación $r=0,70$, $p<0,05$). Los mayores valores globales de actividad antioxidante de las muestras comerciales se deben a su mayor contenido en sulfito total (40 % más en promedio).

Se realizó un análisis multifactorial con los datos de actividades antioxidantes de los vinos espumosos en envejecimiento con lías (tabla 4-7) como variables dependientes, y como factores tiempo, cupaje y tipo de vino espumoso (cava o Charmat). Se observó interacción entre factores. El tipo de vino espumoso en elaboración es un parámetro que afecta a su actividad antioxidante ($p<0,05$). El tiempo de envejecimiento *sur lie* no tiene influencia, y la actividad antioxidante no cambia. Estos resultados no están de acuerdo con los obtenidos por Stefenon [10], que observa un descenso en la actividad antioxidante a lo largo del envejecimiento en lías de vinos cava y Charmat. El cupaje sería un factor que sí influirían en el caso de las actividades antioxidantes medidas por FRAP, siendo los valores promedios de A superiores a los de B ($p<0,05$), probablemente por las mayores cantidades de sulfito del cupaje A.

		FRAP (µM TEQ)		DPPH (µM TEQ)	
Tipo	Tiempo	A	B	A	B
cava	0	$613,2_{ab}$	$612,9_{a}$	$191,3_{a}$	$172,0_{a}$
	1	$606,4_{ab}$	$564,5_{b}$	$177,8_{ab}$	$165,5_{a}$
	3	$610,9_{ab}$	$615,6_{a}$	$170,1_{ab}$	$169,8_{a}$
	6	$581,2_{a}$	$597,9_{a}$	$175,4_{ab}$	$167,6_{a}$
	9	$597,8_{ab}$	$599,8_{a}$	$181,0_{ab}$	$167,2_{a}$
	13	$628,5_{b}$	$568,5_{b}$	$187,1_{ab}$	$169,6_{a}$
	17	$629,8_{b}$	$614,4_{a}$	$183,5_{ab}$	$169,3_{a}$
	21	$629,2_{b}$	$593,0_{ab}$	$167,8_{b}$	$166,4_{a}$
	30	$589,4_{a}$	$613,0_{a}$	$183,4_{ab}$	$177,5_{a}$
Charmat	0	$820,5_{ab}$	$788,5_{a}$	$190,6_{ab}$	225,9a
	1	$772,1_{a}$	$766,9_{ab}$	$177,7_{a}$	210,4ab
	3	$785,8_{a}$	$750,3_{ab}$	$198,4_{ab}$	212,7ab
	6	$843,3_{ab}$	$761,7_{ab}$	$202,1_{ab}$	218,9ab
	9	$869,0_{a}$	$740,7_{b}$	$222,6_{b}$	211,8b
	13	$836,2_{ab}$	$775,0_{ab}$	$190,6_{ab}$	217,3ab
	17	$837,6_{ab}$	$780,4_{ab}$	$195,7_{ab}$	213,9ab

Tabla 4-7. Valores medios de actividad antioxidante medida con los métodos FRAP y DPPH de los vinos espumosos cava y Charmat a diferentes tiempos de envejecimiento sur lie (n=6 para cada punto de muestreo). Los subíndices diferentes indican diferencias significativas según test de rangos múltiples en función del tiempo de envejecimiento (p<0,05).

En la tabla 4-8 se pueden ver los resultados de actividades antioxidantes promedio de los vinos espumosos en envejecimiento comercial (sin lías). Al igual que con los datos de polifenoles, también se realizaron dos análisis de la varianza multifactorial con los valores de actividades antioxidantes de los vinos espumosos en envejecimiento comercial como variable dependiente y como factores el tiempo en envejecimiento comercial, el cupaje y el tipo de vino espumoso (cava, cava reserva, Charmat). Se observó interacción en ambos análisis

multifactoriales. El tiempo y el tipo de vino espumoso fueron factores que mostraron influencia significativa ($p<0,05$).

Las comparaciones de las evoluciones de actividades antioxidantes entre vinos espumosos con lías (envejecimiento *sur lie*), y vinos espumosos sin lías (envejecimiento comercial), se ha realizado de manera observacional y descriptiva. Como se indicó al principio del apartado actual, los vinos espumosos comerciales parten de unos niveles superiores de actividad antioxidante que se relacionan con los mayores valores de sulfito total.

En las evoluciones individuales de cada serie de vino espumoso comercial se puede ver que en el caso de los cavas reserva y Charmat, la capacidad antioxidante tiende a disminuir con el tiempo, a diferencia de lo que ocurría durante la rima, donde se mantenían constantes a lo largo de todo el envejecimiento. Las disminuciones de sulfito total son pequeñas y similares entre periodo *sur lie* y comercial, por lo que es de suponer que afecten en la misma medida. Para las dos series de cava comercial (9 meses en envejecimiento *sur lie*), no se observan cambios en la actividad antioxidante con el tiempo.

		FRAP (µM TEQ)		DPPH (µM TEQ)	
Tipo	Tiempo	A	B	A	B
Cava	0	$1071,0_{a}$	$1027,8_{a}$	$247,8_{a}$	$237,0_{a}$
	4	$738,5_{d}$	$918,7_{b}$	$219,1_{b}$	$209,0_{b}$
	8	$970,3_{b}$	$954,7_{b}$	$210,6_{b}$	$216,0_{b}$
	12	$989,2_{ac}$	$949,8_{b}$	$212,1_{b}$	$212,2_{b}$
	21	$974,8_{b}$	$971,0_{ab}$	$216,5_{b}$	$201,7_{b}$
Cava reserva	0	$998,3_{a}$	$1176,0_{a}$	$241,0_{a}$	$235,3_{a}$
	4	$918,0_{b}$	$1017,5_{b}$	$200,1_{b}$	$213,5_{b}$
	12	$797,7_{c}$	$1004,3_{b}$	$185,4_{b}$	$215,6_{b}$
	30	$771,7_{c}$	$853,3_{c}$	$172,5_{b}$	$197,3_{b}$
Charmat	0	$971,2_{a}$	$876,7_{a}$	$230,4_{a}$	$200,4_{a}$
	4	$800,8_{bc}$	$789,7_{b}$	$198,0_{b}$	$182,1_{ab}$
	8	$787,7_{bc}$	$715,0_{cd}$	$208,0_{b}$	$179,7_{ab}$
	12	$829,2_{b}$	$746,7_{c}$	$204,7_{b}$	$168,3_{b}$
	21	$760,0_{c}$	$693,8_{d}$	$206,6_{b}$	$167,6_{b}$

Tabla 4-8. Valores medios de actividades antioxidantes medidas con FRAP y DPPH de los vinos espumosos cava y Charmat a diferentes tiempos de envejecimiento comercial (sin lías) (n=6). Los subíndices diferentes indican diferencias significativas según test de rangos múltiples en función del tiempo de envejecimiento (p<0,05).

Se realizaron correlaciones de Pearson entre los valores de actividad antioxidante y la composición de las muestras en envejecimiento *sur lie* y comercial (tabla 4-9). Sólo se encontraron correlaciones significativas (p<0,05) entre la actividad antioxidante y el contenido en polifenoles totales en el caso del periodo *sur lie*, y entre la actividad antioxidante y los polifenoles totales y ácidos hidroxicinámicos (FRAP) en el periodo comercial. Estas correlaciones fueron más pequeñas que las obtenidas por otros autores [12], aunque en otros casos no se encontró correlación significativa alguna [14].

		FRAP (µM TEQ)	DPPH (µM TEQ)
Sur lie n=96	Fenoles totales	0,52	0,58
	Hidroxicinamatos	-	-
	Flavanoles	-	-
Comercial (sin lías) n=84	Fenoles totales	0,25	0,38
	Hidroxicinamatos	0,43	-
	Flavanoles	-	-

Tabla 4-9. Valores R^2 de las correlaciones obtenidas entre la actividad antioxidante y el contenido en fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos, y flavanoles totales, para los dos periodos de envejecimiento de las muestras de vino espumoso (p<0,05).

4.1.5 Conclusiones del capítulo

A diferencia de los vinos tranquilos, donde la capacidad antioxidante muestra una alta correlación con el contenido en fenoles [176], [177], en los vinos espumosos esta correlación es mucho menor. Esta menor correlación se debe a que el contenido en fenoles totales es muy inferior, por lo que otras sustancias que contenga el vino espumoso pueden cobrar importancia en el cómputo global de su actividad antioxidante. Tal es el caso del sulfito total, que influye en los niveles de actividad antioxidante iniciales en los vinos espumosos, pero no en su evolución.

Los vinos espumosos se caracterizan por un envejecimiento biológico en sus propias lías, en el cual se produce el proceso de autolisis. Este proceso implica una cesión de compuestos de la lía al vino, tanto de la pared como del citoplasma, algunos de los cuales pueden poseer capacidad antioxidante [13]. Durante el envejecimiento *sur lie*, la actividad antioxidante de los vinos espumosos no cambia. Sin embargo, una vez se retiran, en los cavas reserva y en los espumosos Charmat se observa un descenso en la actividad antioxidante. Este descenso no ocurre en los cavas comerciales envejecidos 9 meses.

El efecto protector de la presencia de lías sobre la actividad antioxidante se produce, por lo tanto, en los espumosos con menor contacto con lías (Charmat), y en los vinos espumosos que han sufrido una oxidación mayor (reserva), es decir, en los vinos espumosos más desprotegidos. La presencia de las lías puede modular la actividad antioxidante de los vinos espumosos, dotándolos de compuestos que pueden ejercer un efecto protector sobre la actividad antioxidante durante el envejecimiento *sur lie*.

4.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y POBLACIONAL

4.2.1 Visualización por microscopía óptica confocal

Las figuras 4-3, 4-4, 4-5 y 4-6 muestran imágenes de microscopía óptica confocal de contraste de fases representativas de las muestras de primera fermentación, segunda fermentación del cava, Charmat y Levaduras Secas Inactivas (LSI), respectivamente. Todas las muestras tienen tamaños similares, con 5 µm de diámetro largo y 3 µm de diámetro estrecho, y la forma ovoide típica de *S. cerevisiae*. La pared celular está íntegra.

En las imágenes de primera fermentación del cava se puede observar que contienen residuos sólidos, que probablemente correspondan a cristales de bitartrato de potasio. Las lías de segunda fermentación del cava aparecen más heterogéneas que las del Charmat, pudiéndose ver restos celulares entre células intactas. Finalmente, las muestras de Levaduras Secas Inactivas (LSI) aparecen aglomeradas bajo el microscopio, lo que puede ser un resultado del propio proceso de producción de estas muestras comerciales, el *spray-drying*.

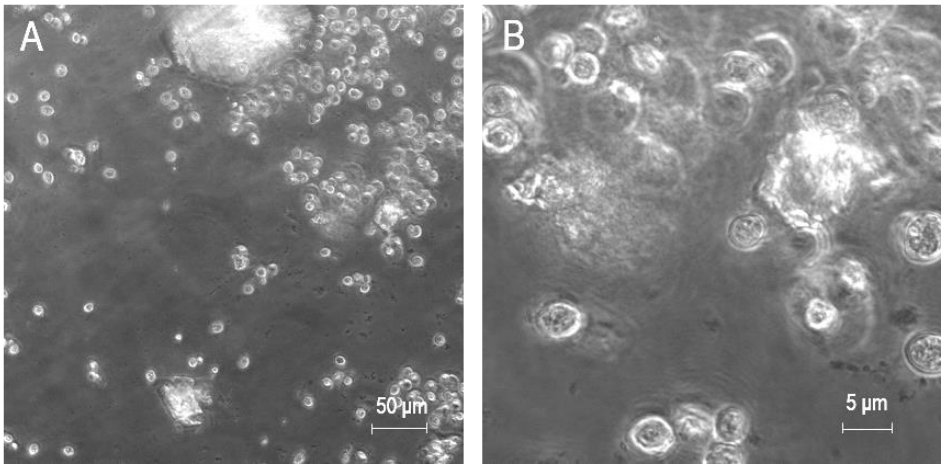


Figura 4-3. Imágenes representativas (n=10) de microscopía óptica confocal de las lías de primera fermentación.

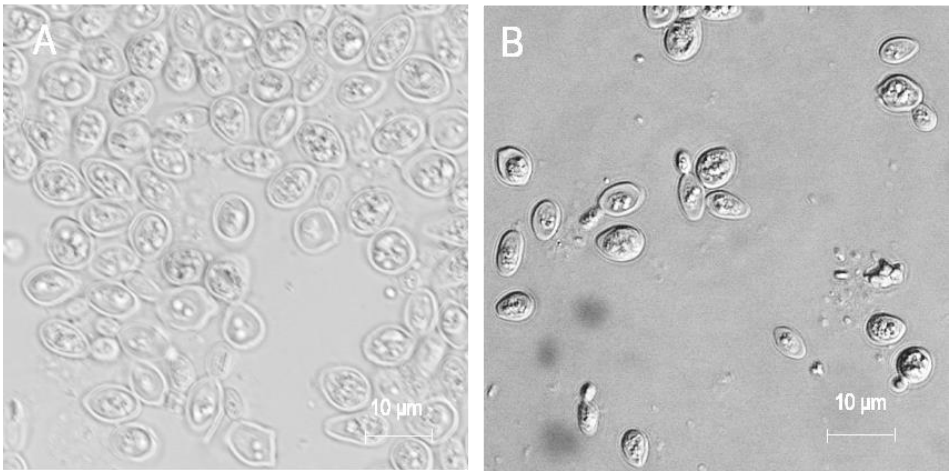


Figura 4-4. Imágenes representativas (n=10) de microscopía óptica confocal de las lías de segunda fermentación.

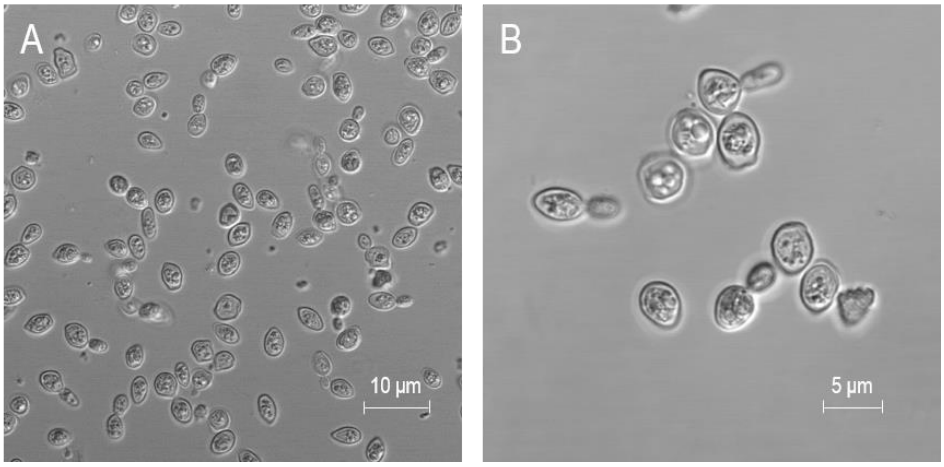


Figura 4-5. Imágenes representativas (n=10) de microscopía óptica confocal de las lías de segunda fermentación del Charmat.

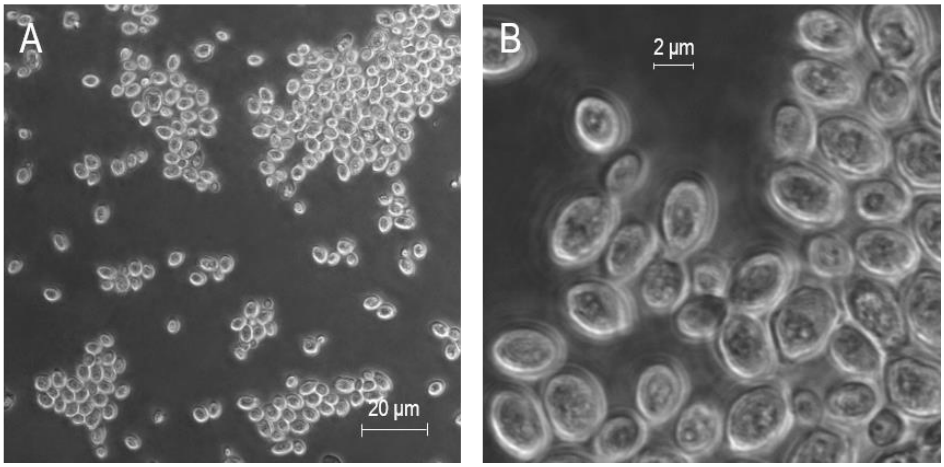


Figura 4-6. Imágenes representativas (n=10) de microscopía óptica confocal de las muestras de Levaduras Secas Inactivas (LSI).

4.2.2 Caracterización de las lías por citometría de flujo

Saccharomyces cerevisiae ha sido la levadura más investigada mediante el uso de la citometría de flujo, haciéndose especial énfasis en su ciclo celular [151]. De este conocimiento científico se ha derivado la aplicación de la citometría de flujo a la monitorización, optimización y control de calidad en fermentaciones industriales. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha empleado en el estudio de los subproductos de estas industrias.

En este trabajo se han utilizado dos tipos de citómetros de flujo: Multisizer TM Coulter Counter (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA), citómetro de medida por impedancia con el que se han analizado tamaños celulares, y Beckman Coulter Gallios (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA), citómetro de medida por láser con el que se han determinado parámetros de dispersión y fluorescencia. La citometría de flujo se ha utilizado para la cuantificación de células, la determinación de los tamaños relativos y la granulosidad del citoplasma, y la caracterización de la disrupción celular de muestras de lías recuperadas de la elaboración de vinos espumosos y de una levadura seca inactiva comercial. Adicionalmente, las muestras se han marcado con dos tinciones fluorescentes de ácidos nucleicos (SYTO 13 y yoduro de propidio) para la cuantificación de la posible viabilidad celular.

4.2.2.1 Evaluación inicial de la ruptura celular

El citómetro Multisizer TM Coulter Counter se utilizó en una fase inicial para evaluar el tiempo necesario de disrupción en molino de bolas a fin de conseguir una rotura máxima. Estas pruebas se realizaron sobre lía de segunda fermentación del cava. Las figuras 4-7 - 4-11 muestran los histogramas de distribución de partículas por tamaño de las suspensiones de lías de segunda fermentación del cava sin lavar y lavadas, y de sus suspensiones después de la disrupción en molino; lías rotas, paredes y citoplasma.

En las figuras 4-7 y 4-8 puede observarse que la distribución de tamaños de la suspensión de lías enteras se ajusta a una curva de Gauss, con un valor promedio de 4 µm. Esto indica que la población de células es bastante homogénea, aunque no es simétrica, porque hay un mayor número de partículas pequeñas. Después de lavar la suspensión (figura 4-17), disminuyen estas partículas pequeñas.

Las figuras 4-9, 4-10 y 4-11 muestran la distribución de tamaños después de la disrupción celular. La distribución de las lías rotas y las paredes es muy similar. Aunque el equipo no puede detectar tamaños inferiores a 2 µm, puede verse también aquí una curva gaussiana de distribución, con valores promedio inferiores a 3 µm y mayor número de partículas pequeñas. La distribución de tamaños en el citoplasma es mucho más amplia, con

predominio de partículas pequeñas, inferiores a 3 µm, pero también con partículas más grandes, alrededor de 7 µm.

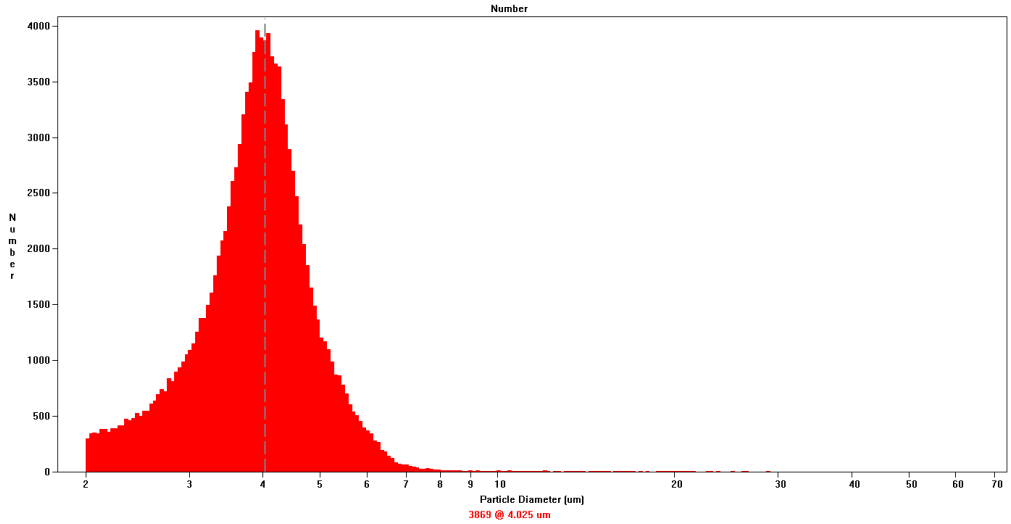


Figura 4-7. Histograma representativo (n=6) de la distribución de suspensión de lías brutas en vino modelo.

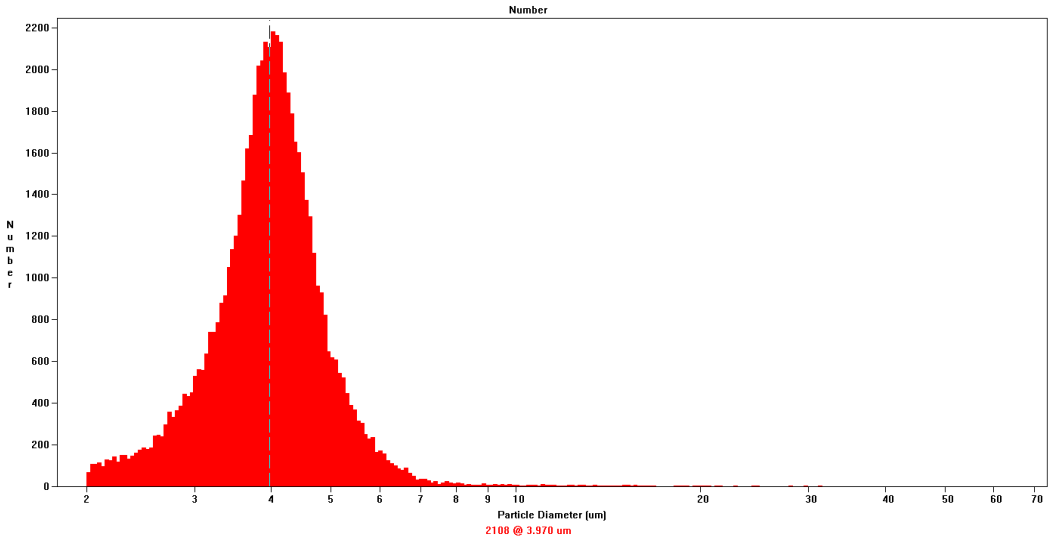


Figura 4-8. Histograma representativo (n=6) de la distribución de partículas de la suspensión de lías netas en vino modelo.

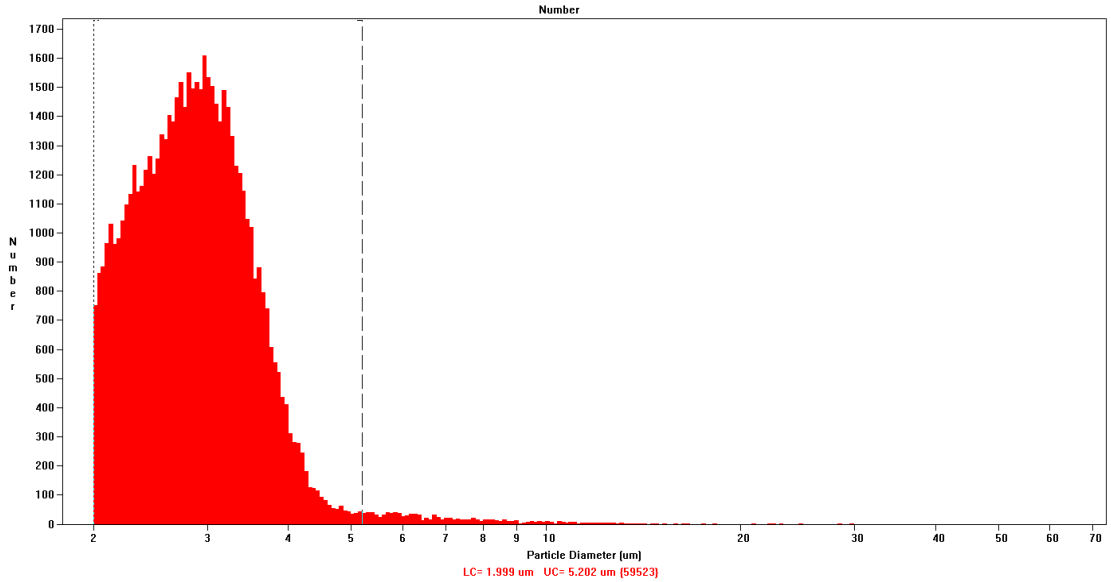


Figura 4-9. Histograma representativo (n=6) de distribución de partículas de la suspensión de lías rotas en vino modelo.

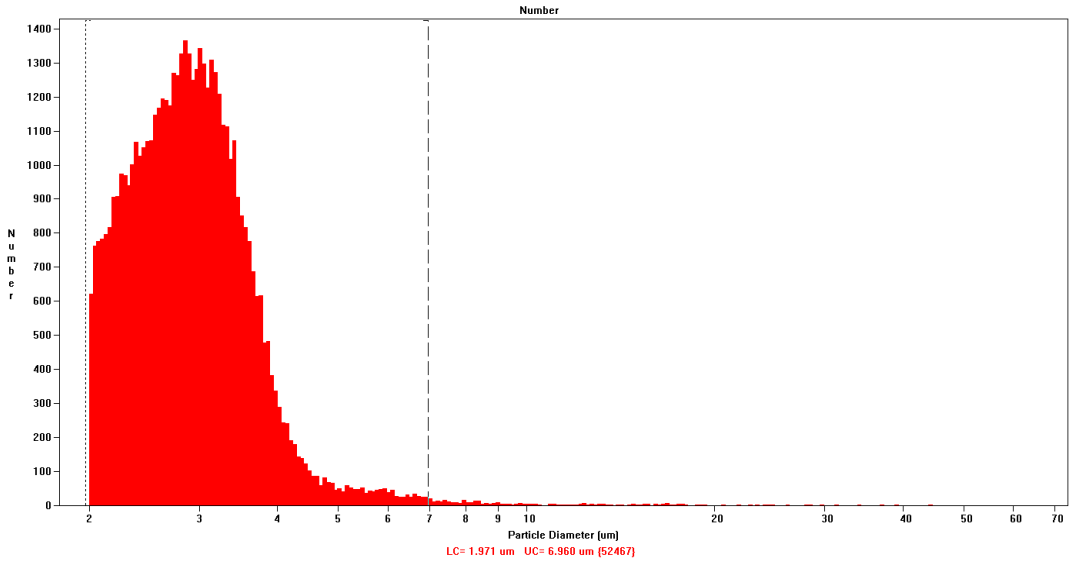


Figura 4-10. Histograma representativo (n=6) de distribución de partículas en la suspensión de paredes de levaduras en vino modelo.

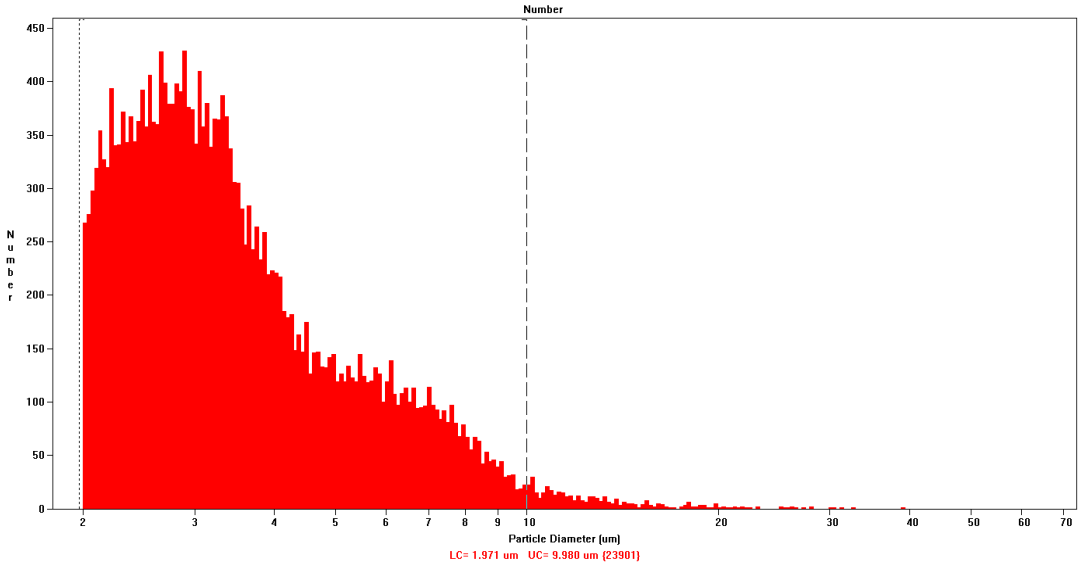


Figura 4-11. Histograma representativo (n=6) de la distribución de partículas en el citoplasma.

Para calcular el grado de disrupción celular, se tomaron los tamaños entre 3 y 5 µm como intervalo de células "enteras", ya que por microscopía confocal se vio que eran los tamaños más habituales de las células. Para cuantificar el valor de partículas total, se tomó el intervalo entre 2 y 8 µm.

De esta manera, se calculó el porcentaje de células enteras como:

$$\%\ CE = \left({}^{nº\ células\ enteras}/_{nº\ total\ de\ partículas}\right) \cdot 100$$

El porcentaje de células rotas como:

$$\%\ CR = 100 - \%\ células\ enteras$$

Y finalmente, la ratio de rotura como:

$$RR = {}^{\%\ células\ rotas}/_{\%\ células\ enteras}$$

El porcentaje de lías enteras de las suspensiones iniciales (sin tratamiento de disrupción) fue del 71 %, con una desviación estándar del 3 %.

Para determinar la concentración y el tiempo adecuado de disrupción, se midieron y calcularon los porcentajes de rotura y el diámetro promedio de las curvas gaussianas a diferentes concentraciones de células en suspensión (50, 150, 250, 350, 450 y 550 mg/mL en peso fresco), y a diferentes tiempos de tratamiento en molino de bolas (0, 10, 20 30 y 40 minutos), a 30 Hz de frecuencia (máxima frecuencia de vibración del instrumento).

En las gráficas 4-12 y 4-13 se representan las ratios de rotura y los diámetros medios de las distribuciones de partículas según tiempo de disrupción, respectivamente.

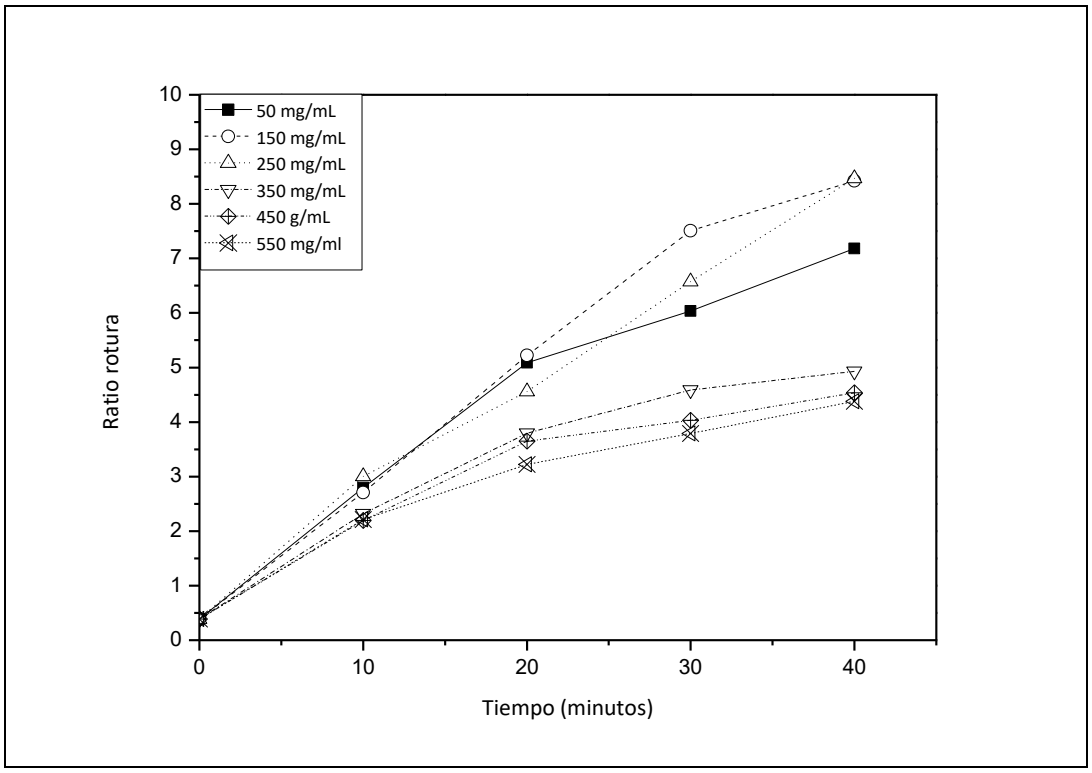


Figura 4-12. Ratio de rotura según tiempo de disrupción en molino de bolas de las diferentes concentraciones de lías. Cada punto corresponde a 6 suspensiones (n=6).

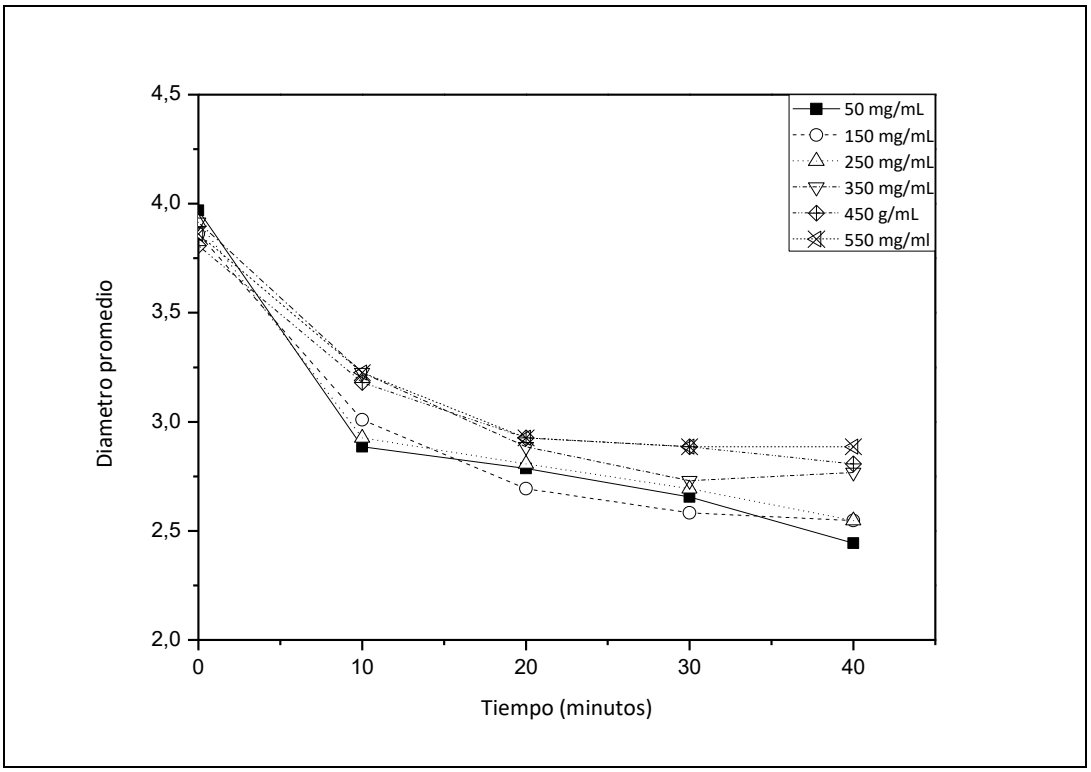


Figura 4-13. Diámetro promedio de rotura según tiempo de disrupción en molino de bolas de las diferentes concentraciones de lías. Cada punto corresponde a 6 suspensiones (n=6).

En la figura 4-12 se puede observar que el ratio de ruptura aumenta linealmente con el tiempo de disrupción. Además, las diferentes concentraciones de suspensiones de lías se dividen en dos grupos: las de concentración más baja (50-250 mg/L), y las de concentración más alta (350-550 mg/L). Las concentraciones más bajas se rompen en mayor medida que las más altas. Dentro de este grupo, las concentraciones de 150 mg/mL y 250 mg/mL durante 40 minutos de disrupción alcanzarían la rotura mayor.

No obstante, se observó que este tiempo tan largo de dirupción en molino implicaba un aumento de la temperatura del vial donde estaba contenida la suspensión, por lo que se eligió un tiempo de disrupción de 30 minutos. Con este tiempo de tratamiento en molino, las suspensiones de 150 mg/mL son las que experimentan una disrupción mayor, pero se prefirió finalmente la concentración de 250 mg/mL porque se observó que era más adecuada para las determinaciones químicas posteriores.

Por lo tanto, las condiciones de disrupción que se aplicaron para el resto de muestras fueron una concentración de 250 mg/mL (en peso húmedo) y 30 minutos de disrupción en molino de bolas a 30 Hz. A esta suspensión inicial le corresponde una concentración de lías de segunda fermentación de cava de 1,4E+10 células enteras/g seco, que después de la disrupción baja a 0,18E+10 células enteras/g seco.

4.2.2.2 Señales de dispersión

Las señales de dispersión se correlacionan con la naturaleza celular y las propiedades de refracción, como características superficiales y estructura interna. Las señales de dispersión son características de cada partícula, por lo que pueden utilizarse para distinguir entre diferentes tipos de células en muestras heterogéneas o con restos celulares [178].

El tamaño relativo de las muestras se ha estimado con los valores de dispersión frontal ("Forward-Scattered light"), y la granulosidad o complejidad del citoplasma con la dispersión lateral ("Sideways-Scattered light"). Estas señales de dispersión se han utilizado para cuantificar el número de células en las suspensiones mediante un *gattering* en el citograma de dispersión frontal (FS) vs. dispersión lateral (SS). El porcentaje de partículas de esta selección se ha considerado como el porcentaje de "células enteras" de las muestras. En las figuras 4-14 y 4-15 pueden verse los citogramas biparamétricos de dispersión obtenidos antes y después de la disrupción, y en las figuras 4-16 y 4-17 los histogramas de dispersión, respectivamente. Todos ellos son imágenes representativas de todas las medidas realizadas.

Comparando las gráficas de dispersión antes de la disrupción (figura 4-14), se puede observar que la muestra más heterogénea y con más restos (celulares o de vino) es la de lías de primera fermentación. Tanto en los histogramas de dispersión frontal "FS" como de dispersión lateral "SS", se advierte una población principal de células y una subpoblación, menos numerosa. Después de la disrupción, desaparece la población de células y se incrementa esta zona, lo que indica que se tratan principalmente de restos celulares. Aunque en menor medida que las de primera fermentación, las lías de segunda fermentación también aparecen heterogéneas en los gráficos, con una zona pequeña de restos celulares que se

incrementa después de la disrupción. Como era esperable, las muestras más homogéneas en cuanto a contenido celular son las de Charmat y las LSI.

Las muestras de Charmat en los histogramas de FS muestran dos poblaciones, solapadas entre sí, que no se observan en los histogramas de SS. Las de mayor tamaño relativo (mayor valor de FS) probablemente correspondan a células en diferentes estadios de gemación. Mientras que, en todas las muestras de lías la curva de gaussiana característica de las poblaciones microbianas desaparece, en las muestras comerciales (LSI) se hace más ancha y aparecen restos celulares. Esto indica que la disrupción ha sido extensa en las muestras de lías, pero mucho menor en las muestras de Levaduras Secas Inactivas (LSI). Este menor grado de disrupción bajo las mismas condiciones de ruptura del molino puede deberse no sólo a las propias características de estas paredes, sino también al hecho de que las células están aglomeradas, como pudo observarse en las imágenes de microscopía confocal.

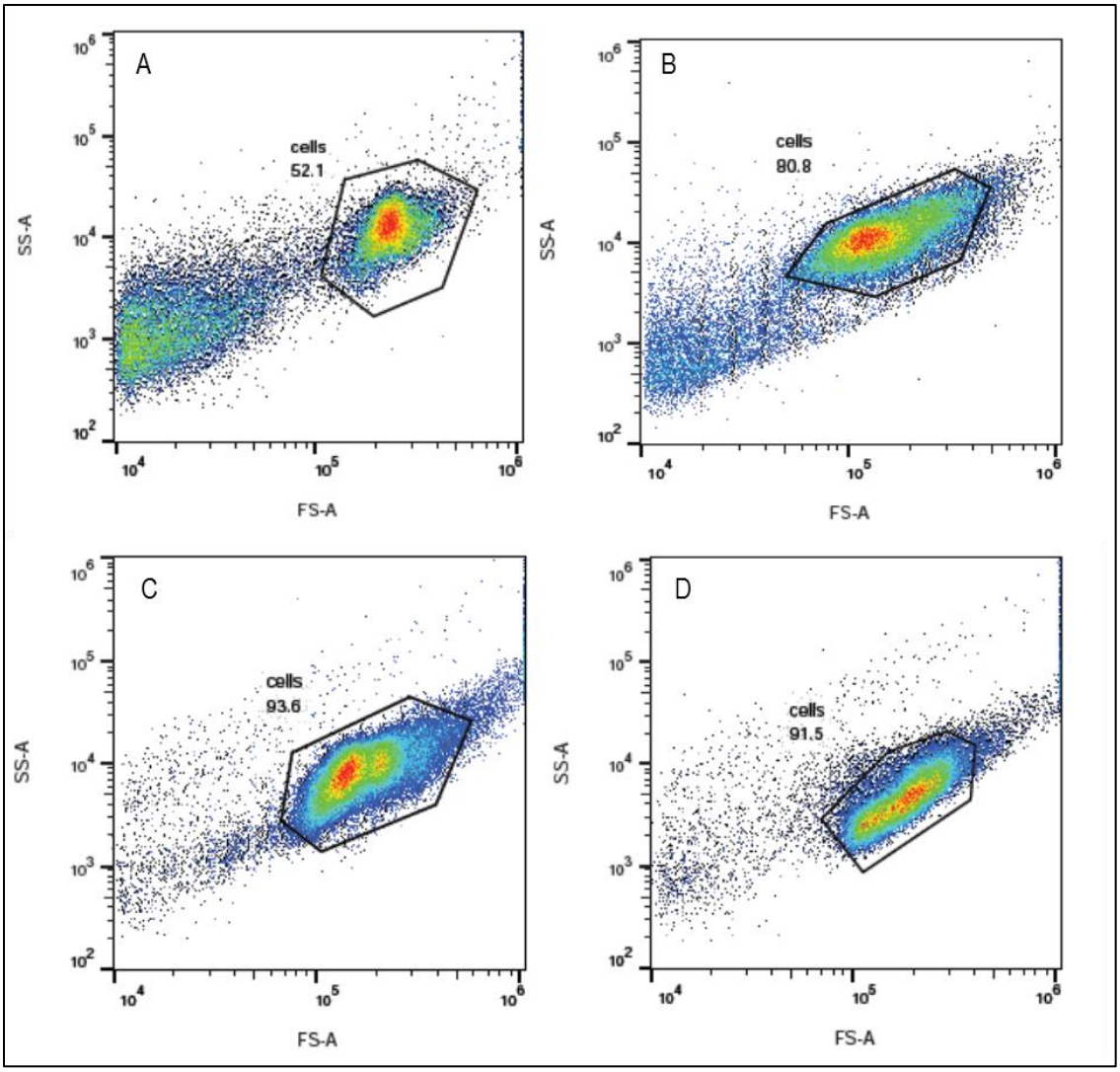


Figura 4-14. Citogramas biparamétricos de las señales de dispersión de las muestras antes de la disrupción; (A) lías de primera fermentación del cava; (B) lías de segunda fermentación del cava, (C) lías de segunda fermentación del Charmat, y (D) Levaduras secas inactivas LSI, (unidades logarítmicas).

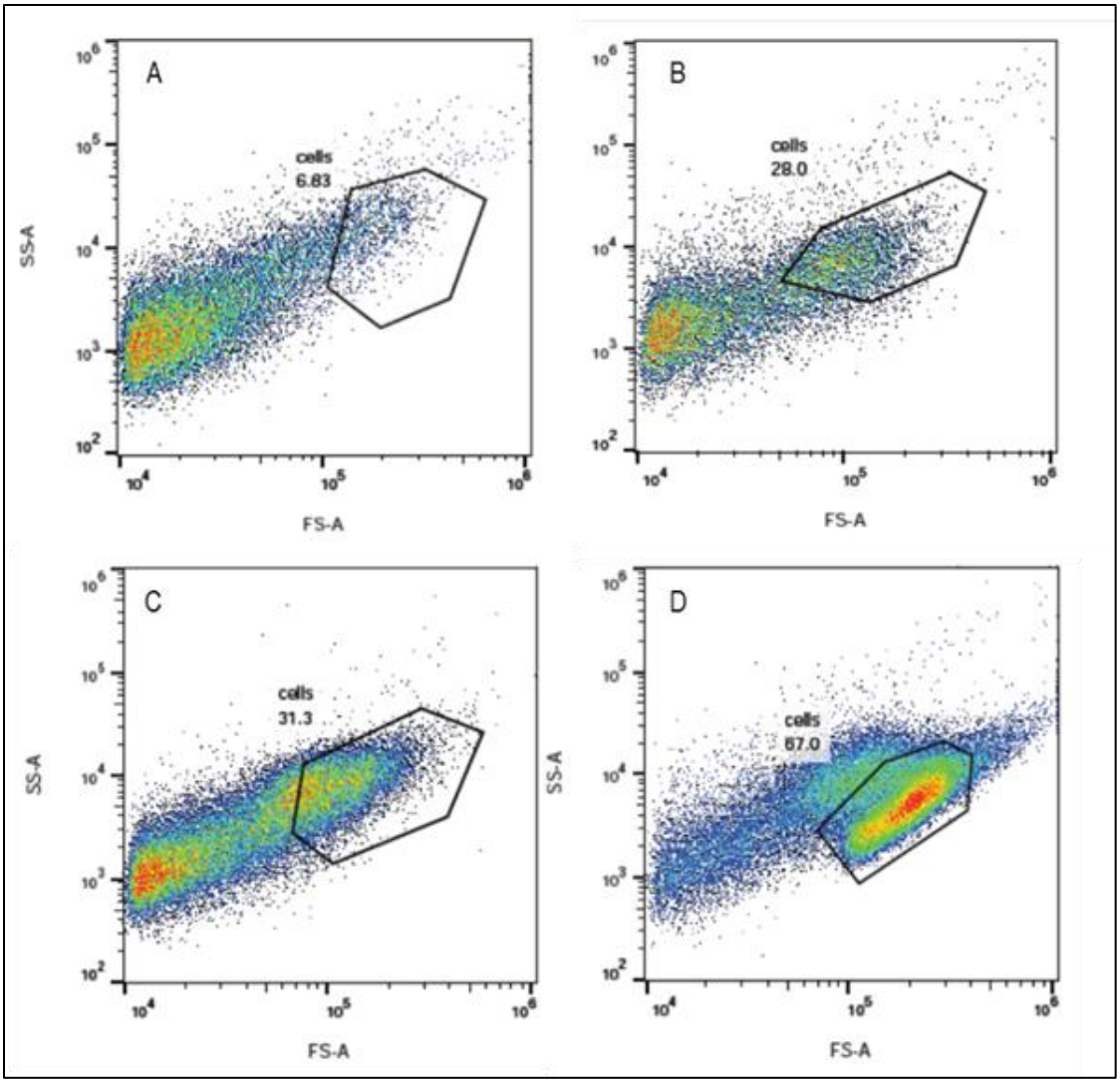


Figura 4-15. Citograma biparamétrico de las señales de dispersión de las muestras después de la disrupción; (A) lías de primera fermentación del cava; (B) lías de segunda fermentación del cava, (C) lías de segunda fermentación del Charmat, y (D) Levaduras secas inactivas LSI (unidades logarítmicas).

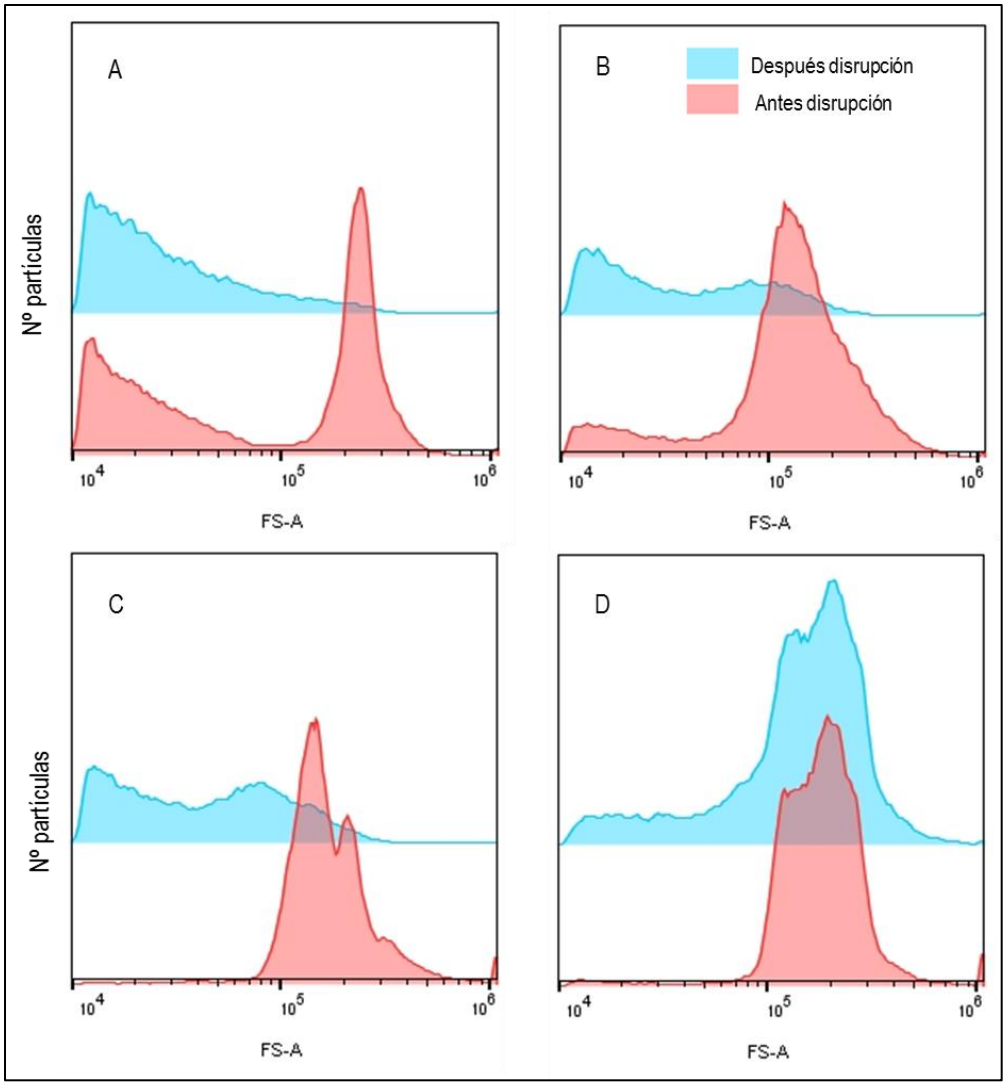


Figura 4-16. Histogramas de las señales de dispersión frontal (log FS vs. número de partículas) de las muestras antes (área roja) y después de la disrupción (área azul); (A) lías de primera fermentación del cava; (B) lías de segunda fermentación del cava, (C) lías de segunda fermentación del Charmat, y (D) Levaduras secas inactivas (LSI).

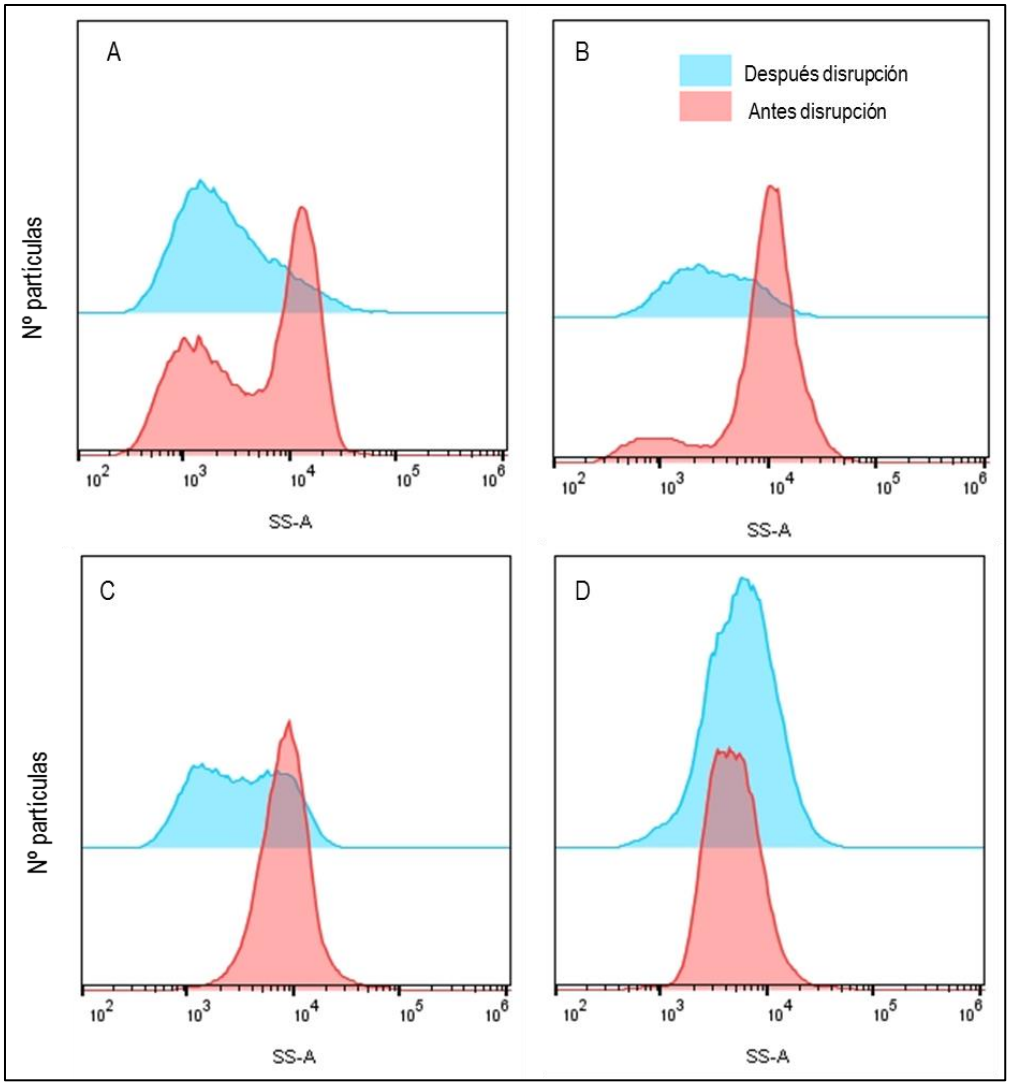


Figura 4-17. Histogramas de las señales de dispersión lateral (log SS vs. número de partículas) de las muestras antes (área roja) y después de la disrupción (área azul); (A) lías de primera fermentación del cava; (B) lías de segunda fermentación del cava, (C) lías de segunda fermentación del Charmat, y (D) Levaduras secas inactivas (LSI)

Como se indicó anteriormente, el porcentaje de partículas obtenidos de los *gattering* realizados en los citogramas bidimensionales de dispersión (FS frente a SS; figura 4-14), se consideró como el porcentaje de células enteras (% CAD). El mismo *gattering* se realizó en los citogramas bidimensionales de dispersión de las muestras después de la disrupción (figura 4-15), obteniéndose el porcentaje de células después de la disrupción (% CDD). Con estos datos, se hallaron los porcentajes de rotura promedios (% RP) según la fórmula:

$$\% \text{ RP} = \frac{\% \text{ CAD} - \% \text{ CDD}}{\% \text{ CAD}} \cdot 100$$

La tabla 4-10 muestra los valores medios y las desviaciones estándar de células por gramo de peso seco, el porcentaje de células antes de la disrupción, el porcentaje de células después de la disrupción y el porcentaje de ruptura celular de cada una de las muestras. Las muestras de primera fermentación son las que tienen el menor número de células por gramo seco, posiblemente porque contienen restos celulares y tartratos de la primera fermentación. A diferencia de éstas, las muestras de Charmat tienen el número de células por gramo seco más alto, probablemente porque estas muestras han sufrido una autolisis más corta (hay menos restos celulares), y además no contienen bentonitas. Como ya se podía ver en los histogramas de FS y SS, las células que han sufrido una extensión mayor de rotura son las de primera fermentación, mientras que las Levaduras Secas Inactivas (LSI) son las que han resistido mejor las condiciones del molino.

Comparando las concentraciones de células de las muestras de lías de segunda fermentación de cava con las obtenidas previamente con el citómetro Multisizer (1,48E+10 células/g seco), se puede ver que el citómetro Gallios mide alrededor de un 20 % menos de células para la misma concentración inicial.

Muestra	Células/g DW	% CAD	% CDD	% RP
1ª Fermentación	$1{,}67E{+}09_a$	56_a	8_a	86_a
2ª Fermentación	$1{,}12E{+}10_b$	83_b	29_b	65_b
Charmat	$2{,}76E{+}10_c$	96_c	31_b	68_b
Levaduras secas inactivas	$2{,}30E{+}09_a$	93_c	65_c	30_c

Tabla 4-10 Número de células por gramo seco (DW), % de células antes de la disrupción (% CAD), % de células después de la disrupción (% CDD) y % de rotura promedio (% RP) de cada una de las muestras. Los subíndices indican diferencias significativas entre muestras según test de rangos múltiples (p<0,05).

4.2.2.3 Señales de fluorescencia

Las muestras se marcaron con dos fluorocromos para ácidos nucleicos: SYTO 13, permeable a la membrana plasmática, y yoduro de propidio, el cual sólo puede penetrar la célula si las membranas plasmáticas están rotas (tinción por exclusión). De esta manera, se pretende cuantificar entre células con membranas rotas (se marcan con ambos fluorocromos), y células con membranas intactas (sólo se marcan con SYTO 13) [179]. Las células con membranas intactas en principio podrían considerarse "viables". La integridad de la membrana indica que la célula podría potencialmente generar gradientes y mostrar actividad metabólica, pero no garantiza la replicación [178].

Las figuras 4-18 y 4-19 muestran los citogramas de fluorescencia verde (FL1; SYTO 13) frente a fluorescencia roja (FL3; yoduro de propidio) de las muestras enteras y las muestras rotas, respectivamente, de las zonas donde se realizó el *gattering* inicial con los parámetros de dispersión. Al restringirse a esta zona donde están las células enteras, las señales de fluorescencia que se tienen en cuenta son las de los fluorocromos unidos a ácidos nucleicos dentro de las células. Los citogramas 4-18 y 4-19 se dividieron en cuatro partes según los valores altos o bajos de fluorescencia verde (FL1) y de fluorescencia roja (FL3) de las células. De esta manera, la zona Q1 corresponde a valores bajos relativos de fluorescencia verde (tinción con SYTO 13) y altos de fluorescencia roja (tinción con yoduro de propidio); una proporción alta de células en esta zona indicaría una tinción incorrecta por parte del SYTO 13. Las células situadas en la zona Q2 son células marcadas tanto por el SYTO 13 como por el yoduro de propidio, por lo que son células con membranas dañadas, y, por lo tanto, no viables. Las células de Q3 corresponderían a células que sólo se han teñido con SYTO 13, lo que implica que conservarían, en principio, la integridad de la membrana y serían "viables". Finalmente, las células de Q4 no se habrían marcado correctamente con ninguno de los fluorocromos.

La gran mayoría de células enteras (>90%) de todas las muestras antes de la disrupción se encuentran en la zona Q2 (figura 4-18), lo que indica que son células con membranas rotas y no viables. Los valores mayores (>98 %) corresponden a las muestras de primera fermentación, segunda fermentación del Charmat y LSI. Las de primera fermentación no han

sufrido un proceso autolítico, pero han permanecido en disoluciones con altas concentraciones de sales, principalmente tartratos, por lo que han sufrido daños. Las lías de segunda fermentación del Charmat proceden de un envejecimiento corto, inferior a 3 meses, pero al parecer suficiente para afectar a la membrana plasmática de las células. Finalmente, las muestras LSI también muestran la membrana comprometida, lo cual es debido al proceso de secado y conservación por *spry-drying*, en el cual se puede perder completamente la viabilidad celular [180].

En los citogramas se puede ver que las lías de segunda fermentación contienen alrededor del 10 % de células "viables". Estas muestras han sufrido un largo proceso autolítico, superior a 9 meses, lo que se sabe afecta en gran medida a la integridad de la membrana y a la viabilidad celular [89]. En este proceso, la pared celular se vuelve más fina pero mantiene su forma, y se pierden constituyentes celulares, como los ácidos nucleicos [101].

Por otra parte, hay que considerar las características de los fluorocromos utilizados. Ambos se unen inespecíficamente a ADN y ARN, pero el yoduro, al no poder atravesar membranas, sólo se unirá a los ácidos nucleicos libres del citoplasma, y al ADN únicamente si la membrana que rodea al núcleo también está afectada. El SYTO 13 puede atravesar cualquier membrana celular, así que podrá marcar el ADN también.

Aparte de la localización de ambos fluorocromos dentro de la célula, sus características de fluorescencia son muy diferentes. El SYTO 13 tiene valores de extinción molar (absortividad molar) muy altos, superiores a 50000 $cm^{-1}M^{-1}$, y valores de rendimiento cuántico de fluorescencia también relativamente altos; 0,4 para ADN y 0,4 para ARN [181]. El yoduro de propidio presenta unos valores de extinción molar y rendimiento cuántico relativamente bajos; 5900 $cm^{-1}M^{-1}$ y 0,09, respectivamente [182], [183]. La intensidad de fluorescencia es proporcional al producto del coeficiente de extinción y el rendimiento cuántico [184], lo que implica que el SYTO 13 es un fluorocromo mucho más sensible que el yoduro de propidio. Por lo tanto, las células con bajas concentraciones de ácidos nucleicos podrán marcarse con SYTO 13 pero no con yoduro de propidio, de manera que aparecerían en la zona Q3 del diagrama.

En los diagramas de fluorescencia después de la disrupción (figura 4-19), se puede observar que el porcentaje de células “viables” en la zona Q3 aumenta respecto a los valores antes de la disrupción en todas las muestras de lías. Este incremento no puede corresponder a unos porcentajes superiores de células viables puesto que se trata de la misma muestra. Durante la disrupción celular la pared celular sufre pequeñas roturas que no implican la pérdida de la forma oval pero sí de contenido citoplasmático [185]. La ratio de rotura ha sido mucho menor en las muestras LSI, lo que explica que el porcentaje de células en esta zona no haya variado. También se ha observado un aumento del porcentaje de células en las zonas Q4 de todas las muestras de lías, células que no tienen suficiente contenido en ácidos nucleicos para ser marcadas por ninguno de los dos fluorocromos usados.

Teniendo en cuenta todo esto, es posible que el porcentaje superior de células viables en las lías de segunda fermentación del cava se deba a una menor concentración de ácidos nucleicos en éstas.

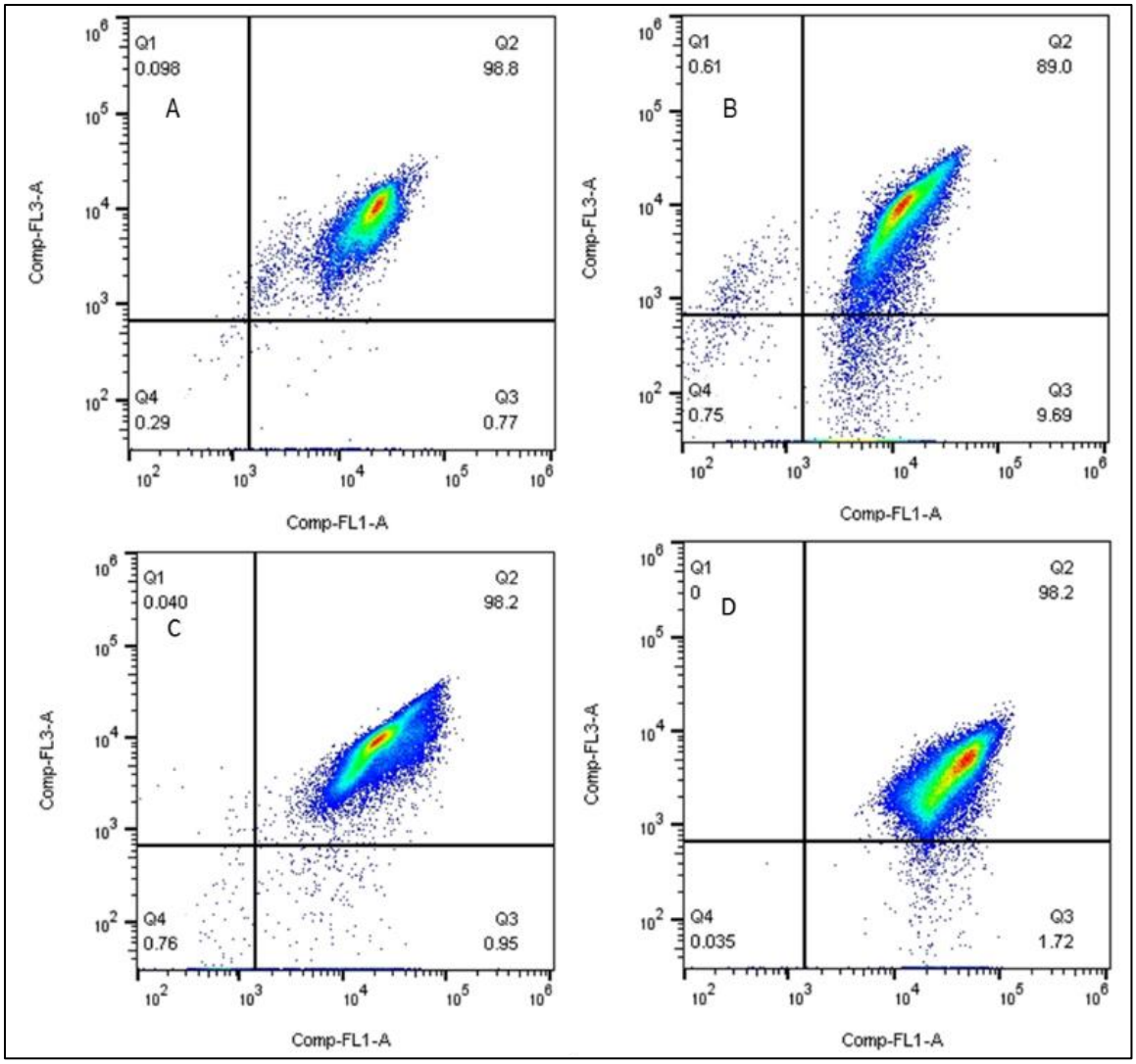


Figura 4-18. Citogramas biparamétricos de las señales de fluorescencia verde (FL1; SYTO13) frente a fluorescencia roja (FL3; yoduro de propidio) de las muestras antes de la disrupción en las zonas donde se realizó el "gattering"; (A) lías de primera fermentación del cava; (B) lías de segunda fermentación del cava, (C) lías de segunda fermentación del Charmat, y (D) Levaduras Secas Inactivas (LSI).

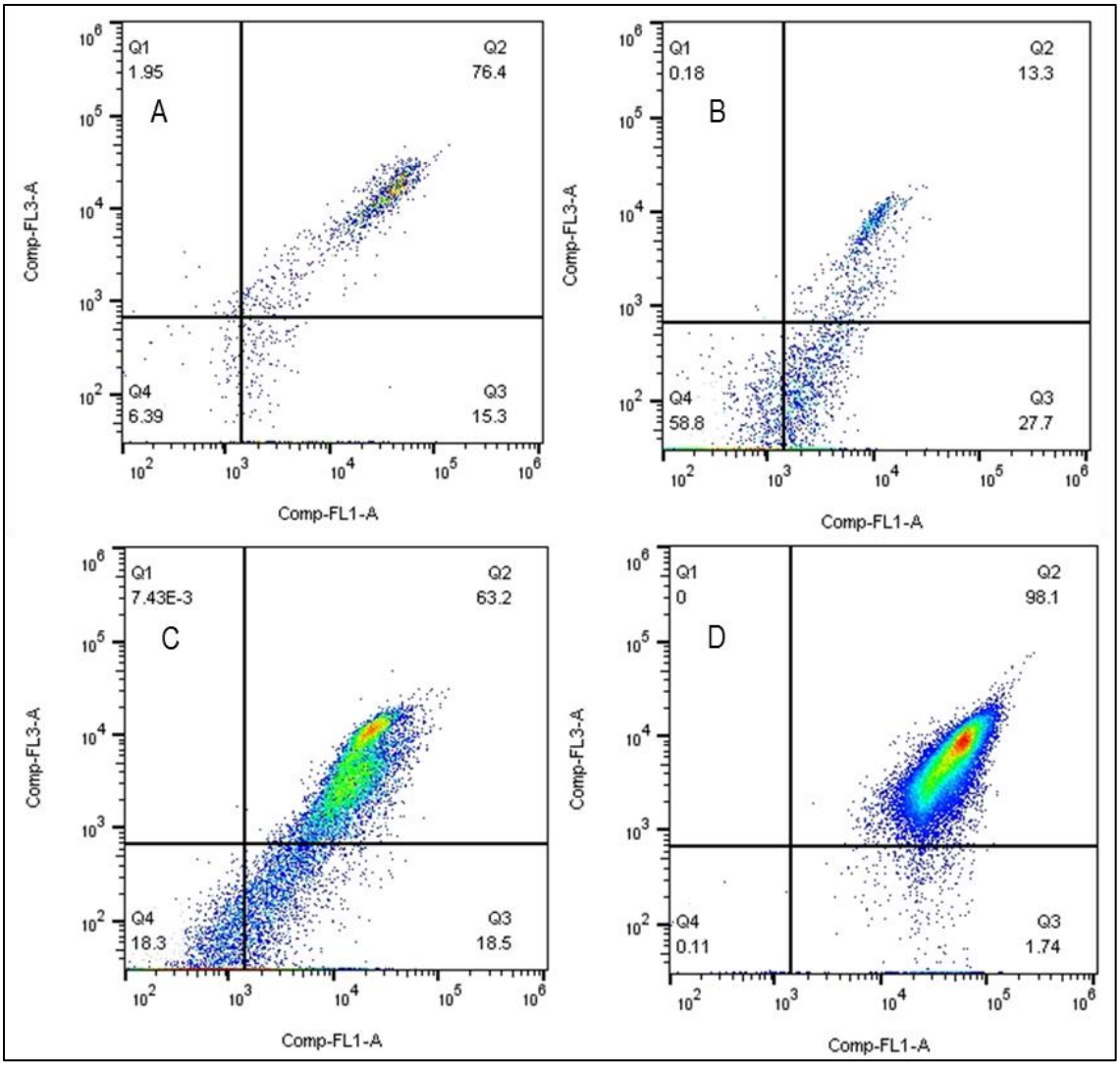


Figura 4-19. Citogramas biparamétricos de las señales de fluorescencia verde (FL1; SYTO13) frente a fluorescencia roja (FL3; yoduro de propidio) de las muestras después de la disrupción en las zonas donde se realizó el "gattering"; (A) lías de primera fermentación del cava; (B) lías de segunda fermentación del cava, (C) lías de segunda fermentación del Charmat, y (D) Levaduras Secas Inactivas (LSI).

4.2.3 Conclusiones del capítulo

Se han visualizado por microscopía óptica confocal las muestras de lías de primera fermentación, segunda fermentación de cava, segunda fermentación de Charmat y Levadura Seca Comercial. Todas las muestras conservan la integridad de su pared celular. Sus tamaños se sitúan alrededor de 3 µm de diámetro menor y 5 µm de diámetro mayor. Las lías de

segunda fermentación de cava aparecen con más restos celulares que las de segunda fermentación del Charmat.

Se han utilizado los parámetros de dispersión para conocer la distribución de partículas y células en las muestras de lías y Levaduras Secas Inactivas (LSI) por primera vez. Mediante estos parámetros se han aislado las células de levadura enteras de los restos celulares, y se han cuantificado. Con la cuantificación antes y después de la disrupción, se ha podido hallar el grado de disrupción que ha sufrido cada muestra.

Las muestras de primera fermentación son las más heterogéneas y las que contienen menores cantidades de células por gramo seco, pero su disrupción ha sido extensiva. Las muestras de segunda fermentación del cava también presentan gran cantidad de restos celulares. Las muestras de segunda fermentación de Charmat y las de Levaduras Secas Inactivas (LSI) comerciales tienen pocos restos celulares. Sin embargo, mientras que las muestras de Charmat se rompen en la misma medida que las del cava, las LSI resisten las condiciones del molino.

Para determinar la posible viabilidad celular, las muestran se han marcado por primera vez con dos fluorocromos para ácidos nucleicos con diferentes características. En lías de primera fermentación, lías de Charmat y LSI, prácticamente todas las células se han marcado con ambos fluorocromos, lo que es un indicio de que la gran mayoría de células tienen las membranas defectuosas. A pesar que son las muestras que han sufrido una autolisis más larga y además presentan gran cantidad de restos de paredes, las muestras de segunda fermentación del cava tenían alrededor del 10 % de células que podrían ser viables según este marcaje. Considerando que están más degradadas, es posible que estos resultados se deban a que su contenido en ácidos nucleicos sea menor, de manera que el fluorocromo menos sensible no pueda detectarse.

4.3 COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS LÍAS

Se analizó la composición y la actividad antioxidante de las muestras enteras y de las fracciones que se obtienen después de la disrupción, con el objetivo de conocer la composición del interior (citoplasma) y de la parte más externa de la célula (pared celular), y relacionar estos valores con los de sus actividades antioxidantes correspondientes.

4.3.1 Determinaciones básicas

Como análisis básicos iniciales de las muestras de lías se determinaron el porcentaje de sólidos, el pH, y el porcentaje de ácido tartárico (tabla 4-11). Ya que el peso seco de las muestras depende del tiempo de decantación y este puede ser muy variable, el porcentaje de sólidos se determinó sobre las lías centrifugadas (1460g, 15 minutos, 4 ºC).

	% sólidos	pH	% Ac. tartárico
1ª fermentación	68_a	$3,3_a$	78_a
2ª fermentación	12_b	$3,1_a$	18_b
Lías de Charmat	29_c	$3,2_a$	5_c

Tabla 4-11. Porcentaje de sólidos, pH, y ácido tartárico de las muestras centrifugadas antes del lavado (n=3). Los subíndices indican diferencias significativas entre muestras según test de rangos múltiples (p<0,05).

Como puede verse en la tabla anterior, todos los pH son ácidos, alrededor de 3, muy cercanos a los pH de los vinos espumosos. El porcentaje de sólidos es significativamente superior en las lías de primera fermentación (p<0,05), lo que se explica por la alta cantidad de tartratos que contienen (78 %), y también por los restos vegetales, como se puede apreciar en la imagen 4-20. Esta cantidad tan alta de tartratos hace de las lías de primera fermentación un buen material para su obtención.

El porcentaje de sólidos es más del doble en las muestras de lías Charmat respecto a las de segunda fermentación del cava, a pesar de no contener bentonitas y cuatro veces

menos tartratos. Esto está relacionado con el mayor número de células de las muestras de Charmat, como ya se comentó en el apartado de caracterización por citometría de flujo.

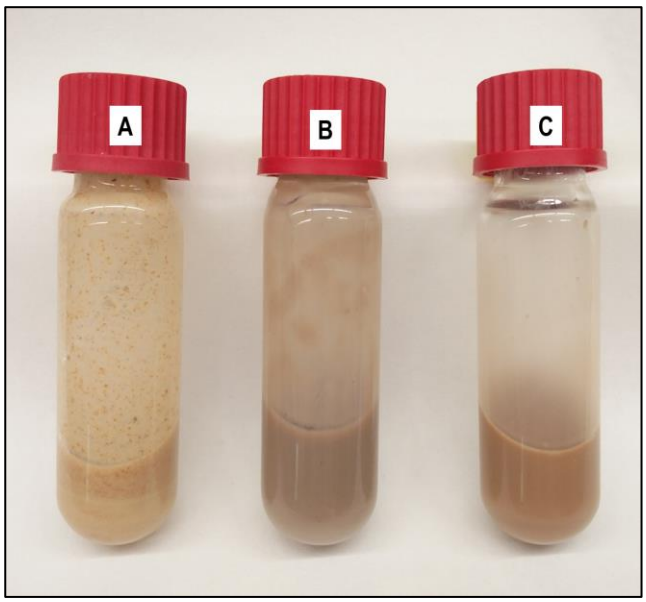


Figura 4-20. Imagen de lías de primera fermentación del cava (A), de segunda fermentación del cava (B), y de segunda fermentación del Charmat (C).

4.3.2 Contenido en fenoles

En las tablas 4-12 y 4-13 pueden verse las concentraciones promedio en los fenoles individuales analizados mediante HPLC-uV encontrados en las muestras de lías sin lavar (ES), lavadas (WY), y las dos fracciones que se obtienen de la disrupción: paredes (CWY) y citoplasma (Cyt).

Muestra	Fracción	Ac. cafeico	Ac. caftárico	Ac. Cumárico	Ac. ferúlico
1ª fermentación	ES	$4,2_a$	$42,9_a$	0,7	$1,7_a$
	WY	$2,5_b$	$8,6_b$	nd	$2,2_b$
	CWY	nd	nd	nd	nd
	Cyt	$1,8_b$	$7,1_b$	nd	nd
2ª fermentación	ES	8,7	349,2	10	4,2
Charmat	ES	$15,6_a$	396_a	3,8	nd
	WY	$1,3_b$	$100,5_b$	nd	nd
	CWY	$0,9_b$	80_c	nd	nd
	Cyt	nd	$20,3_d$	nd	nd

Tabla 4-12. Contenido en ácidos hidroxicinámicos y sus derivados de las lías en µg/g de peso seco. Códigos: ES=lía entera sucia; WY=lía entera limpia; CWY=paredes; Cyt=citoplasma; nd=no detectado (n=3). No se han detectado ácidos hidroxicinámicos ni sus derivados en las lías de segunda fermentación del cava después de la limpieza, ni en las fracciones de ésta. Los subíndices indican diferencias significativas entre fracciones de la misma muestra según test de rangos múltiples (p<0,05).

Muestra	Fracción	Tirosol	Ac. gálico	Catequina	Epicatequina
1ª fermentación	ES	$15,4_a$	2	$29,1_a$	11,2
	WY	$12,3_b$	nd	$9,8_b$	nd
	CWY	nd	nd	nd	nd
	Cyt	nd	nd	$8,5_b$	nd
2ª fermentación	ES	nd	nd	nd	72,5
Charmat	ES	nd	nd	$50,3_a$	$171,9_a$
	WY	nd	nd	$23,4_b$	nd
	CWY	nd	nd	$21,5_b$	$6,8_b$
	Cyt	nd	nd	nd	nd

Tabla 4-13. Contenido en fenoles individuales distintos de los hidroxicinamatos (µg/g de peso seco). Códigos: ES=lía entera sucia; WY=lía entera limpia; CWY=paredes; Cyt=citoplasma; nd=no detectado (n=3). No se han detectado estos fenoles en las lías de segunda fermentación del cava después de la limpieza, ni en las fracciones de ésta. Los subíndices indican diferencias significativas entre fracciones de la misma muestra según test de rangos múltiples (p<0,05).

En general, los fenoles individuales más importantes en las lías sin lavar centrifugadas son el ácido caftárico, la catequina y la epicatequina, que son algunos de los fenoles más abundantes en vinos espumosos [12], [171]. Las lías de segunda fermentación contienen más concentración de fenoles, especialmente las lías del Charmat. Esto está relacionado con la

mayor concentración de células en estas muestras, ya que éstas son capaces de retener fenoles en su pared [12], [171]. En la bibliografía se ha descrito que los fenoles de vino blanco adsorbidos en mayor medida por las paredes de levaduras son los flavan-3-ol (como catequina y epicatequina) y sus derivados (procianidinas). El ácido caftárico también puede retenerse, aunque en menor grado [120].

En lías provenientes de vino blanco se han encontrado los fenoles ácido caftárico (42-47 µg/g de peso seco), ácido cis-coutárico (3-2 µg/g de peso seco), ácido trans-coutárico (2 µg/g de peso seco) y ácido cafeico (14 µg/g de peso seco) [122]. Los rangos de concentraciones de fenoles analizados en las lías de primera fermentación están dentro de estos valores de la bibliografía. Ya que no existen datos de fenoles extraídos de lías de segunda fermentación, se pueden comparar con los valores de fenoles cuantificados en extractos metanólicos de bagazos de uva blanca (moscatel y palomino fino) [122]. Los valores de catequina están en el rango de estos extractos de bagazos, sin embargo, los valores de epicatequina y ácido caftárico son muy superiores; los extractos de lías contienen el doble de epicatequina y diez veces más ácido caftárico por gramo de peso seco. Estos resultados indican que las lías de segunda fermentación de vinos espumosos pueden ser una excelente fuente de compuestos fenólicos.

Comparando los valores de lías sin lavar y lías lavadas, se puede ver que el proceso de limpieza ha sido adecuado, especialmente en el caso de las lías de segunda fermentación del cava. No se han detectado fenoles individuales en estas muestras después del proceso de limpieza, lo que puede ser debido en parte a que las paredes están más degradadas que en las lías de Charmat, y ceden más fácilmente los fenoles absorbidos. Los valores de fenoles totales para las lías de Charmat lavadas y sus fracciones (pared y citoplasma) siguen siendo altos, por lo que pueden influir en los valores de actividad antioxidante.

4.3.3 Contenido en polisacáridos, proteínas y tioles

La tabla 4-14 muestra los porcentajes en polisacáridos totales, proteína, péptidos y aminoácidos libres de las muestras enteras y sus fracciones (pared y citoplasma). Se han realizado análisis de la varianza (ANOVA) simples con los datos de polisacáridos, proteínas, péptidos y aminoácidos como variables dependientes y como factor la fracción dentro de cada muestra ($p<0,05$). Mediante un test de rangos múltiples se han identificado las diferencias entre muestras. Adicionalmente, para comparar entre muestras, también se realizó un ANOVA simple con los datos de las muestras antes de la disrupción (WY) y como factor el tipo de muestra (primera fermentación, segunda fermentación del cava, segunda fermentación de Charmat y levaduras secas activas LSI) ($p<0,05$).

Muestra	Fracción	% Polisacáridos	% Proteína	% Péptidos	% Aminoácidos
1ª fermentación	WY	$13,4_a$	$2,7_a$	-	$0,02_a$
	CWY	$10,9_b$	$2,7_a$	-	$0,01_b$
	Cyt	$2,1_c$	$0,1_b$	-	$0,01_b$
2ª fermentación	WY	$72,3_a$	$8,5_a$	-	$0,05_a$
	CWY	$74,5_a$	$8,7_a$	-	$0,08_b$
	Cyt	$0,5_b$	$0,4_b$	-	$0,01_c$
Charmat	WY	$70,7_a$	$15,5_a$	-	$0,05_a$
	CWY	$67,8_a$	$15,0_a$	-	$0,05_a$
	Cyt	$8,1_b$	$0,7_b$	-	$0,01_b$
Levaduras secas activas	WY	$56,6_a$	$21,2_a$	$3,40_a$	$5,76_a$
	CWY	$46,9_b$	$15,5_b$	-	$0,11_b$
	Cyt	$9,9_c$	$2,7_c$	$3,32_a$	$5,42_a$

Tabla 4-14. Porcentajes en polisacáridos totales, proteína, péptidos y aminoácidos libres de las muestras enteras y sus fracciones (valores referidos al peso seco de levadura entera; n=3). Códigos: WY=lía entera; CWY=paredes; Cyt=citoplasma. Los subíndices indican diferencias significativas entre fracciones de la misma muestra según test de rangos múltiples (p<0,05).

Las lías de primera fermentación son las que contienen menos polisacáridos totales porque su contenido en células es mucho menor. El porcentaje de polisacáridos totales en la lía entera de segunda fermentación del cava es prácticamente igual que en la pared, lo que es un indicio de que la lía está compuesta principalmente de esta fracción. En el caso de las

lías de Charmat, el citoplasma tiene un contenido en polisacáridos no despreciable comparado con el de las lías del cava; esto puede ser debido al menor periodo de autolisis que ha sufrido, por lo que el citoplasma está menos “vacío”.

Hay diferencias significativas ($p<0,05$) entre los contenidos en proteína soluble de las diferentes muestras antes de la disrupción. Teniendo en cuenta que las proteínas provienen principalmente de las células y sus restos, estas diferencias en las muestras de lías se deben de nuevo a los contenidos celulares. Las LSI tienen un porcentaje de proteínas muy superior al de las lías, lo que está relacionado con su alto contenido en manoproteínas, según información comercial. No hay diferencias significativas entre los porcentajes de proteínas de lías enteras y sus paredes, lo que vuelve a indicar que lo que queda de estas células es sobre todo pared.

No se detectan péptidos y los porcentajes de aminoácidos libres son muy bajos en todas las muestras de lías y sus fracciones. En algunos casos las paredes contienen igual porcentaje o incluso más que las lías enteras, como en las lías de segunda fermentación del cava. En la cuantificación de los aminoácidos libres se utiliza el método de Cd-ninhidrina modificado, donde reaccionan fundamentalmente los aminoácidos libres pero, en pequeña medida, sigue existiendo reacción de ciertos péptidos [167], por lo que es posible que en estos casos estén reaccionando péptidos de la pared celular. Los aminoácidos libres de estas muestras corresponderían con los contenidos en el citoplasma.

Las muestras LSI sí contienen péptidos libres y una proporción de aminoácidos libres muy elevada si lo comparamos con los valores de las lías. No hay diferencias significativas en el porcentaje de péptidos y aminoácidos libres de la levadura seca entera y el citoplasma ($p<0,05$). Teniendo en cuenta que los resultados de citometría muestran que el grado de rotura de estas células es muy inferior al de las lías, estos datos podrían indicar que los aminoácidos libres no se encuentran dentro de la célula sino exteriormente.

La tabla 4-15 muestra los valores obtenidos en tioles totales, glutatión reducido y glutatión oxidado. Al igual que con los resultados anteriores, también se realizaron dos

ANOVAS simples diferentes: 1) con los datos de tioles, glutatión reducido y oxidado como variables dependientes y como factor la fracción dentro de cada muestra ($p<0,05$), y 2) con los datos de las muestras antes de la disrupción (WY) y como factor el tipo de muestra (primera fermentación, segunda fermentación del cava, segunda fermentación de Charmat y LSI) ($p<0,05$).

Muestra	Fracción	% Tioles totales	% Glutatión reducido	% Glutatión oxidado
1ª fermentación	WY	$0,038_a$	-	-
	CWY	$0,033_a$	-	-
	Cyt	$0,015_b$	-	-
2ª fermentación	WY	$0,037_a$	-	-
	CWY	$0,035_a$	-	-
	Cyt	$0,015_b$	-	-
Charmat	WY	$0,154_a$	-	-
	CWY	$0,184_b$	-	-
	Cyt	$0,017_c$	-	-
Levaduras secas activas	WY	$3,282_a$	$2,254_a$	$0,294_a$
	CWY	$0,532_b$	$0,126_b$	-
	Cyt	$2,920_c$	$1,956_a$	$0,329_a$

Tabla 4-15. Porcentaje en tioles totales, glutatión reducido y glutatión oxidado (valores referidos al peso seco de levadura entera; n=3). El guion indica que los valores se encuentran por debajo del límite de cuantificación. Códigos: WY=lía entera; CWY=paredes; Cyt=citoplasma. Los subíndices indican diferencias significativas entre fracciones de la misma muestra según test de rangos múltiples ($p<0,05$).

No hay diferencias significativas en los contenidos en tioles totales en las lías de primera y de segunda fermentación del cava ($p<0,05$). Sin embargo, las muestras de Charmat sí tienen un contenido en tioles significativamente mayor ($p<0,05$), lo que se relaciona con la mayor concentración de células. Las paredes celulares de las muestras de lías son las que contienen la mayor parte de los tioles. En el caso de la pared celular de las muestras de Charmat, el porcentaje de tioles es mayor que en las lías enteras, probablemente porque estos grupos se exponen en mayor medida después de la disrupción celular.

A gran distancia de las muestras de lías se encuentran las muestras de LSI, tanto en contenido en tioles totales como glutatión reducido. Según datos del comerciante, estas muestras contienen alrededor del 3 % de glutatión reducido. Este valor es superior a los resultados obtenidos (2,25 %), aún considerando también el glutatión oxidado, el cual ha podido generarse por oxidación del glutatión reducido durante el almacenaje del producto. De cualquier manera, el contenido en glutatión reducido es muy superior al 1 % en peso seco que contiene la levadura [126]. Como sucedía con los aminoácidos libres, la gran mayoría de grupos tioles (89 %) y de glutatión (87 %) de las muestras LSI antes de la disrupción están contenidos en la fracción citoplasma, lo que vuelve a indicar que tanto los tioles como el glutatión no se encuentran dentro de la célula sino exteriormente. Las paredes de las levaduras comerciales siguen conteniendo glutatión residual (0,5%), lo que influirá en su actividad antioxidante.

4.3.4 Actividad antioxidante de las diferentes fracciones

Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) de un factor para cada una de las muestras, con los valores de actividad antioxidante como variable respuesta y la fracción como factor. Las figuras 4-21, 4-22 y 4-23 muestran los resultados promedio y las desviaciones estándar de las actividades antioxidantes de las muestras enteras (WY) y sus fracciones obtenidas de la disrupción: levadura rota (DY), paredes (CWY) y citoplasma (Cyt). Las letras diferentes de las barras de los gráficos indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre fracciones de una misma muestra según test de rangos múltiples.

En primer lugar, se puede afirmar que la actividad antioxidante de las tres muestras de lías se encuentra en la pared celular, ya que los valores de actividad antioxidante de los citoplasmas son significativamente ($p<0,05$) más bajos que los valores de las otras fracciones. Las lías se segunda fermentación, tanto las del cava como las del Charmat, provienen de un proceso de autolisis. Como ya se comentó en el apartado de la introducción anterior, este proceso implica una cesión de productos de la célula al medio vino y un empobrecimiento del citoplasma celular. Las lías de primera fermentación del cava no han sufrido la autolisis, pero

tienen un contenido muy bajo de células por gramo de peso seco, por lo que la cantidad de compuestos cedidos a la fracción citoplasmática después de la disrupción será pequeña. Además, contienen restos celulares que se depositan después de la centrifugación y que pueden exhibir actividad antioxidante en la fracción pared. Los resultados de los apartados anteriores de composición corroboran que la fracción citoplasmática de las muestras de lías tiene poco contenido y, por consiguiente, exhibe una pobre actividad antioxidante.

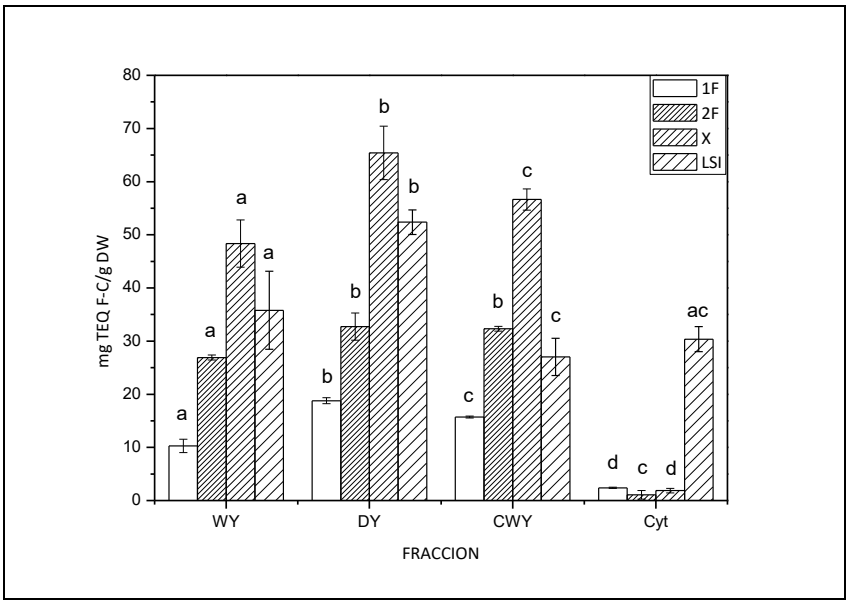


Figura 4-21. Actividad antioxidante de las muestras de lías y LSI y sus fracciones medidas por el método Folin-Ciocalteau. Valores referidos al peso seco de levadura entera. Códigos: WY=lía entera; DY: lía rota; CWY=pared; Cyt=citoplasma. 1F: 1ª fermentación; 2F: 2ª fermentación; X: Charmat; LSI: Levaduras Secas Inactivas. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre fracciones de la misma muestra según test de rangos múltiples.

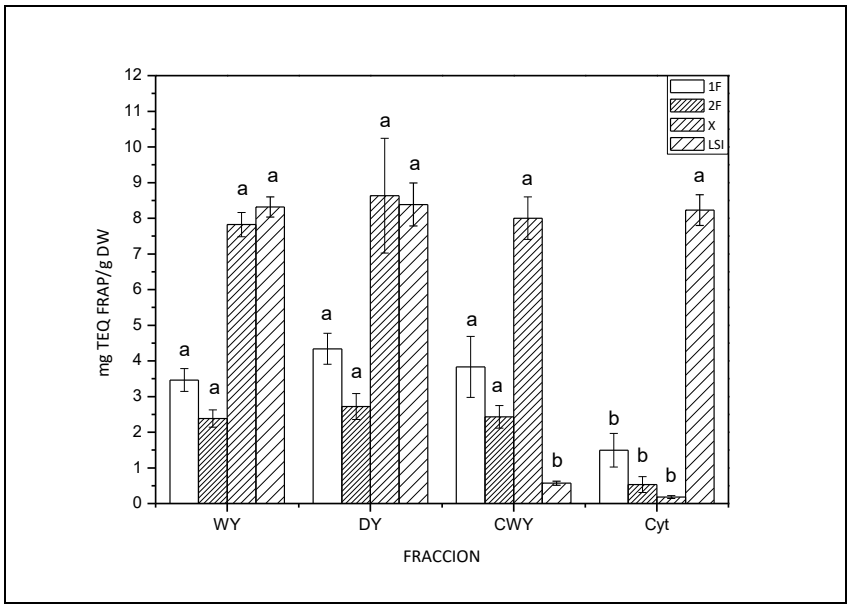


Figura 4-22. Actividad antioxidante de las muestras de lías y LSI y sus fracciones medidas por el método FRAP. Valores referidos al peso seco de levadura entera. Códigos: WY=lía entera; DY: lía rota; CWY=paredes; Cyt=citoplasma. 1F: 1ª fermentación; 2F: 2ª fermentación; X: Charmat; LSI: Levaduras Secas Inactivas. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre fracciones de la misma muestra.

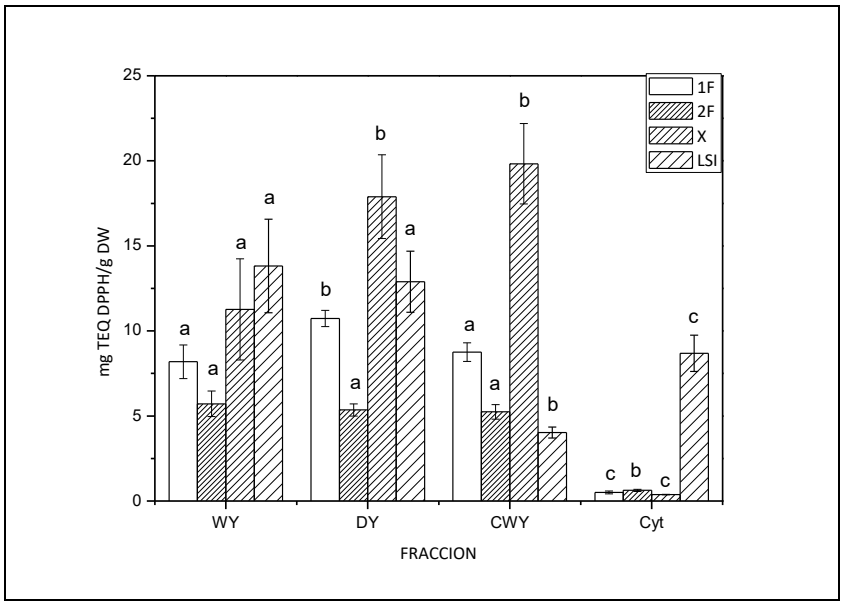


Figura 4-23. Actividad antioxidante de las muestras de lías y LSI y sus fracciones medidas por el método DPPH. Valores referidos al peso seco de levadura entera. Códigos: WY=lía entera; DY: lía rota; CWY=pared; Cyt=citoplasma. 1F: 1ª fermentación; 2F: 2ª fermentación; X: Charmat; LSI: Levaduras Secas Inactivas. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre fracciones de la misma muestra.

Según los resultados del apartado 4.3.2 sobre contenido en fenoles de las lías, las suspensiones de lías de primera fermentación y del Charmat después del lavado siguen conteniendo polifenoles. Los valores de polifenoles totales (medidos por HPLC-uV) en las muestras de Charmat son tres veces superiores a las muestras de primera fermentación. Teniendo en cuenta estas concentraciones y las diluciones realizadas para la determinación de la actividad antioxidante, las concentraciones finales que se alcanzan son, en el caso de las muestras del Charmat, inferiores a 0,1 mg/L de ácido caftárico y 0,03 mg/L de catequina. Para las lías de primera fermentación, los valores finales son inferiores a 0,07 mg/L de tirosol y 0,04 mg/L de ácido caftárico y catequina, respectivamente. Estas concentraciones son muy bajas, pudiéndose considerar que su influencia en la actividad antioxidante es insignificante.

Para comparar las actividades antioxidantes entre diferentes muestras, se realizó un análisis de la varianza multifactorial (MANOVA), con los datos de actividad antioxidante como variables dependientes y el tipo de muestra y la fracción como factores ($p<0,05$). La muestra más antioxidante es la de lías de Charmat, seguida por las LSI. La menos antioxidante según el método de Folin-Ciocalteau es la de primera fermentación, y para FRAP y DPPH, la menos antioxidante es la muestra de lía de segunda fermentación del cava.

Aparte de los polifenoles residuales, entre los otros compuestos que contienen las lías que pueden ejercer actividad antioxidante están los tioles, las proteínas y los polisacáridos glucanos y mananos. El contenido en grupos tioles en las lías de primera fermentación y segunda fermentación del cava es muy bajo, mientras que el de las lías del Charmat es casi cuatro veces superior. Esto puede explicar en parte que la actividad antioxidante de las lías Charmat sea significativamente más alta que las de las otras muestras de lías.

Las muestras LSI son excepcionalmente ricas en glutatión reducido, que se encuentra principalmente en el exterior celular, el cual exhibe una capacidad antioxidante importante. Esto implica que la actividad antioxidante de estas muestras se debe, en gran parte, a su contenido en glutatión reducido. Esto está de acuerdo con los datos que se encuentran en la bibliografía, donde se relaciona la actividad antioxidante de los extractos celulares de *Saccharomyces cerevisiae* con su contenido en tioles [186]. Sin embargo, a pesar de contener

unos valores mucho más altos de tioles totales y glutatión libre, la actividad antioxidante de las muestras de LSI es significativamente inferior a las muestras de Charmat (para Folin-Ciocalteau y DPPH, pero no para FRAP, donde los valores son similares, $p<0,05$), por lo que otros componentes de las lías deben de ejercer también actividad antioxidante.

Para comparar y establecer relaciones, se testaron las actividades antioxidantes de los siguientes productos derivados de *S. cerevisiae* que comercializa la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, USA): levadura inactivada y secada, autolisado, extracto, glucanos, mananos y zimosan A. Los resultados pueden verse en la tabla 4-16. Tanto el autolisado como el extracto son concentrados de los componentes solubles de la levadura que generalmente se obtienen por autolisis. Son ricos en péptidos y aminoácidos libres y vitaminas. El zimosan A es un producto insoluble muy conocido procedente de *Saccharomyces cerevisiae,* que muestra varias actividades biológicas relacionadas con respuestas inflamatorias e inmunes. Se trata de "levaduras fantasma", es decir, paredes de levaduras vacías con un diámetro medio de 3 µm (información suministrada por el comerciante). Los componentes mayoritarios del zimosan A son glucanos (54 %), mananos (19 %), proteínas (15 %) y lípidos (7 %) [187].

Muestra	Folin mg GAE/L	FRAP µM TEQ	DPPH µM TEQ
Levadura	$28,43_a$	$9,26_a$	$14,25_a$
Autolisado	$59,53_b$	$5,01_b$	$6,44_b$
Extracto	$60,80_b$	$4,31_b$	$5,21_b$
Glucanos	0,30c	-	-
Mananos	$2,01_d$	$0,13_c$	$0,19_c$
Zimosan A	$10,77_e$	$6,24_d$	$2,70_d$

Tabla 4-16 Actividades antioxidantes de productos comerciales de S. cerevisiae medidas con los tres métodos (Folin-Ciocalteau, FRAP y DPPH) (n=3). Unidades: mg TEQ /g DW. El guion indica que los valores están por debajo del límite de cuantificación. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre muestras según test de rangos múltiples (p<0,05).

Hay diferencias en los resultados según el método que se aplica ($p<0,05$). Los valores de actividades antioxidantes medidos con el método Folin-Ciocalteau más altos corresponden al extracto y al autolisado, las muestras con mayores cantidades de

aminoácidos libres y péptidos. Sin embargo, los resultados de actividades antioxidantes de los métodos FRAP y DPPH muestran que las actividades antioxidantes mayores corresponden a la levadura comercial, seguidos del zimosan A para el FRAP y del autolisado para el DPPH. Los valores más bajos de actividad antioxidante lo exhiben los polisacáridos. Los resultados de Folin-Ciocalteau para mananos son relativamente altos si los comparamos con los valores obtenidos para FRAP y DPPH. En el caso de los glucanos, sólo reaccionan con el Folin-Ciocalteau, dando unos valores muy bajos. Glucanos y mananos bajo estos métodos tienen, por lo tanto, menos importancia en los valores de actividad antioxidante medidos.

A parte de tioles, glucanos y mananos, las lías contienen manoproteínas, las cuales han demostrado que aumentan la actividad antioxidante de los vinos espumosos cuando son añadidas como coadyuvante [13]. Este aumento es importante para la actividad antioxidante medida con DPPH (30 % de incremento), pero espectacular para la actividad antioxidante por FRAP (más de 120 %). La concentración de manoproteínas de las lías Charmat es superior a las de las otras muestras de lías, lo que puede explicar su mayor capacidad antioxidante. Sin embargo, las muestras de levaduras secas inactivas (LSI), además de sus superiores concentraciones de tioles ($p<0,05$), contienen mayores valores de manoproteínas, por lo que su actividad antioxidante debería ser mayor. Esto no se cumple, lo que puede deberse a otras características de las muestras de lías.

Entre esas características están la mayor accesibilidad a los grupos reaccionantes y las modificaciones de las propiedades físico-químicas de superficie que se producen a lo largo del envejecimiento de los vinos espumosos [188]. Estas modificaciones físico-químicas incluyen un aumento de la hidrofilia y del carácter donante de electrones, por lo que, en las condiciones de los ensayos de actividad antioxidante, las muestras serán más solubles y cederán más fácilmente electrones, demostrando más capacidad antioxidante [189].

4.3.5 Conclusiones del capítulo

Las lías recuperadas de vinos espumosos pueden ser fuente de diversos compuestos interesantes a nivel industrial. En particular, las lías de primera fermentación contienen una alta concentración de tartratos y las de segunda fermentación compuestos fenólicos típicos de los vinos espumosos, los cuales ceden con facilidad.

Las lías de segunda fermentación consisten básicamente en pared celular; su contenido citoplasmático es muy pequeño, especialmente para las lías de segunda fermentación del cava. A pesar de no contener compuestos típicos antioxidantes de halogenados celulares, como el glutatión, las lías recuperadas de vinos espumosos exhiben una capacidad antioxidante importante, similar a la de un producto enológico de levaduras secas inactivas, que se comercializan por sus propiedades antioxidantes.

4.4 CARACTERIZACIÓN DE LA PARED CELULAR

Con el objetivo de conocer la composición de las paredes de las muestras y qué componentes de éstas se relacionan con la actividad antioxidante, se han llevado a cabo dos tipos de fraccionamiento de la pared celular. En primer lugar, un fraccionamiento completo en condiciones suaves para minimizar la degradación de algunos componentes, y en segundo, un fraccionamiento en un solo paso para la extracción exclusiva de las manoproteínas.

4.4.1 Composición y actividad antioxidante inicial de las paredes

La tabla 4-17 muestra el porcentaje de peso seco de pared de cada una de las muestras respecto al peso inicial, y la composición (polisacáridos totales, proteínas y tioles) de la pared respecto a su peso seco. Se realizó un ANOVA simple con el tipo de muestra como factor ($p<0,05$).

	% Pared	% Polisacáridos	% Proteína	% Tioles
1ª fermentación	70_a	$15,6_a$	$3,8_a$	$0,047_a$
2ª fermentación	94_b	$79,2_b$	$9,2_b$	$0,037_a$
Charmat	95_b	$71,4_b$	$15,8_c$	$0,194_b$
Levaduras secas inactivas	77_a	$60,9_c$	$20,1_d$	$0,691_c$

Tabla 4-17. Porcentajes de peso seco de las paredes obtenidas de las muestras de lías y LSI respecto al peso seco inicial (antes de la disrupción), y % de polisacáridos, proteínas y tioles respecto al peso seco de pared (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre muestras según test de rangos múltiples (p<0,05).

Los porcentajes de pared de cada muestra son mucho más altos que los encontrados en la bibliografía, que se sitúan entre el 20 % y el 30 % de peso seco de la levadura [65], [135]. Las paredes de lía de primera fermentación del cava siguen conteniendo altas concentraciones de tartratos, ya que la limpieza inicial de las lías con vino modelo no los elimina, aunque sí los reduce del 77 % presentes en las lías originales al 55 % de las lías después del lavado. Estos tartratos insolubles se depositan en el precipitado después de la centrifugación de las lías rotas, y disminuyen poco después de la limpieza de las paredes, situándose alrededor del 50 % del peso seco de la pared final obtenida. La alta cantidad de tartratos junto con los restos celulares que mostraban las imágenes de microscopio, explican por qué la pared supone un porcentaje tan alto del material inicial.

Las lías de segunda fermentación de cava y Charmat provienen de un proceso de autolisis en el cual se ha perdido la mayor parte del material citoplasmático, lo que implica que las muestras estén compuestas de paredes celulares principalmente. De esta manera, los porcentajes que suponen la pared respecto al material inicial son muy altos. Las levaduras secas comerciales están compuestas de paredes celulares ricas en manoproteínas y glutatión, por lo que su porcentaje de pared también es mucho más alto que el encontrado en la bibliografía. En cuanto a la composición de estas paredes, las lías de primera fermentación, debido nuevamente a su contenido en tartratos, contienen la menor cantidad de polisacáridos, proteínas y tioles ($p<0,05$). Según datos de la bibliografía [65], las paredes celulares de *S. cerevisiae* se componen de un 85 % de polisacáridos y de un 15 % de proteínas. Las paredes más cercanas a estos valores son las de lías de Charmat, mientras que las paredes

de segunda fermentación de cava contienen menos proteína y polisacáridos que los encontrados en la bibliografía. Las paredes de levaduras secas comerciales son las más ricas en proteína, alrededor de un 5 % más que en la bibliografía. La composición de las paredes depende enormemente de las condiciones de crecimiento de la levadura y de los tratamientos y procesos posteriores que ha sufrido, así que las desviaciones respecto a los valores de la bibliografía son habituales.

La tabla 4-18 muestra los valores promedio de actividad antioxidante de las paredes antes del fraccionamiento respecto a su propio peso seco. También con estos datos se realizó un ANOVA simple con el tipo de muestra como factor ($p<0,05$). Los diferentes subíndices indican diferencias significativas entre muestras según test de rangos múltiples. Los valores más altos según los tres métodos corresponden a las paredes de lías de Charmat. En los valores más bajos no hay unanimidad entre métodos: según Folin-Ciocalteau, las paredes con valores más bajos de actividad antioxidante son las de primera fermentación, mientras que según FRAP y DPPH las paredes menos antioxidantes son las de levaduras secas inactivas. Cabe destacar los bajos valores de actividad antioxidante FRAP de las paredes de LSI.

	Folin mg GAE/L	FRAP µM TEQ	DPPH µM TEQ
1ª fermentación	$22,5_a$	$5,5_a$	$12,5_a$
2ª fermentación	$34,4_b$	$2,6_b$	$5,6_b$
Charmat	$59,6_c$	$8,4_c$	$20,9_c$
Levaduras secas inactivas	$35,1_c$	$0,7_d$	$5,2_b$

Tabla 4-18. Valores de actividad antioxidante de las paredes las muestras de lías y LSI respecto al peso seco de pared (n=3). Unidades: mg TEQ/g seco. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre valores de diferentes muestras según test de rangos múltiples (p<0,05).

4.4.2 Fraccionamiento completo de la pared

El fraccionamiento completo de las paredes de las muestras ha consistido en una extracción progresiva de sus componentes, desde los más externos (manoproteínas) a los más internos (β-glucanos), analizando la composición y la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas en cada paso.

4.4.2.1 Composición de las fracciones

En la tabla 4-19 pueden verse los porcentajes en peso de polisacáridos, proteínas, péptidos, aminoácidos libres y tioles de las fracciones obtenidas respecto al peso seco de pared inicial. Se realizó un ANOVA simple con estos datos de composición con variables dependientes y el tipo de muestra como factor ($p<0,05$). Cada una de las fracciones está enriquecida en un tipo determinado de polisacáridos de la pared. En la fracción F1 se extraen mananos y glucanos solubles en agua. En la fracción F2 y F3, puesto que el tratamiento enzimático se realiza a pH 10, se extraen los glucanos solubles en álcali. La última fracción F4 estaría compuesta principalmente por glucanos insolubles. En todos los casos, las fracciones más ricas en polisacáridos son las F1 y la F4.

Muestra	Fracción	% PS	% proteína	% Péptidos	% aa libres	% Tioles
1F	F1	$1,88_a$	$0,23_a$	$0,10_a$	$0,02_a$	$0,015_a$
	F2	$1,31_a$	$2,29_b$	$0,52_b$	$0,23_b$	$0,008_b$
	F3	$0,67_b$	$0,45_c$	$0,18_a$	$0,07_c$	$0,005_c$
	F4	$8,62_c$	$0,10_d$	$0,01_a$	$0,04_c$	-
2F	F1	$20,6_a$	$1,83_a$	$2,90_a$	$0,05_a$	$0,030_a$
	F2	$5,49_b$	$0,73_b$	$5,53_b$	$0,41_b$	$0,018_b$
	F3	$8,98_c$	$0,11_c$	$0,80_c$	$0,13_c$	$0,001_c$
	F4	$41,13_d$	$0,10_c$	$0,08_d$	-	-
X	F1	$12,99_a$	$1,99_a$	$2,81_a$	$0,06_a$	$0,096_a$
	F2	$8,49_b$	$0,66_b$	$10,31_b$	$1,29_b$	$0,033_b$
	F3	$5,69_c$	$0,32_c$	$1,59_c$	$0,46_c$	$0,010_c$
	F4	$36,82_d$	$0,15_d$	$0,13_d$	$0,07_a$	-
LSI	F1	$16,62_a$	$4,12_a$	$4,22_a$	$0,06_a$	$0,066_a$
	F2	$9,07_b$	$0,12_b$	$11,48_b$	$1,12_b$	$0,042_b$
	F3	$6,83_c$	$0,24_b$	$0,94_c$	$0,40_c$	$0,101_c$
	F4	$29,32_d$	$0,32_c$	$0,07_d$	$0,01_a$	$0,024_d$

Tabla 4-19. Porcentaje de polisacáridos totales de las diferentes fracciones obtenidas referidas al peso inicial de pared (n=3). Códigos: 1F= 1ª fermentación; 2F= 2ª fermentación; X= Charmat; LSI= levaduras secas inactivas. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre valores de fracciones según test de rangos múltiples (p<0,05).

En el caso de los porcentajes en peso de proteína total, péptidos y aminoácidos libres, la primera fracción (F1) es la más rica en proteína total en todas las muestras ($p<0,05$), a

excepción de las lías de primera fermentación. Este contenido en proteína representa parte de la fracción de manoproteínas de la pared. El contenido tan alto de tartratos de las paredes de primera fermentación puede ser la razón de que se haya extraído menos cantidad de proteínas en F1 para esta muestra, ya que las concentraciones altas de sales pueden reducir en gran medida la solubilidad de las proteínas. Esto implica que las proteínas precipitan y "aparecen" en la siguiente fracción, F2, al solubilizarse con el medio básico (pH 10) donde actúa la proteasa, como así parece ocurrir.

La siguiente fracción, F2, constituye la fracción con los porcentajes de péptidos y aminoácidos libres más altos ($p<0,05$). Esto es debido a la acción de la proteasa savinasa (alcalasa de *Bacillus sp.*) sobre los enlaces peptídicos. Esta enzima es una endopeptidasa tipo serina poco selectiva [190], por lo que su hidrólisis puede dar como producto péptidos de tamaño diverso y aminoácidos libres. Aparte de enlaces peptídicos, también puede hidrolizar amidas peptídicas y enlaces éster [191].

La fracción F3 proviene del tratamiento con lipasa para la extracción de los lípidos de la pared y la obtención final de los glucanos insolubles. Aunque la lipasa utilizada (lipasa de *Thermomyces lanuginosus*) en principio no tiene actividad peptidasa [192], se obtienen péptidos y aminoácidos libres, como puede verse en la tabla 4-19. También en el fraccionamiento realizado por Jaehrig [136], después del tratamiento con la misma lipasa, se observa que el contenido de proteína en el precipitado obtenido es un 2 % inferior respecto al inicial. Esto lo atribuye a una coactividad proteolítica de la lipasa. Sin embargo, ya que en la bibliografía consultada se indica que no se ha encontrado actividad proteolítica de esta lipasa, es posible que la extracción de la proteína remanente provenga de la susceptibilidad de los enlaces peptídicos al medio básico (pH 10) donde actúa la lipasa [193].

En las muestras de lías (primera fermentación, segunda fermentación de cava y Charmat), la mayor concentración de grupos tioles se encuentra en la primera fracción rica en manoproteínas (F1), aunque esta diferencia no es significativa ($p>0,05$) en el caso de las lías de primera fermentación, donde F1 y F2 tienen valores de tioles totales similares. Esta

tendencia a una mayor concentración en la fracción F1 implica que haya una correlación significativa entre proteínas y grupos tioles, con un coeficiente R^2 de 0,40 ($p<0,05$).

El contenido total de tioles en las fracciones provenientes de primera fermentación, Charmat y LSI es significativamente inferior ($p<0,05$) al contenido de la pared antes del fraccionamiento, con unas disminuciones del 41, 28 y 66 %, respectivamente. En el caso de las fracciones de pared de segunda fermentación del cava, los valores de tioles totales son similares a los de las paredes. Las diminuciones en los contenidos en grupos tioles totales se explica por la facilidad con que los tioles de péptidos y polipéptidos se oxidan al ser expuestos, obteniéndose como productos desde enlaces disulfuro a ácido cisteico [194]. Los grupos tioles, aparte de oxidarse, también pueden llevar a cabo reacciones de Maillard en presencia de carbohidratos, cuyos productos son furanos, compuestos carbonílicos y diversos compuestos volátiles que contienen azufre [195],[196]. Ambos tipos de reacciones suponen una pérdida de grupo funcional tiol.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que el calentamiento inicial a que se someten las paredes de las muestras produce una destrucción térmica de los puentes disulfuro de las proteínas, que da lugar a los productos dehidroalanina y tiocisteína entre los residuos de proteínas [197]. La dehidroalanina reacciona con residuos de lisina para formar una nueva unión (lisinoalanina), y los residuos de tiocisteína descomponen generando un grupo tiol libre que reaccionará con otro grupo tiol. Estas reacciones suponen globalmente una reorganización de los enlaces de las proteínas [198], lo cual puede afectar a la actividad antioxidante de éstas.

4.4.2.2 Actividad antioxidante de las diferentes fracciones

En las figuras 4-24, 4-25 y 4-26 se pueden ver los valores promedio y las desviaciones estándar de las actividades antioxidantes obtenidas para cada fracción de las muestras. Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) simples para cada una de las muestras con los valores de actividad antioxidante como variable respuesta y la fracción (F1, F2, F3 y F4) como

factor. Las letras diferentes de las barras de los gráficos indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre fracciones de una misma muestra según test de rangos múltiples. Para comparar las actividades antioxidantes entre diferentes muestras, se realizó un análisis de la varianza multifactorial (MANOVA), con los datos de actividad antioxidante como variables dependientes y el tipo de muestra y la fracción como factores ($p<0,05$).

De manera global, se puede afirmar que la mayor parte de la actividad antioxidante se encuentra en las dos primeras fracciones (F1 y F2). Estas fracciones son las que contienen la mayor cantidad de proteínas y péptidos. Por el contrario, en todas las muestras se cumple que la última fracción (F4) es la que exhibe menor capacidad antioxidante, siendo ésta la fracción que contiene la menor cantidad de sustancias proteicas y la más rica en glucanos insolubles. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Jaehrig [136], que reporta una baja actividad antioxidante para las fracciones de glucanos insolubles obtenidas de paredes de levadura de cerveza. Sin embargo, los glucanos modificados químicamente, tanto carboximetilados como sulfatados, sí han demostrado poseer capacidad antioxidante [199], [200]. La tercera fracción (F3), en la mayoría de muestras, también exhibe una capacidad antioxidante significativamente superior a la fracción de glucanos. Esta fracción contiene los lípidos situados en la zona interna de la pared, moléculas oxidables pero sin actividad antioxidante, y restos de proteínas en forma de péptidos y aminoácidos. Por lo tanto, la actividad antioxidante de la pared analizada en el apartado anterior reside, principalmente, en sus componentes proteicos.

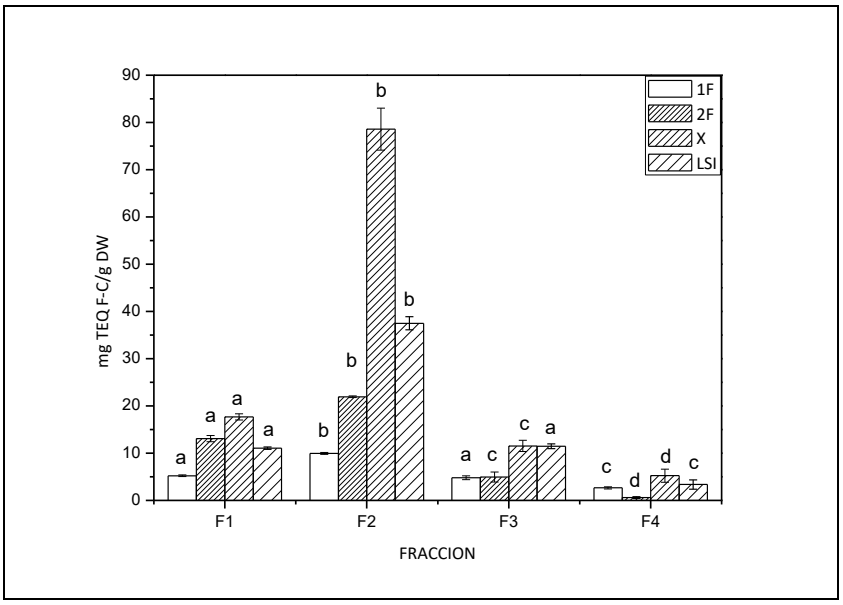


Figura 4-24. Actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas de paredes de lías y LSI medidas por el método Folin-Ciocalteau. Valores referidos al peso seco de pared. Las letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre fracciones de la misma muestra.

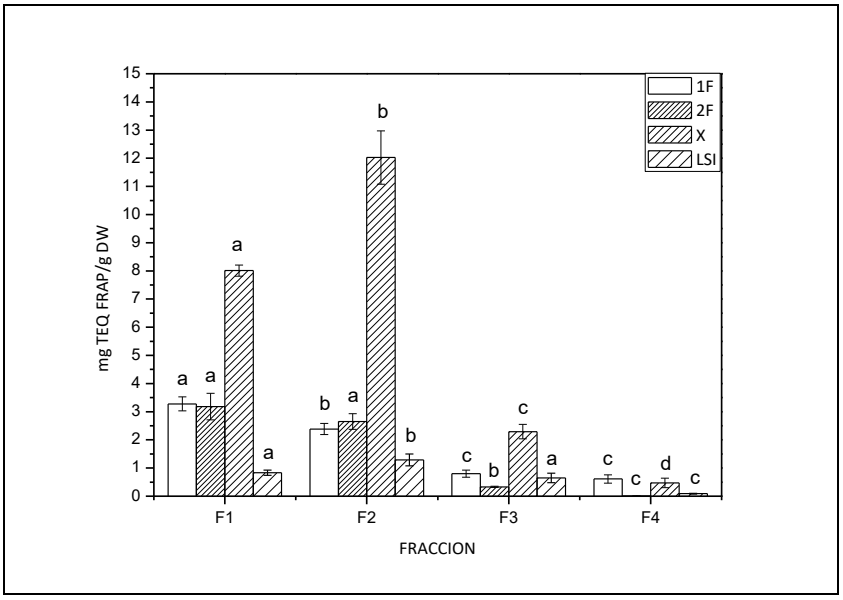


Figura 4-25. Actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas de paredes de lías y LSI medidas por el método FRAP. Valores referidos al peso seco de pared. Las letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre fracciones de la misma muestra.

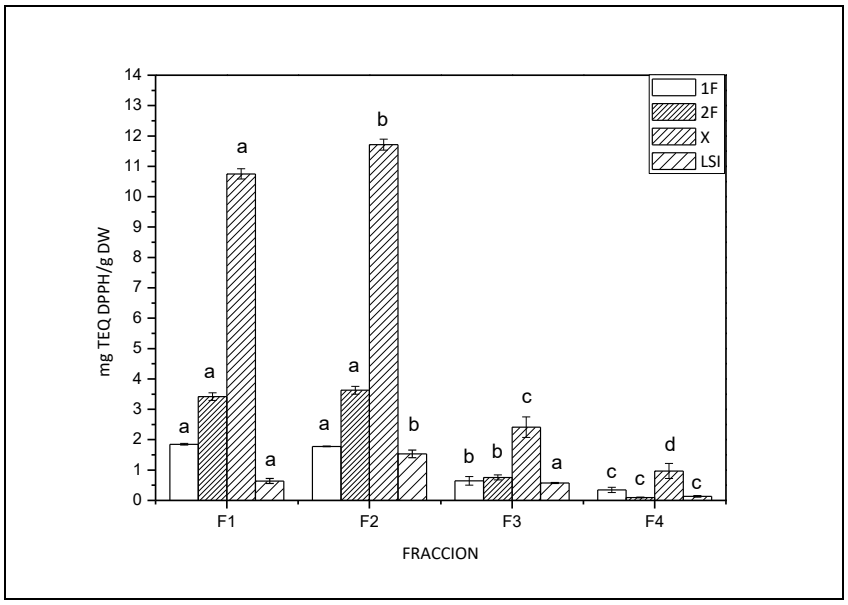


Figura 4-26. Actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas de paredes de lías y LSI medidas por el método DPPH. Valores referidos al peso seco de pared. Las letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre fracciones de la misma muestra.

La capacidad antioxidante de proteínas y péptidos han sido documentados en muchas investigaciones. Proteínas y péptidos de trigo, caseína, yema de huevo, patata, etc, han demostrado inhibir la oxidación lipídica en alimentos modelo [201]–[204]. También los péptidos de hidrolizados de levaduras, que provienen del contenido citoplasmático, han demostrado poseer actividad antioxidante, [205], [206]. La actividad antioxidante de proteínas y péptidos se debe a complejas interacciones que dan como resultados la inactivación de radicales libres, la quelación de metales de transición prooxidantes y la eliminación enzimática de oxidantes específicos. La actividad antioxidante de proteínas y péptidos reside en su secuencia de aminoácidos, y son los residuos de aminoácidos aromáticos, metionina y cisteína los principales involucrados [207].

La desnaturalización de las proteínas puede aumentar la capacidad antioxidante de éstas mediante disrupción de su estructura terciaria e incremento de la accesibilidad del disolvente a los residuos de los aminoácidos. Esto puede explicar por qué la fracción F1 de segunda fermentación de cava, Charmat y LSI tenga una capacidad antioxidante similar para FRAP a la pared antes del fraccionamiento (tabla 4-18), cuando sólo se ha extraído una parte

del contenido en proteínas. Para Folin-Ciocalteau y DPPH esto no se cumple, y la razón de ello puede ser la menor concentración de proteínas de estas fracciones respecto a la pared inicial, así como la pérdida de grupos tioles durante el calentamiento, que disminuye la capacidad antioxidante.

Comparando entre fracciones dentro de la misma muestra, en el caso de las lías Charmat y las muestras LSI, se observa un incremento significativo ($p<0,05$), de la actividad antioxidante de la segunda fracción (F2) respecto a la primera (F1). Este incremento no se observa en la fracción F2 de segunda fermentación del cava, lo que está relacionado con la menor cantidad de proteínas de esta muestra, que implica que se extraigan la mitad de péptidos respecto a las fracciones F2 de Charmat y LSI. Estos incrementos son similares en ambos tipos de muestras para el Folin-Ciocalteau (alrededor del 75 %) y para el FRAP (alrededor del 34 %). Sin embargo, para el DPPH, el incremento de la actividad antioxidante de las fracciones Charmat es tan sólo del 8 %, ya que la fracción F1 tiene una alta capacidad antioxidante. Para las fracciones de LSI el incremento en la actividad antioxidante de F2 respecto a F1 medida por DPPH es del 58 %. Estos incrementos son atribuibles a la producción de péptidos a través de la proteasa, ya que está demostrado que estos poseen una capacidad antioxidante sustancialmente superior a las proteínas intactas [208]. Según Jaehrig [136], la actividad antioxidante de manoproteínas puras es baja en comparación a los extractos del fraccionamiento, lo que parece confirmar este hecho también en las proteínas de la pared de levadura.

La cantidad de péptidos es similar en valores absolutos en las fracciones F2 de Charmat y LSI, sin embargo, la actividad antioxidante de la primera es muy superior a la segunda, siendo esta diferencia mayor para FRAP y DPPH. La actividad antioxidante de los péptidos depende en gran medida de su secuencia de aminoácidos, de manera que si carece de aminoácidos donadores de electrones (tirosina, triptófano, histidina, fenilalanina, cisteína y metionina), o estos no están adecuadamente situados dentro de la cadena peptídica, el péptido no estará disponible para procesos redox, y por lo tanto no ejercerá actividad antioxidante [209]–[211]. Otro aspecto en la capacidad antioxidante de péptidos importante

es la transferencia de electrones desde los aminoácidos donadores a los aceptores de electrones, para la cual influyen no sólo la secuencia en sí, sino también la longitud de la cadena, la estructura secundaria, los enlaces de hidrógeno y la conformación espacial [212]. Todos estos factores son determinantes en la capacidad antioxidante de los péptidos, por lo que la fracción F2 de Charmat contendrá mayores cantidades de péptidos que la fracción F2 de LSI con la secuencia de aminoácidos, la longitud o la conformación correcta.

En la tabla 4-20 pueden verse las correlaciones encontradas entre las actividades antioxidantes medidas con los diferentes métodos empleados, y entre estas y la composición de las fracciones. Todos los métodos antioxidantes correlacionan entre sí, aunque la correlación es más alta entre el FRAP y el DPPH (0,95). Esto está de acuerdo con los resultados de la mayoría de publicaciones, que encuentran altas correlaciones entre diferentes métodos antioxidantes, y con el hecho de que los mecanismos de reacción subyacentes a las actividades antioxidantes medidas sean similares. No se encontraron correlaciones entre actividades antioxidantes y contenido en grupos tioles.

	Folin mg GAE/L	FRAP µM TEQ	DPPH µM TEQ
Folin	-	0,79	0,74
FRAP	0,79	-	0,95
DPPH	0,74	0,95	-
% aminoácidos	0,90	0,52	0,47
% péptidos	0,86	0,51	0,51

Tabla 4-20. Valores de las correlaciones (R^2) obtenidas entre los diferentes métodos de actividad antioxidante utilizados y entre éstos y la concentración de aminoácidos y péptidos (n=48).

Las actividades antioxidantes correlacionan con el contenido en aminoácidos y péptidos. Estas correlaciones son mucho más altas para el Folin-Ciocalteau, lo que se explica porque este método fue originalmente diseñado para la determinación de tirosina y triptófano en proteínas [213], aunque es un método que reacciona con cualquier sustrato reductor, por lo que también se puede utilizar para determinación de la actividad

antioxidante [17]. Unos valores más altos de Folin-Ciocalteau estarán relacionados con mayores cantidades de tirosina y triptófano en las muestras, dos aminoácidos donantes de electrones. También hay que tener en cuenta que la reacción de Folin-Ciocalteau se lleva a cabo bajo pH muy básicos, alrededor de 10, y durante una hora, por lo que puede existir desnaturalización y cierta hidrólisis de proteínas y péptidos. Ambos factores implicarían que la actividad antioxidante medida por este método estaría menos afectada por la conformación o la longitud de proteínas y péptidos, y más por el contenido en aminoácidos aromáticos.

A excepción de la cisteína, que es un aminoácido estrictamente antioxidante, los aminoácidos libres no poseen en general actividad antioxidante, aunque sí se ha encontrado actividad antioxidante medida por los métodos ORAC y ABTS en los aminoácidos aromáticos libres tirosina y triptófano [203]. Es de suponer que la correlación existente entre los métodos FRAP y DPPH se deba a que una mayor degradación de proteínas implica una mayor cantidad de aminoácidos libres y péptidos.

4.4.3 Obtención de manoproteínas en un solo paso

Dado que la actividad antioxidante de las paredes de las muestras reside principalmente en los compuestos proteicos y el creciente interés enológico por las múltiples propiedades de las manoproteínas, se realizaron dos procedimientos para la obtención de éstas en un solo paso en paredes lías de segunda fermentación y LSI. Uno de ellos consistió en una extracción enzimática mediante el uso de una β-1,3-glucanasa, y el otro en una extracción en condiciones básicas suaves (30 mM) y a baja temperatura (4ºC). Después de ambos tratamientos, las muestras se centrifugaron y se analizaron tanto los sobrenadantes como los precipitados.

4.4.3.1 Composición de las fracciones obtenidas

En la tabla 4-21 pueden verse los porcentajes de polisacáridos, proteínas, péptidos, aminoácidos libres y tioles totales respecto al peso seco de pared de los precipitados (P) y

sobrenadantes (S) obtenidos de las paredes de las tres muestras (segunda fermentación de cava, Charmat y LSI) con los dos tratamientos utilizados. Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) simples para cada una de las muestras con los valores de composición como variable respuesta y la fracción (P y S) como factor, y otro análisis de la varianza multifactorial (MANOVA) con los factores fracción, tratamiento y tipo de muestra. Las letras diferentes de la tabla indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre fracciones de una misma muestra y tratamiento según test de rangos múltiples.

Muestra	Tratamiento	Fracción	% PS	% Proteínas	% Péptidos	% aas	% Tioles
2ªFermentación	30 mM	P	$63,3_a$	$0,75_a$	$0,02_a$	$0,09_a$	$0,015_a$
	30 mM	S	$15,8_b$	$8,73_b$	$0,78_b$	$0,04_b$	$0,027_b$
	β-Glu	P	$49,1_a$	$5,16_a$	$0,01_a$	$0,01_a$	$0,022_a$
	β-Glu	S	$28,8_b$	$4,34_b$	$0,07_b$	$0,06_b$	$0,012_b$
Charmat	30 mM	P	$56,6_a$	$0,14_a$	$0,05_a$	$0,01_a$	$0,043_a$
	30 mM	S	$13,4_b$	$13,36_b$	$0,47_b$	$0,01_a$	$0,069_b$
	β-Glu	P	$50,7_a$	$9,88_a$	$0,03_a$	$0,01_a$	$0,087_a$
	β-Glu	S	$18,2_b$	$4,35_b$	$0,06_b$	$0,02_b$	$0,074_b$
Levaduras secas inactivas	30 mM	P	$43,1_a$	$9,29_a$	$0,03_a$	$0,01_a$	$0,167_a$
	30 mM	S	$12,1_b$	$12,91_b$	$0,54_b$	$0,07_b$	$0,291_b$
	β-Glu	P	$42,8_a$	$18,84_a$	$0,06_a$	$0,02_a$	$0,286_a$
	β-Glu	S	$13,4_b$	$2,83_b$	$0,09_b$	$0,04_b$	$0,161_b$

Tabla 4-21. Composición de los precipitados (P) y los sobrenadantes (S) obtenidos con los tratamientos para la obtención de manoproteínas efectuados a las paredes de lías y LSI. Valores referidos al peso seco de pared (n=3). Códigos: 30 mM=tratamiento en medio básico suave; β-Glu=tratamiento con β-1,3-Glucanasa de Helix Pomatia; PS=polisacáridos; Aas=aminoácidos. Las letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre fracciones y tratamiento dentro de la misma muestra según test de rangos múltiples.

En las muestras de lías se extraen significativamente ($p<0,05$) mayores valores de polisacáridos totales en los sobrenadantes con el tratamiento con β-1,3-Glucanasa que con el tratamiento básico suave. La explicación es que esta enzima rompe los enlaces O-glucosídicos de los β-1,3 y β-1,6 glucanos, liberando las manoproteínas con residuos de glucosa. La pared de segunda fermentación del cava fue de la que se extrajeron mayores cantidades de polisacáridos, probablemente porque contiene menores cantidades de manoproteínas y está más expuesta a la acción de la β-1,3-Glucanasa. Por el contrario, la

muestra menos expuesta es la pared de LSI, y es donde la cantidad de polisacáridos extraída fue menor.

Respecto al contenido en proteínas y compuestos relacionados, con el tratamiento básico suave se ha conseguido extraer el 92 % y el 99 % de la proteína de segunda fermentación de cava y Charmat, respectivamente (fracción S del tratamiento 30 mM). En el caso de las paredes de LSI, el porcentaje ha sido mucho más bajo, del 58 %, probablemente porque son paredes menos degradadas y hay menor accesibilidad. La fracción sobrenadante del tratamiento en medio básico suave también es la que contiene mayores valores de péptidos, debido a la hidrólisis que sufren las proteínas en medio básico, aunque estas cantidades son menores que las obtenidas con el tratamiento con proteasa.

Los porcentajes de proteína extraída con el tratamiento con la β-1,3-Glucanasa son significativamente inferiores ($p<0,05$) a los extraídos en medio básico suave. Las cantidades extraídas respecto al total de proteína cuantificada en ambos extractos han sido 46 %, 31% y 13 % para segunda fermentación del cava, segunda fermentación de Charmat y LSI, respectivamente. También en este caso ha influido la mayor accesibilidad y degradación previa de la pared celular de las lías respecto a las paredes LSI. Estos resultados indican que la extracción en medio básico puede ser un buen método para obtener manoproteínas de las lías de segunda fermentación de cava y Charmat. Para las paredes de LSI, sería necesario aumentar los tiempos de incubación para extraer mayor cantidad de manoproteínas en la fracción sobrenadante.

Respecto al contenido en tioles totales de las muestras obtenidas, éstos no se modifican (respecto a los valores de las paredes) para las fracciones de segunda fermentación del cava, sin embargo, sí disminuyen para segunda fermentación del Charmat y LSI. Estas disminuciones son del 42 y 17 % para fracciones de paredes de Charmat, según tratamiento básico suave e hidrólisis con β-1,3-Glucanasa, mientras que las tioles de las fracciones de paredes LSI han disminuido 34 y 35 %, respectivamente. Como era de esperar, existe correlación significativa ($p<0,05$) entre tioles totales y proteínas, con un coeficiente R^2 de 0,66.

4.4.3.2 Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas

En las figuras 4-27, 4-28 y 4-29 se muestran las actividades antioxidantes de los sobrenadantes y los precipitados obtenidos con los dos tratamientos efectuados a las paredes de las diferentes muestras. Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) simples para cada una de las muestras con los valores de actividad antioxidante como variable respuesta y la fracción (P y S) como factor, y otro análisis de la varianza multifactorial (MANOVA) con los factores fracción, tratamiento y tipo de muestra ($p<0,05$).

Los sobrenadantes después del tratamiento básico suave (fracciones 30.S) son los que exhiben la mayor parte de la capacidad antioxidante del conjunto sobrenadante y precipitado. Estas fracciones son las que contienen la mayor cantidad de manoproteínas extraídas. Esto implica que la actividad antioxidante de las paredes de lías reside fundamentalmente en las manoproteínas.

Comparando la actividad antioxidante de las fracciones 30.S de lías Charmat y LSI, se puede observar que la capacidad antioxidante de las primeras es mucho mayor que la de las segundas ($p<0,05$), a pesar de que ambas contienen valores muy similares de proteínas y péptidos totales (tabla 4-21). Esto viene a confirmar los resultados obtenidos en los apartados anteriores: las manoproteínas de lías poseen mayor capacidad antioxidante que las de las levaduras secas inactivas (LSI).

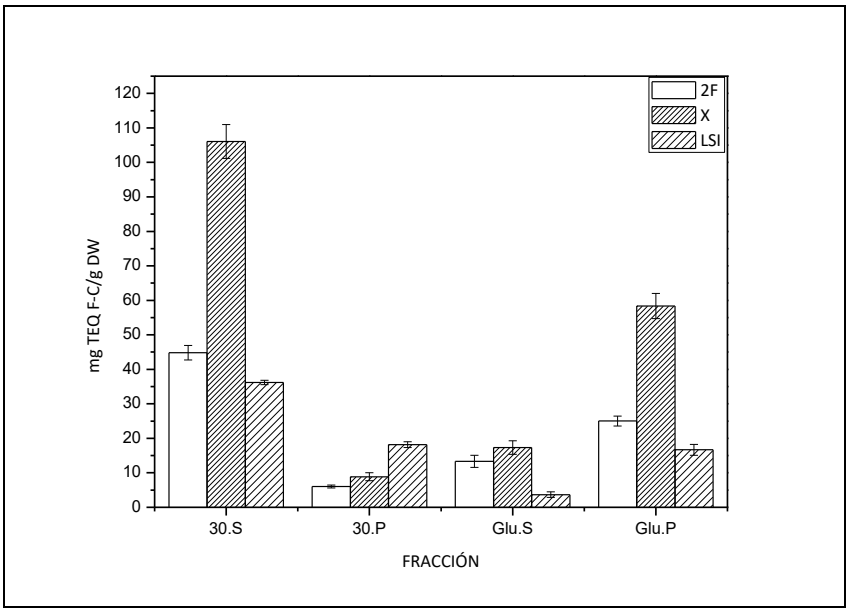


Figura 4-27. Actividad antioxidante (método Folin-Ciocalteau) de los precipitados (P) y los sobrenadantes (S) obtenidos con los tratamientos para la obtención de manoproteínas efectuados a las paredes de lías y LSI. Valores referidos al peso seco de pared (n=3). Códigos: 30.S=sobrenadante después del tratamiento básico; 30.P= precipitado después del tratamiento básico; Glu.S=sobrenadante después del tratamiento con glucanasa; Glu.P= precipitado después del tratamiento con glucanasa. Códigos: 2F= 2ª fermentación; X= Charmat; LSI= levaduras secas inactivas.

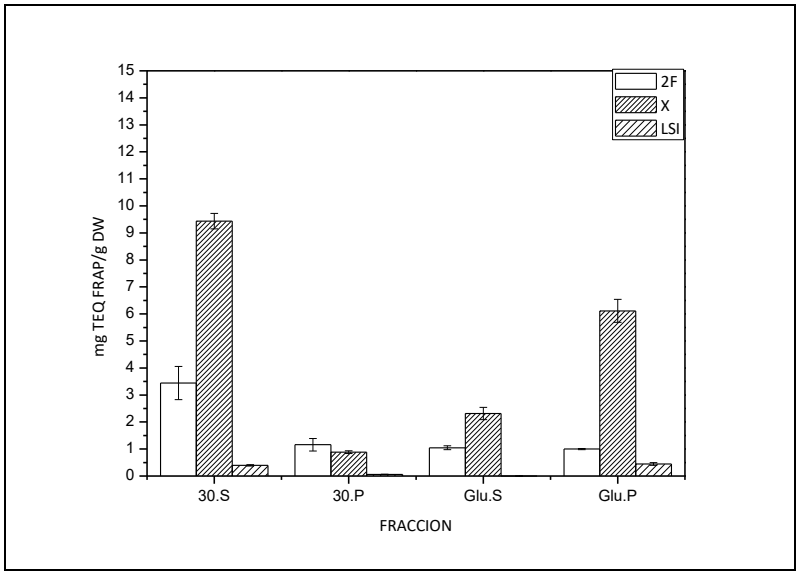


Figura 4-28. Actividad antioxidante (método FRAP) de los precipitados (P) y los sobrenadantes (S) obtenidos con los tratamientos para la obtención de manoproteínas efectuados a las paredes de lías y LSI. Valores referidos al peso seco de pared (n=3). Códigos: 30.S=sobrenadante después del tratamiento básico; 30.P= precipitado después del tratamiento básico; Glu.S=sobrenadante después del tratamiento con glucanasa; Glu.P= precipitado después del tratamiento con glucanasa. Códigos: 2F= 2ª fermentación; X= Charmat; LSI= levaduras secas inactivas.

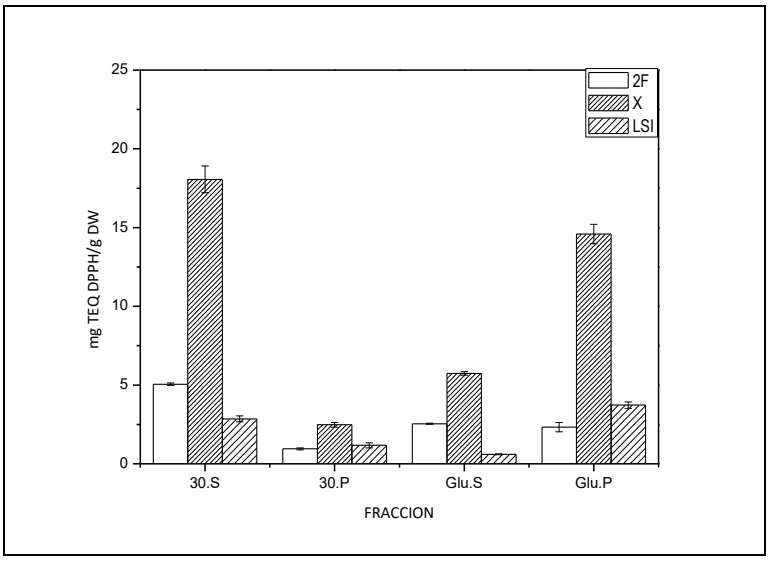


Figura 4-29. Actividad antioxidante (método DPPH) de los precipitados (P) y los sobrenadantes (S) obtenidos con los tratamientos para la obtención de manoproteínas efectuados a las paredes de lías y LSI. Valores referidos al peso seco de pared (n=3). Códigos: 30.S=sobrenadante después del tratamiento básico; 30.P= precipitado después del tratamiento básico; Glu.S=sobrenadante después del tratamiento con glucanasa; Glu.P= precipitado después del tratamiento con glucanasa. Códigos: 2F= 2ª fermentación; X= Charmat; LSI= levaduras secas inactivas

4.4.4 Conclusiones del capítulo

Se han aislado y caracterizado las paredes celulares de muestras de lías de primera fermentación, lías de segunda fermentación del cava y de Charmat, y de levaduras secas inactivas comerciales. Para ello, se ha realizado un fraccionamiento completo de la pared, desde los componentes más externos (manoproteínas), a los más internos (β-glucanos), analizando la composición y actividad antioxidante de cada fracción obtenida.

En todas las muestras, las fracciones más ricas en compuestos proteicos han demostrado la mayor capacidad antioxidante, mientras que los valores más bajos han correspondido a la fracción de β-glucanos. La actividad antioxidante se ha correlacionado también con la cantidad de péptidos y aminoácidos libres de las fracciones, lo que indica que con la hidrólisis de los compuestos proteicos de la pared se incrementan sus valores de capacidad antioxidante.

En vista del interés enológico de las manoproteínas de la pared y de los resultados de actividad antioxidante del fraccionamiento completo, se realizaron dos tratamientos alternativos para la obtención de manoproteínas de la pared en sólo un paso y condiciones muy suaves; un tratamiento enzimático y otro en condiciones básicas suaves. Con el tratamiento en condiciones básicas suaves se consiguió extraer el 92 % y el 99 % de la manoproteína de las paredes de lías segunda fermentación de cava y Charmat, respectivamente. La fracción de manoproteínas obtenida también demostró exhibir la mayor parte de la actividad antioxidante de la pared, lo que implica, de nuevo, que la actividad antioxidante de las paredes de lías se debe a su contenido en manoproteínas.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Nunca te das cuenta de lo que has hecho; sólo puedes ver lo que te queda por hacer.
-Marie Curie-

En el presente trabajo se ha intentado dar respuesta a la falta de información existente sobre uno de los subproductos principales en la elaboración de vinos espumosos: las lías de segunda fermentación. Para ello, se ha evaluado su rol en la crianza de diferentes vinos espumosos en condiciones enológicas reales y se han caracterizado como subproducto con diferentes metodologías.

La actividad antioxidante es una propiedad destacable de los vinos tranquilos y aún más en los vinos espumosos, ya que pueden experimentar largas crianzas, incluso de años para los Gran reserva. Los vinos espumosos se caracterizan por un envejecimiento biológico en sus propias lías, en el cual se produce el proceso de autolisis. Este proceso implica una cesión de compuestos de la lía al vino, tanto de la pared como del citoplasma, algunos de los cuales pueden poseer capacidad antioxidante. En este sentido, se ha intentado esclarecer cuál es el papel de las lías (células plasmolizadas de *Saccharomyces cerevisiae*) en la evolución y calidad de los vinos a lo largo del tiempo de envejecimiento. Por ello, se ha analizado la composición y la actividad antioxidante de dos tipos de vinos espumosos elaborados según los dos métodos más utilizados para la toma de espuma: cava (método tradicional) y Charmat (método Granvás), durante el envejecimiento con lías y sin lías.

En este sentido, se ha constatado que, durante el envejecimiento biológico en contacto con lías, la actividad antioxidante de los vinos espumosos no cambia. Sin embargo, una vez que se retiran, mediante la operación de degüelle necesaria para la comercialización, se observa un descenso de la actividad antioxidante de los vinos que no está ligado al

contenido en fenoles (que determinados por HPLC-UV no presentan influencia significativa) ni a otros antioxidantes clásicos (glucanos, glutatión y otros compuestos tiólicos). Teniendo en cuenta que las lías aportan una serie de sustancias con carácter antioxidante y que la propia lía disminuye su actividad antioxidante durante el tiempo de crianza, se puede concluir que la presencia de lías involucra unos intercambios con el medio vino que protegen al vino espumoso de su oxidación. El efecto protector de la presencia de lías sobre la actividad antioxidante se produce, por lo tanto, en los espumosos con menor contacto con lías (Charmat), y en los vinos espumosos que han sufrido una oxidación mayor (Gran reserva), es decir, en los vinos espumosos más desprotegidos. La presencia de las lías puede modular la actividad antioxidante de los vinos espumosos, dotándolos de compuestos que pueden ejercer un efecto protector sobre la actividad antioxidante durante el envejecimiento sur lie.

En cuanto a la caracterización morfológica, estructural y poblacional de las lías, mediante microscopía óptica confocal y citometría de flujo, se han visualizado diferencias entre las lías de primera fermentación, segunda fermentación de cava y de Charmat, y levaduras secas comerciales (coadyuvante enológico), aun cuando todas ellas conservan la integridad de su pared celular. Las diferencias residen en el porcentaje de componentes exógenos a las lías: restos celulares, bentonita, cristales de tartrato, que son especialmente abundantes en las lías de primera fermentación. Sus tamaños se sitúan alrededor de 3 µm de diámetro menor y 5 µm de diámetro mayor, aunque cuanto mayor es el tiempo de crianza (o el grado de autolisis) se aprecia una tendencia al encogimiento celular. Por primera vez se han establecido parámetros de dispersión que muestran la distribución de partículas y células en las lías y levaduras inactivas comerciales. Las muestras de primera fermentación son las más heterogéneas y las que contienen menores cantidades de células por gramo seco. Las lías tienen diferente densidad de células según procedan de cava o de Charmat, con unas concentraciones de 1,12·E10 células/gramo seco para lías de cava y de 2,76·E10 células/gramo seco para Charmat. Aunque ambos tipos de lías muestran las típicas curvas gaussianas de poblaciones celulares según sus señales de dispersión, las lías del cava tienen alrededor de un 13 % más de partículas que se pueden considerar restos celulares. Para determinar la posible viabilidad celular de estos subproductos se han usado dos fluorocromos

para ácidos nucleicos con diferentes características: el SYTO 13 y el yoduro de propidio. Prácticamente todos los tipos de células de lías se han marcado con ambos fluorocromos, lo que es un indicio de que la gran mayoría de células tienen las membranas alteradas debido a la plasmólisis. Sin embargo, las muestras de segunda fermentación del cava tenían alrededor del 10 % de células que podrían ser viables según resultados del marcaje por citometría. Este aspecto tendría que ser comprobado en futuros estudios.

En cuanto a la caracterización composicional de lías recuperadas de la elaboración de vinos espumosos, se ha constatado que éstas pueden ser fuente de diversos compuestos susceptibles de valorización a nivel industrial, especialmente porque consisten básicamente en paredes celulares. En particular, las lías de primera fermentación contienen una alta concentración de tartratos y las de segunda fermentación una alta concentración en compuestos fenólicos característicos de vinos espumosos. En este sentido, se ha analizado por HPLC-UV la concentración de fenoles individuales que han absorbido estas lías de segunda fermentación, y tanto las lías de Cava como de Charmat retienen una cantidad importante de compuestos fenólicos típicos, como ácido caftárico, catequina y epicatequina, que pueden ser fácilmente desorbidos. Las lías recuperadas de vinos espumosos exhiben una capacidad antioxidante y unas características composicionales similares a la de los productos enológicos, levaduras secas inactivas, que se comercializan por sus propiedades antioxidantes. Los compuestos más destacables de las lías son polisacáridos (70 – 75 %) y proteínas (9 – 15 %). El contenido en tioles (0,04 – 0,15 %) está muy por debajo del que tiene habitualmente las células de *S. cerevisiae* viables (alrededor del 1 %).

A fin de esclarecer en qué compuestos de la pared reside la capacidad antioxidante, se ha realizado un fraccionamiento completo de la pared, desde los componentes más externos (manoproteínas), a los más internos (β-glucanos), analizando la composición y actividad antioxidante de cada fracción. En todas las muestras, las fracciones más ricas en compuestos proteicos han demostrado la mayor capacidad antioxidante, mientras que los valores más bajos han correspondido a la fracción de β-glucanos. La actividad antioxidante se ha correlacionado también con la cantidad de péptidos y aminoácidos libres, lo que indica

que tras una hidrólisis de los compuestos proteicos de la pared se incrementan sus valores de capacidad antioxidante. Un fraccionamiento o tratamiento en condiciones básicas suaves (pH 8) permite extraer más del 90% de las manoproteínas de la pared, lo que resulta prometedor para la purificación de estos componentes parietales de las lías con gran capacidad antioxidante

6. CONCLUSIONES

El lenguaje de la verdad debe ser, sin duda alguna, simple y sin artificios.
-Séneca-

La caracterización de las lías de segunda fermentación y la evaluación de su rol en la crianza de los vinos espumosos ha sido uno de los puntos claves en la calidad de estos vinos y, por tanto, de gran interés para la industria enológica. En el presente trabajo se ha intentado dar respuesta a la falta de información existente sobre uno de los subproductos principales en la elaboración de vinos espumosos: las lías de segunda fermentación. Para ello, se ha evaluado su rol en la crianza de diferentes vinos en condiciones enológicas reales y se han caracterizado en vistas a su posible revalorización por sus componentes y su potencial antioxidante. Las conclusiones de la presente tesis doctoral resultan muy prometedoras para el sector de los vinos espumosos y se destacan en:

-Durante el envejecimiento biológico en lías, la actividad antioxidante de los vinos espumosos no cambia. Sin embargo, una vez que se degüella el vino, se observa un descenso de la actividad antioxidante que no es atribuible al contenido fenólico. Teniendo en cuenta que las lías aportan una serie de antioxidantes y que la propia lía disminuye su actividad antioxidante durante la crianza, se puede concluir que las lías tienen un importante papel en el envejecimiento de los espumosos.

-Por microscopía confocal se observa que las lías, subproducto de la elaboración de cava y de Charmat, mantienen incluso durante largas crianzas (meses y/o años) la estructura ovoide típica de la célula y la integridad de la pared. Su diámetro se sitúa entre 3 y 5 µm, algo inferior al tamaño medio de la levadura viable. Sin embargo, se constata la degradación

citoplasmática y la plasmólisis celular, tanto en las lías de segunda fermentación de cava como de Charmat.

-Mediante la aplicación de citometría de flujo con fluorescencia se ha observado que el 90 % de las células de lías de cava y el 98 % de las células de lías de Charmat tienen las membranas plasmáticas rotas y son células no viables. El número de células de las lías de Charmat es de $2{,}76 \cdot 10^{10}$ células/gramo seco y de $1{,}12 \cdot 10^{10}$ células/gramo seco para el cava.

-De los análisis de composición y actividad antioxidante de las lías se puede deducir que la capacidad antioxidante de las lías reside fundamentalmente en la pared. Los compuestos principales de estas paredes celulares son los polisacáridos (70 – 75 %) y las proteínas (9 – 15 %). Tras un fraccionamiento de la pared celular de lías, se puede concluir que la actividad antioxidante no se debe al contenido en tioles (0,04% - 0,15%), ni a los glucanos de la pared, sino a la fracción de manoproteínas.

REFERENCIAS

[1] S. Buxaderas y E. López-Tamames, «19 - Managing the quality of sparkling wines», en *Managing Wine Quality*, A. G. Reynolds, Ed. Woodhead Publishing, 2010, pp. 553-588.

[2] *Reglamento (CE) nº 479/2008 del Consejo de 29 de abril de 2008 por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola*.

[3] J. L. A. Benavent y M. I. Á. Cano, *Tecnología Enológica*. Síntesis Editorial, 2003.

[4] S. Buxaderas y E. López-Tamames, «Chapter 1 - Sparkling Wines: Features and Trends from Tradition», en *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. Volume 66, Jeyakumar Henry, Ed. Academic Press, 2012, pp. 1-45.

[5] S. Buxaderas y E. López-Tamames, «WINES | Production of Sparkling Wines», en *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Benjamin Caballero, Ed. Oxford: Academic Press, 2003, pp. 6203-6209.

[6] B. W. Zoecklein, *A Review of Method Champenoise Production*. Virginia Cooperative Extension Service, 1989.

[7] R. J. Gryglewski, R. Korbut, J. Robak, y J. Swies, «On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids», *Biochem. Pharmacol.*, vol. 36, n.º 3, pp. 317-322, feb. 1987.

[8] E. N. Frankel, J. Kanner, J. B. German, E. Parks, y J. E. Kinsella, «Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 341, n.º 8843, pp. 454-457, feb. 1993.

[9] H. Tapiero, K. D. Tew, G. N. Ba, y G. Mathé, «Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?», *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie*, vol. 56, n.º 4, pp. 200-207, jun. 2002.

[10] C. A. Stefenon *et al.*, «Phenolic composition and antioxidant activity in sparkling wines: Modulation by the ageing on lees», 2013.

[11] C. A. Stefenon *et al.*, «Antioxidant activity of sparkling wines produced by Champenoise and Charmat methods», *Food Chem.*, vol. 119, n.º 1, pp. 12-18, 2010.

[12] M. T. Satué-Gracia, C. Andrés-Lacueva, R. M. Lamuela-Raventós, y E. N. Frankel, «Spanish Sparkling Wines (Cavas) As Inhibitors of in Vitro Human Low-Density Lipoprotein Oxidation», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, n.º 6, pp. 2198-2202, jun. 1999.

[13] J. M. Rodriguez-Nogales, E. Fernández-Fernández, M. Gómez, y J. Vila-Crespo, «Antioxidant properties of sparkling wines produced with β-glucanases and commercial yeast preparations», *J. Food Sci.*, vol. 77, n.º 9, pp. C1005-1010, sep. 2012.

[14] A. M. Jordão, F. J. Gonçalves, A. C. Correia, J. Cantão, M. D. Rivero-Pérez, y M. L. González SanJosé, «Proanthocyanidin content, antioxidant capacity and scavenger activity of Portuguese sparkling wines (Bairrada Appellation of Origin)», *J. Sci. Food Agric.*, vol. 90, n.º 12, pp. 2144-2152, sep. 2010.

[15] L. Packer, *Handbook of Antioxidants*. CRC Press, 2001.

[16] E. Niki y N. Noguchi, «Evaluation of Antioxidant Capacity. What Capacity is being Measured by Which Method?», *IUBMB Life*, vol. 50, n.º 4-5, pp. 323–329, 2000.

[17] D. Huang, B. Ou, y R. L. Prior, «The chemistry behind antioxidant capacity assays», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, n.º 6, pp. 1841-1856, mar. 2005.

[18] V. L. Singleton y J. A. Rossi, «Colorimetry of total phenolics [in grapes and wine] with phosphomolybdic -phosphotungstic acid reagents», *Amer J Enol Viticult*, vol. 16, n.º (3), pp. 144-158, 1965.

[19] V. L. Singleton, R. Orthofer, y R. M. Lamuela-Raventós, «[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent», en *Methods in Enzymology*, vol. Volume 299, Lester Packer, Ed. Academic Press, 1999, pp. 152-178.

[20] R. L. Prior, X. Wu, y K. Schaich, «Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, n.º 10, pp. 4290-4302, may 2005.

[21] P. Ribéreau-Gayon, «Chapter 8 - The Anthocyanins of Grapes and Wines», en *Anthocyanins As Food Colors*, P. Markakis, Ed. Academic Press, 1982, pp. 209-244.

[22] J. L. Robichaud y A. C. Noble, «Astringency and bitterness of selected phenolics in wine», *J. Sci. Food Agric.*, vol. 53, n.º 3, pp. 343-353, ene. 1990.

[23] A. L. Waterhouse, «Wine Phenolics», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 957, n.º 1, pp. 21-36, may 2002.

[24] M. Chamkha, B. Cathala, V. Cheynier, y R. Douillard, «Phenolic composition of champagnes from chardonnay and pinot noir vintages», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, n.º 10, pp. 3179-3184, 2003.

[25] M. Ibern-Gómez, C. Andrés-Lacueva, R. M. Lamuela-Raventós, S. Buxaderas, V. L. Singleton, y M. C. de la Torre-Boronat, «Browning of Cava (Sparkling Wine) During

Aging in Contact with Lees Due to the Phenolic Composition», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 51, n.º 1, pp. 29-36, ene. 2000.

[26] M. Á. Pozo-Bayón, M. T. Hernández, P. J. Martín-Álvarez, y M. C. Polo, «Study of Low Molecular Weight Phenolic Compounds during the Aging of Sparkling Wines Manufactured with Red and White Grape Varieties», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, n.º 7, pp. 2089-2095, mar. 2003.

[27] R. Delgado, P. Martín, M. del Álamo, y M.-R. González, «Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates», *J. Sci. Food Agric.*, vol. 84, n.º 7, pp. 623-630, may 2004.

[28] J.-P. Mazauric y J.-M. Salmon, «Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: I. Analysis of Remnant Polyphenolic Compounds in the Resulting Wines», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, n.º 14, pp. 5647-5653, jun. 2005.

[29] J.-P. Mazauric y J.-M. Salmon, «Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: II. Analysis of Desorbed Polyphenol Compounds from Yeast Lees», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, n.º 11, pp. 3876-3881, may 2006.

[30] G. J. Soleas, E. P. Diamandis, y D. M. Goldberg, «Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?», *Clin. Biochem.*, vol. 30, n.º 2, pp. 91-113, mar. 1997.

[31] A. Serra-Cayuela, M. A. Aguilera-Curiel, M. Riu-Aumatell, S. Buxaderas, y E. López-Tamames, «Browning during biological aging and commercial storage of Cava sparkling wine and the use of 5-HMF as a quality marker», *Food Res. Int.*, vol. 53, n.º 1, pp. 226-231, ago. 2013.

[32] *Reglamento (CE) n° 1493/1999 del Consejo de 17 de mayo de 1999 por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola*.

[33] H. Li, A. Guo, y H. Wang, «Mechanisms of oxidative browning of wine», *Food Chem.*, vol. 108, n.º 1, pp. 1-13, may 2008.

[34] T. Garde-Cerdán, A. R. Marsellés-Fontanet, M. Arias-Gil, C. Ancín-Azpilicueta, y O. Martín-Belloso, «Influence of SO_2 on the evolution of volatile compounds through alcoholic fermentation of must stabilized by pulsed electric fields», *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 227, n.º 2, pp. 401-408, ago. 2007.

[35] P. P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche, y A. Lonvaud, *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications, Volume 1, 2nd Edition*. 2006.

[36] J. C. Danilewicz, J. T. Seccombe, y J. Whelan, «Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfur Dioxide in Model Wine and Wine», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 59, n.º 2, pp. 128-136, ene. 2008.

[37] J. C. Danilewicz, «Interaction of Sulfur Dioxide, Polyphenols, and Oxygen in a Wine-Model System: Central Role of Iron and Copper», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 58, n.º 1, pp. 53-60, ene. 2007.

[38] *Reglamento (CE) nº 643/2006 de la Comisión, de 27 de abril de 2006 que modifica el Reglamento (CE) nº 1622/2000, y el Reglamento (CE) nº 884/2001.*

[39] R. D. Hancock, J. R. Galpin, y R. Viola, «Biosynthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) by Saccharomyces cerevisiae», *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 186, n.º 2, pp. 245-250, may 2000.

[40] J. C. Danilewicz, «Review of Reaction Mechanisms of Oxygen and Proposed Intermediate Reduction Products in Wine: Central Role of Iron and Copper», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 54, n.º 2, pp. 73-85, ene. 2003.

[41] R. B. Boulton, V. L. Singleton, L. F. Bisson, y R. E. Kunkee, *Principles and Practices of Winemaking*. Boston, MA: Springer US, 1999.

[42] O. Makhotkina y P. A. Kilmartin, «Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry», *J. Electroanal. Chem.*, vol. 633, n.º 1, pp. 165-174, ago. 2009.

[43] C. Barril, A. C. Clark, y G. R. Scollary, «Understanding the contribution of ascorbic acid to the pigment development in model white wine systems using liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection techniques», *Anal. Chim. Acta*, vol. 621, n.º 1, pp. 44-51, jul. 2008.

[44] M. P. Bradshaw, P. D. Prenzler, y G. R. Scollary, «Ascorbic Acid-Induced Browning of (+)-Catechin In a Model Wine System», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, n.º 2, pp. 934-939, feb. 2001.

[45] D. Fracassetti, N. Lawrence, A. G. J. Tredoux, A. Tirelli, H. H. Nieuwoudt, y W. J. Du Toit, «Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method», *Food Chem.*, vol. 128, n.º 4, pp. 1136-1142, oct. 2011.

[46] L. Janeš, K. Lisjak, y A. Vanzo, «Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection», *Anal. Chim. Acta*, vol. 674, n.º 2, pp. 239-242, ago. 2010.

[47] S. Marchand y G. de Revel, «A HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine», *Anal. Chim. Acta*, vol. 660, n.º 1–2, pp. 158-163, feb. 2010.

[48] E. C. Kritzinger, «Winemaking practices affecting glutathione concentrations in white wine», Thesis, Stellenbosch: Stellenbosch University, 2012.

[49] O. Makhotkina, L. D. Araujo, K. Olejar, M. Herbst-Johnstone, B. Fedrizzi, y P. A. Kilmartin, «Aroma Impact of Ascorbic Acid and Glutathione Additions to Sauvignon blanc at Harvest to Supplement Sulfur Dioxide», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 65, n.º 3, pp. 388-393, sep. 2014.

[50] I. G. Roussis y S. Sergianitis, «Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid», *Flavour Fragr. J.*, vol. 23, n.º 1, pp. 35-39, ene. 2008.

[51] L. Panero, S. Motta, M. Petrozziello, M. Guaita, y A. Bosso, «Effect of SO2, reduced glutathione and ellagitannins on the shelf life of bottled white wines», *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 240, n.º 2, pp. 345-356, sep. 2014.

[52] V. Webber, S. V. Dutra, F. R. Spinelli, Â. R. Marcon, G. J. Carnieli, y R. Vanderlinde, «Effect of glutathione addition in sparkling wine», *Food Chem.*, vol. 159, pp. 391-398, sep. 2014.

[53] P. Comuzzo, F. Battistutta, M. Vendrame, M. S. Páez, G. Luisi, y R. Zironi, «Antioxidant properties of different products and additives in white wine», *Food Chem.*, vol. 168, pp. 107-114, feb. 2015.

[54] N. Cavazzani, *Fabricación de vinos espumosos*. Acribia Editorial, S.A., 1988.

[55] C. P. Kurtzman y J. W. Fell, «Yeast Systematics and Phylogeny — Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology», en *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, D. G. Péter y P. C. Rosa, Eds. Springer Berlin Heidelberg, 2006, pp. 11-30.

[56] G. M. Walker, *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, 1998.

[57] D. Botstein *et al.*, «1 The Yeast Cytoskeleton», *Cold Spring Harb. Monogr. Arch.*, vol. 21C, n.º 0, pp. 1-90, ene. 1997.

[58] A. V. C. Santiago, R. Muñoz, y R. G. Garcia, *Molecular Wine Microbiology*. Academic Press, 2011.

[59] W. N. Arnold, *Yeast Cell Envelopes--biochemistry, Biophysics, and Ultrastructure*. CRC Press, 1981.

[60] I. S. Pretorius, «Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking», *Yeast*, vol. 16, n.º 8, pp. 675-729, jun. 2000.

[61] F. M. Klis, A. Boorsma, y P. W. J. De Groot, «Cell wall construction in Saccharomyces cerevisiae», *Yeast Chichester Engl.*, vol. 23, n.º 3, pp. 185-202, feb. 2006.

[62] F. M. Klis, P. Mol, K. Hellingwerf, y S. Brul, «Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*», *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 26, n.º 3, pp. 239–256, 2002.

[63] T. H. Nguyen, G. H. Fleet, y P. L. Rogers, «Composition of the cell walls of several yeast species», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 50, n.º 2, pp. 206-212, ago. 1998.

[64] M. Osumi, «The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation», *Micron Oxf. Engl. 1993*, vol. 29, n.º 2-3, pp. 207-233, jun. 1998.

[65] G. Lesage y H. Bussey, «Cell Wall Assembly in Saccharomyces cerevisiae», *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 70, n.º 2, pp. 317-343, ene. 2006.

[66] J. G. De Nobel, F. M. Klis, J. Priem, T. Munnik, y H. Van Den Ende, «The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*», *Yeast*, vol. 6, n.º 6, pp. 491–499, 1990.

[67] S. Strahl-Bolsinger, M. Gentzsch, y W. Tanner, «Protein O-mannosylation», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1426, n.º 2, pp. 297-307, ene. 1999.

[68] Y. Jigami y T. Odani, «Mannosylphosphate transfer to yeast mannan», *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1426, n.º 2, pp. 335-345, ene. 1999.

[69] R. Kollár *et al.*, «Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->)3-glucan, and chitin», *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n.º 28, pp. 17762-17775, jul. 1997.

[70] M. Pittet y A. Conzelmann, «Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast Saccharomyces cerevisiae», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1771, n.º 3, pp. 405-420, mar. 2007.

[71] P. W. J. De Groot, A. F. Ram, y F. M. Klis, «Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls», *Fungal Genet. Biol.*, vol. 42, n.º 8, pp. 657-675, ago. 2005.

[72] L. Castillo, A. I. Martinez, A. Garcerá, M. V. Elorza, E. Valentín, y R. Sentandreu, «Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of Saccharomyces cerevisiae Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall beta-1,3-glucan», *Yeast Chichester Engl.*, vol. 20, n.º 11, pp. 973-983, ago. 2003.

[73] M. Ecker, R. Deutzmann, L. Lehle, V. Mrsa, y W. Tanner, «Pir Proteins of *Saccharomyces cerevisiae* Are Attached to β-1,3-Glucan by a New Protein-Carbohydrate Linkage», *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n.º 17, pp. 11523-11529, abr. 2006.

[74] R. Kollár, E. Petráková, G. Ashwell, P. W. Robbins, y E. Cabib, «Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-->3)-glucan», *J. Biol. Chem.*, vol. 270, n.º 3, pp. 1170-1178, ene. 1995.

[75] M. Gonzalez, P. W. J. de Groot, F. M. Klis, y P. N. Lipke, «Chapter 10 - Glycoconjugate structure and function in fungal cell walls», en *Microbial Glycobiology*, O. Holst, P. J. Brennan, M. von Itzstein, y A. P. Moran, Eds. San Diego: Academic Press, 2010, pp. 169-183.

[76] T. L. Babayan, M. G. Bezrukov, V. K. Latov, V. M. Belikov, E. M. Belavtseva, y E. F. Titova, «Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: Morphological effects, rheological effects, and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products», *Curr. Microbiol.*, vol. 5, n.º 3, pp. 163-168, may 1981.

[77] G. H. Fleet, *Wine Microbiology and Biotechnology*. CRC Press, 1993.

[78] B. E. N. Todd, G. H. Fleet, y P. A. Henschke, «Promotion of Autolysis Through the Interaction of Killer and Sensitive Yeasts: Potential Application in Sparkling Wine Production», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 51, n.º 1, pp. 65-72, ene. 2000.

[79] L. Lurton, J. Segain, y M. Feuillat, «Proteolysis During the Autolysis of Yeasts Under Acidic Conditions», *Sci. Aliments*, vol. 9, n.º 1, pp. 111-123, 1989.

[80] H. Alexandre, D. Heintz, D. Chassagne, M. Guilloux-Benatier, C. Charpentier, y M. Feuillat, «Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions», *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, n.º 4, pp. 235-240, abr. 2001.

[81] C. Fornairon-Bonnefond, C. Camarasa, M. Moutounet, y J. M. Salmon, «New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: a bibliographic review, Etat des connaissances scientifiques actuelles sur le phénomène d'autolyse des levures et l'élevage des vins sur lies», *Int. J. Vine Wine Sci.*, vol. v. 36(2, 2002.

[82] M. Feuillat y C. Charpentier, «Autolysis of Yeasts in Champagne», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 33, n.º 1, pp. 6-13, 1982.

[83] M. Leroy, M. Charpentier, B. Duteurtre, M. Feuillat, y C. Charpentier, «Yeast Autolysis During Champagne Aging», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 41, n.º 1, pp. 21-28, 1990.

[84] H. Alexandre, «2.45 - Autolysis of Yeasts A2 - Moo-Young, Murray», en *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Burlington: Academic Press, 2011, pp. 641-649.

[85] J. Zhao y G. H. Fleet, «Degradation of DNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*», *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30, n.º 3, pp. 175-182, feb. 2003.

[86] J. Zhao y G. H. Fleet, «Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*», *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 32, n.º 9, pp. 415-423, ago. 2005.

[87] F. Piton, M. Charpentier, y D. Troton, «Cell-Wall and Lipid Changes in *Saccharomyces-Cerevisiae* During Aging of Champagne Wine», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 39, n.º 3, pp. 221-226, 1988.

[88] A. . Martínez-Rodríguez, M. . Polo, y A. . Carrascosa, «Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines», *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 71, n.º 1, pp. 45-51, dic. 2001.

[89] R. Tudela, J. J. Gallardo-Chacón, N. Rius, E. López-Tamames, y S. Buxaderas, «Ultrastructural changes of sparkling wine lees during long-term aging in real enological conditions», *FEMS Yeast Res.*, vol. 12, n.º 4, pp. 466-476, 2012.

[90] T. Hernawan y G. Fleet, «Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts», *J. Ind. Microbiol.*, vol. 14, n.º 6, pp. 440-450, jun. 1995.

[91] A. J. Martínez-Rodríguez y M. C. Polo, «Characterization of the Nitrogen Compounds Released during Yeast Autolysis in a Model Wine System», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, n.º 4, pp. 1081-1085, abr. 2000.

[92] V. Moreno-Arribas, E. Pueyo, y M. C. Polo, «Peptides in Musts and Wines. Changes during the Manufacture of Cavas (Sparkling Wines)», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 44, n.º 12, pp. 3783-3788, 1996.

[93] V. Moreno-Arribas, E. Pueyo, M. C. Polo, y P. J. Martín-Álvarez, «Changes in the Amino Acid Composition of the Different Nitrogenous Fractions during the Aging of Wine with Yeasts», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, n.º 10, pp. 4042-4051, oct. 1998.

[94] Y. P. Nunez, A. V. Carrascosa, R. González, M. C. Polo, y A. J. Martínez-Rodríguez, «Effect of Accelerated Autolysis of Yeast on the Composition and Foaming Properties of Sparkling Wines Elaborated by a Champenoise Method», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, n.º 18, pp. 7232-7237, sep. 2005.

[95] M. V. Moreno-Arribas, Bartolomé B., E. Pueyo, y M. C. Polo, «Isolation and Characterization of Individual Peptides from Wine», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, n.º 9, pp. 3422-3425, sep. 1998.

[96] L. Martínez-Lapuente, Z. Guadalupe, B. Ayestarán, M. Ortega-Heras, y S. Pérez-Magariño, «Changes in Polysaccharide Composition during Sparkling Wine Making and Aging», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, n.º 50, pp. 12362-12373, dic. 2013.

[97] V. Moreno-Arribas, E. Pueyo, F. J. Nieto, P. J. Martín-Álvarez, y M. C. Polo, «Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines», *Food Chem.*, vol. 70, n.º 3, pp. 309-317, ago. 2000.

[98] C. Andrés-Lacueva, R. M. Lamuela-Raventós, S. Buxaderas, y M. del C. de la Torre-Boronat, «Influence of Variety and Aging on Foaming Properties of Cava (Sparkling Wine). 2», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, n.º 7, pp. 2520-2525, jul. 1997.

[99] H. Alexandre y M. Guilloux-Benatier, «Yeast autolysis in sparkling wine – a review», *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 12, n.º 2, pp. 119-127, 2006.

[100] J. Aussenac *et al.*, «Purification method for the isolation of monophosphate nucleotides from Champagne wine and their identification by mass spectrometry», *J. Chromatogr. A*, vol. 907, n.º 1-2, pp. 155-164, ene. 2001.

[101] C. Charpentier, J. Aussenac, M. Charpentier, J.-C. Prome, B. Duteurtre, y M. Feuillat, «Release of Nucleotides and Nucleosides during Yeast Autolysis: Kinetics and Potential Impact on Flavor», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, n.º 8, pp. 3000-3007, abr. 2005.

[102] R. Tudela, M. Riu-Aumatell, M. Castellari, S. Buxaderas, y E. López-Tamames, «Changes in RNA Catabolites of Sparkling Wines During the Biological Aging», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, n.º 25, pp. 6028-6035, jun. 2013.

[103] D. Troton, M. Charpentier, B. Robillard, R. Calvayrac, y B. Duteurtre, «Evolution of the Lipid Contents of Champagne Wine During the Second Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 40, n.º 3, pp. 175-182, ene. 1989.

[104] E. Pueyo, A. Martínez-Rodríguez, M. C. Polo, G. Santa-María, y B. Bartolomé, «Release of Lipids during Yeast Autolysis in a Model Wine System», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, n.º 1, pp. 116-122, ene. 2000.

[105] M. Ángeles Pozo-Bayón, I. Andújar-Ortiz, y M. V. Moreno-Arribas, «Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking», *Food Res. Int.*, vol. 42, n.º 7, pp. 754-761, ago. 2009.

[106] A. Reynolds, *Managing Wine Quality: Oenology and Wine Quality*. Elsevier, 2010.

[107] P. Comuzzo, L. Tat, A. Tonizzo, y F. Battistutta, «Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility», *Food Chem.*, vol. 99, n.º 2, pp. 217-230, 2006.

[108] S. Escot, M. Feuillat, L. Dulau, y C. Charpentier, «Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency», *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 7, n.º 3, pp. 153-159, oct. 2001.

[109] S. Pérez-Magariño, L. Martínez-Lapuente, M. Bueno-Herrera, M. Ortega-Heras, Z. Guadalupe, y B. Ayestarán, «Use of Commercial Dry Yeast Products Rich in Mannoproteins for White and Rosé Sparkling Wine Elaboration», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, n.º 23, pp. 5670-5681, jun. 2015.

[110] A. Caridi, «Enological functions of parietal yeast mannoproteins», *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 89, n.º 3-4, pp. 417-422, may 2006.

[111] M. A. Bustamante, R. Moral, C. Paredes, A. Pérez-Espinosa, J. Moreno-Caselles, y M. D. Pérez-Murcia, «Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry», *Waste Manag.*, vol. 28, n.º 2, pp. 372-380, 2008.

[112] B. Pérez-Bibbins, A. Torrado-Agrasar, J. M. Salgado, R. P. de S. Oliveira, y J. M. Domínguez, «Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview», *Waste Manag.*, vol. 40, pp. 72-81, jun. 2015.

[113] G. Bustos, A. B. Moldes, J. M. Cruz, y J. M. Domínguez, «Formulation of Low-Cost Fermentative Media for Lactic Acid Production with Lactobacillus rhamnosus Using Vinification Lees as Nutrients», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, n.º 4, pp. 801-808, feb. 2004.

[114] R. Devesa-Rey, X. Vecino, J. L. Varela-Alende, M. T. Barral, J. M. Cruz, y A. B. Moldes, «Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling», *Waste Manag.*, vol. 31, n.º 11, pp. 2327-2335, nov. 2011.

[115] M. T. Barcia, P. B. Pertuzatti, V. C. Bochi, I. Hermosín-Gutiérrez, y H. T. Godoy, «Vinification By-products and Their Phenolic Compounds», *Am. J. Food Sci. Technol. Am. J. Food Sci. Technol.*, vol. 3, n.º 4A, pp. 18-23, sep. 2015.

[116] J. M. Luque-Rodríguez, M. D. Luque de Castro, y P. Pérez-Juan, «Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues», *Bioresour. Technol.*, vol. 98, n.º 14, pp. 2705-2713, oct. 2007.

[117] J. A. Pérez-Serradilla, F. Priego-Capote, y M. D. Luque de Castro, «Simultaneous Ultrasound-Assisted Emulsification−Extraction of Polar and Nonpolar Compounds from Solid Plant Samples», *Anal. Chem.*, vol. 79, n.º 17, pp. 6767-6774, sep. 2007.

[118] M. Anastasiadi, H. Pratsinis, D. Kletsas, A.-L. Skaltsounis, y S. A. Haroutounian, «Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts», *Food Res. Int.*, vol. 43, n.º 3, pp. 805-813, abr. 2010.

[119] A. J. Shrikhande, «Wine by-products with health benefits», *Food Res. Int.*, vol. 33, n.º 6, pp. 469-474, jul. 2000.

[120] S. Razmkhab, A. Lopez-Toledano, J. M. Ortega, M. Mayen, J. Merida, y M. Medina, «Adsorption of Phenolic Compounds and Browning Products in White Wines by Yeasts and Their Cell Walls», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, n.º 25, pp. 7432-7437, nov. 2002.

[121] T. Márquez, C. Millán, J.-M. Souquet, y J.-M. Salmon, «Effect of Different Yeast Strains and Their Culture Conditions on the Prevention of Wine Model Solution Browning by Yeast Lees», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, n.º 9, pp. 3771-3779, may 2009.

[122] Á. M. Alonso, D. A. Guillén, C. G. Barroso, B. Puertas, y A. García, «Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and Its Correlation with Polyphenolic Content», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, n.º 21, pp. 5832-5836, sep. 2002.

[123] J. A. Pérez-Serradilla y M. D. Luque de Castro, «Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract», *Food Chem.*, vol. 124, n.º 4, pp. 1652-1659, feb. 2011.

[124] L. A. Santiago y A. Mori, «Antioxidant defenses of baker's yeast against free radicals and lipid peroxides in rat brain», *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 306, n.º 1, pp. 16-21, oct. 1993.

[125] D. J. Jamieson, «Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*», *Yeast Chichester Engl.*, vol. 14, n.º 16, pp. 1511-1527, dic. 1998.

[126] M. T. Elskens, C. J. Jaspers, y M. J. Penninckx, «Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*», *J. Gen. Microbiol.*, vol. 137, n.º 3, pp. 637-644, mar. 1991.

[127] K. Mehdi y M. J. Penninckx, «An important role for glutathione and γ-glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*», *Microbiology*, vol. 143, n.º 6, pp. 1885-1889, 1997.

[128] J. Wünschmann, A. Beck, L. Meyer, T. Letzel, E. Grill, y K. J. Lendzian, «Phytochelatins are synthesized by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*», *FEBS Lett.*, vol. 581, n.º 8, pp. 1681-1687, abr. 2007.

[129] D. Balasundaram, C. W. Tabor, y H. Tabor, «Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, n.º 13, pp. 5872-5876, jul. 1991.

[130] D. H. Hamer, «Metallothionein», *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 55, pp. 913-951, 1986.

[131] E. G. Muller, «A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth», *Mol. Biol. Cell*, vol. 7, n.º 11, pp. 1805-1813, nov. 1996.

[132] J. J. Gallardo Chacón, «Modificacions de les Propietats Fisicoquímiques de les "Lies" de Segona Fermentació durant la Criança del Cava», Tesis doctoral, 2010.

[133] C. Fornairon, J. P. Mazauric, J. M. Salmon, y M. Moutounet, «Observations on the oxygen consumption during maturation of wines on lees», *J. Int. Sci. Vigne Vin*, vol. 33, n.º 2, pp. 79-86, jun. 1999.

[134] J.-M. Salmon, C. Fornairon-Bonnefond, J.-P. Mazauric, y M. Moutounet, «Oxygen consumption by wine lees: impact on lees integrity during wine ageing», *Food Chem.*, vol. 71, n.º 4, pp. 519-528, dic. 2000.

[135] S. C. Jaehrig *et al.*, «Antioxidative activity of (1→3), (1→6)-β-d-glucan from Saccharomyces cerevisiae grown on different media», *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 41, n.º 5, pp. 868-877, jun. 2008.

[136] S. C. Jaehrig, S. Rohn, L. W. Kroh, L.-G. Fleischer, y T. Kurz, «In Vitro Potential Antioxidant Activity of (1→3),(1→6)-β-d-Glucan and Protein Fractions from Saccharomyces cerevisiae Cell Walls», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, n.º 12, pp. 4710-4716, may 2007.

[137] J. Gallardo-Chacón, S. Vichi, E. López-Tamames, y S. Buxaderas, «Analysis of Sparkling Wine Lees Surface Volatiles by Optimized Headspace Solid-Phase Microextraction», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, n.º 8, pp. 3279-3285, mar. 2009.

[138] M. Rizzo, D. Ventrice, M. A. Varone, R. Sidari, y A. Caridi, «HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts», *Sel. Pap. 11th Int. Meet. Recent Dev. Pharm. Anal. 11th Int. Meet. Recent Dev. Pharm. Anal.*, vol. 42, n.º 1, pp. 46-55, sep. 2006.

[139] Organization International de la Vigne et du Vin, «Compendium of international methods of wine and must analysis». 2012.

[140] E. López Tamames, C. de la Torre Boronat, y C. Fernández López, «Características organolépticas de los vinos base destinados a la elaboración del cava en función de tratamientos tecnológicos prefermentativos», Tesis doctoral, 1992.

[141] V. L. Singleton, «Wine Phenols», en *Wine Analysis*, P. D. H.-F. Linskens y P. D. J. F. Jackson, Eds. Springer Berlin Heidelberg, 1988, pp. 173-218.

[142] T. Somers y G. Ziemelis, «Spectral Evaluation of Total Phenolic Components in Vitis-Vinifera - Grapes and Wines», *J. Sci. Food Agric.*, vol. 36, n.º 12, pp. 1275-1284, dic. 1985.

[143] L. G. Butler, M. L. Price, y J. E. Brotherton, «Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 30, n.º 6, pp. 1087-1089, nov. 1982.

[144] B. Sun, J. M. Ricardo-da-Silva, y I. Spranger, «Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, n.º 10, pp. 4267-4274, oct. 1998.

[145] I. F. F. Benzie y J. J. Strain, «The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay», *Anal. Biochem.*, vol. 239, n.º 1, pp. 70-76, jul. 1996.

[146] P. Molyneux, «The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity», *J.Sci.Technol.*, vol. 26, n.º 2, pp. 211-219, 2004.

[147] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, y C. Berset, «Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity», *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 28, n.º 1, pp. 25-30, 1995.

[148] Q. Y. Yin, P. W. J. de Groot, H. L. Dekker, L. de Jong, F. M. Klis, y C. G. de Koster, «Comprehensive proteomic analysis of Saccharomyces cerevisiae cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages», *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n.º 21, pp. 20894-20901, may 2005.

[149] N. Klippel, S. Cui, L. Groebe, y U. Bilitewski, «Deletion of the Candida albicans histidine kinase gene CHK1 improves recognition by phagocytes through an increased exposure of cell wall beta-1,3-glucans», *Microbiol. Read. Engl.*, vol. 156, n.º Pt 11, pp. 3432-3444, nov. 2010.

[150] S. W. Paddock, *Confocal Microscopy*, vol. 122. New Jersey: Humana Press, 1998.

[151] M. Rieseberg, C. Kasper, K. F. Reardon, y T. Scheper, «Flow cytometry in biotechnology», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 56, n.º 3-4, pp. 350-360, ago. 2001.

[152] I. Correa-Gorospe, M. C. Polo, E. Rodríguez-Badiola, y R. Rodríguez-Clemente, «Composition of tartrate precipitates in white wines used for making Spanish sparkling wine», *Food Chem.*, vol. 41, n.º 1, pp. 69-79, 1991.

[153] H. REBELEIN, «REPORT ON PROCEDURES FOR PRECISE ROUTINE DETERMINATION OF TARTARIC-ACID AND LACTIC-ACID IN WINE AND SIMILAR BEVERAGES», *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, vol. 2, n.º 2, pp. 33-38, 1973.

[154] L. Almela, I. Lázaro, J. M. López-Roca, y J. A. Fernández-López, «Tartaric acid in frozen musts and wines. Optimization of Rebelein's method and validation by HPLC», *Food Chem.*, vol. 47, n.º 4, pp. 357-361, 1993.

[155] L. M. L. Nollet, *Food Analysis by HPLC, Second Edition*. CRC Press, 2000.

[156] D. A. Skoog, S. R. Crouch, y F. J. Holler, *Principios de analisis instrumental / Principles of Instrumental Analysis*. Cengage Learning, 2008.

[157] M. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, y F. Smith, «Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances», *Anal. Chem.*, vol. 28, n.º 3, pp. 350-356, mar. 1956.

[158] J. G. Beeley, *Glycoprotein and Proteoglycan Techniques*. Elsevier, 2000.

[159] J. M. Walker, *The Protein Protocols Handbook*. Springer Science & Business Media, 2008.

[160] H. J. Chial, H. B. Thompson, y A. G. Splittgerber, «A Spectral Study of the Charge Forms of Coomassie Blue G», *Anal. Biochem.*, vol. 209, n.º 2, pp. 258-266, mar. 1993.

[161] R. . Lovitt, M. Jones, S. . Collins, G. . Coss, C. . Yau, y C. Attouch, «Disruption of bakers' yeast using a disrupter of simple and novel geometry», *Process Biochem.*, vol. 36, n.º 5, pp. 415-421, dic. 2000.

[162] S. Moore y W. H. Stein, «Photometric Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids», *J. Biol. Chem.*, vol. 176, n.º 1, pp. 367-388, ene. 1948.

[163] D. M. Matthews, G. G. Muir, y D. N. Baron, «Estimation of alpha-amino nitrogen in plasma and urine by the colorimetric ninhydrin reaction», *J. Clin. Pathol.*, vol. 17, n.º 2, pp. 150-153, ene. 1964.

[164] K. Murayama y T. Sugawara, «Resolution of 52 ninhydrin-positive compounds with a high-speed amino acid analyser : Determination of carnosine and homocarnosine in biological materials», *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, vol. 224, n.º 2, pp. 315-321, jul. 1981.

[165] L. Sodek, P. T. D. Vecchia, y M. L. G. P. Lima, «Rapid determination of tryptophan in beans (Phaseolus vulgaris) by the acid ninhydrin method», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 23, n.º 6, pp. 1147-1150, nov. 1975.

[166] C. B. Bottom, S. S. Hanna, y D. J. Siehr, «Mechanism of the ninhydrin reaction», *Biochem. Educ.*, vol. 6, n.º 1, pp. 4-5, ene. 1978.

[167] E. Doi, D. Shibata, y T. Matoba, «Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay», *Anal. Biochem.*, vol. 118, n.º 1, pp. 173-184, nov. 1981.

[168] I. O. C. Egwim y H. J. Gruber, «Spectrophotometric Measurement of Mercaptans with 4,4'-Dithiodipyridine», *Anal. Biochem.*, vol. 288, n.º 2, pp. 188-194, ene. 2001.

[169] F. Tietze, «Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues», *Anal. Biochem.*, vol. 27, n.º 3, pp. 502-522, mar. 1969.

[170] A. Serpen, E. Capuano, V. Fogliano, y V. Gökmen, «A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, n.º 19, pp. 7676-7681, sep. 2007.

[171] M. Ángeles Pozo-Bayón, M. T. Hernández, P. J. Martín-Álvarez, y M. C. Polo, «Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, n.º 7, pp. 2089-2095, 2003.

[172] Á. F. Recamales, A. Sayago, M. L. González-Miret, y D. Hernanz, «The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine», *Food Res. Int.*, vol. 39, n.º 2, pp. 220-229, mar. 2006.

[173] H. Abramovič, T. Košmerl, N. Poklar Ulrih, y B. Cigić, «Contribution of SO_2 to antioxidant potential of white wine», *Food Chem.*, vol. 174, pp. 147-153, may 2015.

[174] C. D. D. Mattia, A. Piva, M. Martuscelli, D. Mastrocola, y G. Sacchetti, «Effect of sulfites on the in vitro antioxidant activity of wines», *Ital. J. Food Sci.*, vol. 27, n.º 4, pp. 505-512, dic. 2015.

[175] C. S. Ough, «Some Effects of Temperature and SO_2 on Wine During Simulated Transport or Storage», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 36, n.º 1, pp. 18-22, ene. 1985.

[176] N. Paixão, R. Perestrelo, J. C. Marques, y J. S. Câmara, «Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines», *Food Chem.*, vol. 105, n.º 1, pp. 204-214, 2007.

[177] D. P. Makris, E. Psarra, S. Kallithraka, y P. Kefalas, «The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines», *Food Res. Int.*, vol. 36, n.º 8, pp. 805-814, 2003.

[178] M. Díaz, M. Herrero, L. A. García, y C. Quirós, «Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses», *Biochem. Eng. J.*, vol. 48, n.º 3, pp. 385-407, feb. 2010.

[179] J. Comas-Riu y N. Rius, «Flow cytometry applications in the food industry», *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 36, n.º 8, pp. 999-1011, jun. 2009.

[180] R. Pradelles, S. Vichi, H. Alexandre, y D. Chassagne, «Influence of the drying processes of yeasts on their volatile phenol sorption capacity in model wine», *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 135, n.º 2, pp. 152-157, oct. 2009.

[181] «Nucleic Acid Detection and Analysis—Chapter 8», en *The Molecular Probes Handbook*, 2010.ª ed., ThermoFisher SCIENTIFIC.

[182] R. W. Sabnis, «Propidium iodide (PI)», en *Handbook of Fluorescent Dyes and Probes*, John Wiley & Sons, Inc, 2015, pp. 328-333.

[183] M. R. Melamed, T. Lindmo, y M. L. Mendelsohn, *Flow Cytometry and Sorting*. Wiley, 1990.

[184] J. P. Greer, *Wintrobe's Clinical Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

[185] H. Okada, K. Kono, A. M. Neiman, y Y. Ohya, «Examination and Disruption of the Yeast Cell Wall», *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2016, n.º 8, p. pdb.top078659, ene. 2016.

[186] A. Balcerczyk *et al.*, «Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity», *BioFactors*, vol. 17, n.º 1-4, pp. 75–82, 2003.

[187] F. J. D. Carlo y J. V. Fiore, «On the Composition of Zymosan», *Science*, vol. 127, n.º 3301, pp. 756-757, abr. 1958.

[188] S. Vichi, J. J. Gallardo-Chacón, R. Pradelles, D. Chassagne, E. López-Tamames, y S. Buxaderas, «Surface properties of *Saccharomyces cerevisiae* lees during sparkling wine ageing and their effect on flocculation», *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 140, n.º 2–3, pp. 125-130, jun. 2010.

[189] A. Galano, «A first principles investigation on the electron donor ability of synthetic melatonin derivatives: implications for their antioxidant activity», *Theor. Chem. Acc.*, vol. 135, n.º 6, p. 157, jun. 2016.

[190] A. J. Barrett, N. D. Rawlings, y J. F. Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, 2012.

[191] F. S. Markland Jr. y E. L. Smith, «16 Subtilisins: Primary Structure, Chemical and Physical Properties», en *The Enzymes*, vol. 3, P. D. Boyer, Ed. Academic Press, 1971, pp. 561-608.

[192] T. Maruyama, M. Nakajima, H. Kondo, K. Kawasaki, M. Seki, y M. Goto, «Can lipases hydrolyze a peptide bond?», *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 32, n.º 6, pp. 655-657, may 2003.

[193] M. Friedman, «Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, n.º 3, pp. 385-406, feb. 2004.

[194] I. M. Torchinskiĭ y D. E. Metzler, *Sulphur in proteins*. Oxford ; New York: Pergamon Press, 1981.

[195] C.-Y. Tai y C.-T. Ho, «Influence of Cysteine Oxidation on Thermal Formation of Maillard Aromas», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, n.º 9, pp. 3586-3589, sep. 1997.

[196] C.-Y. Tai y C.-T. Ho, «Influence of Glutathione Oxidation and pH on Thermal Formation of Maillard-Type Volatile Compounds», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, n.º 6, pp. 2260-2265, jun. 1998.

[197] D. B. Volkin y A. M. Klibanov, «Thermal destruction processes in proteins involving cystine residues.», *J. Biol. Chem.*, vol. 262, n.º 7, pp. 2945-2950, may 1987.

[198] P. Relkin, B. Launay, y L. Eynard, «Effect of Sodium and Calcium Addition on Thermal Denaturation of Apo-α-Lactalbumin: a Differential Scanning Calorimetric Study», *J. Dairy Sci.*, vol. 76, n.º 1, pp. 36-47, ene. 1993.

[199] G. Kogan *et al.*, «Antioxidant properties of yeast (1→3)-β-d-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis», *Carbohydr. Polym.*, vol. 61, n.º 1, pp. 18-28, jul. 2005.

[200] N. Lei *et al.*, «Effects of Low Molecular Weight Yeast β-Glucan on Antioxidant and Immunological Activities in Mice», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, n.º 9, pp. 21575-21590, sep. 2015.

[201] M. Memarpoor-Yazdi, H. Mahaki, y H. Zare-Zardini, «Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from Zizyphus jujuba fruits», *J. Funct. Foods*, vol. 5, n.º 1, pp. 62-70, ene. 2013.

[202] Y. Xia, F. Bamdad, M. Gänzle, y L. Chen, «Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis», *Food Chem.*, vol. 134, n.º 3, pp. 1509-1518, oct. 2012.

[203] C. Nimalaratne, D. Lopes-Lutz, A. Schieber, y J. Wu, «Free aromatic amino acids in egg yolk show antioxidant properties», *Food Chem.*, vol. 129, n.º 1, pp. 155-161, nov. 2011.

[204] Z. Xu, M. Tang, Y. Li, F. Liu, X. Li, y R. Dai, «Antioxidant properties of Du-zhong (Eucommia ulmoides Oliv.) extracts and their effects on color stability and lipid oxidation of raw pork patties», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, n.º 12, pp. 7289-7296, jun. 2010.

[205] M. Mirzaei, S. Mirdamadi, M. R. Ehsani, M. Aminlari, y E. Hosseini, «Purification and identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptide from Saccharomyces cerevisiae protein hydrolysate», *J. Funct. Foods*, vol. 19, Part A, pp. 259-268, dic. 2015.

[206] E. Y. Jung, H.-S. Lee, J. W. Choi, K. S. Ra, M.-R. Kim, y H. J. Suh, «Glucose Tolerance and Antioxidant Activity of Spent Brewer's Yeast Hydrolysate with a High Content of Cyclo-His-Pro (CHP)», *J. Food Sci.*, vol. 76, n.º 2, pp. C272-C278, mar. 2011.

[207] B. H. Sarmadi y A. Ismail, «Antioxidative peptides from food proteins: A review», *Peptides*, vol. 31, n.º 10, pp. 1949-1956, oct. 2010.

[208] R. J. Elias, S. S. Kellerby, y E. A. Decker, «Antioxidant Activity of Proteins and Peptides», *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 48, n.º 5, pp. 430-441, 2008.

[209] K. M. Honório y A. B. F. Da Silva, «An AM1 study on the electron-donating and electron-accepting character of biomolecules», *Int. J. Quantum Chem.*, vol. 95, n.º 2, pp. 126-132, ene. 2003.

[210] M. Cordes, *How Do Amino Acids Transport Electrons Through Peptides?* Cuvillier Verlag, 2008.

[211] A. G. P. Samaranayaka y E. C. Y. Li-Chan, «Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications», *J. Funct. Foods*, vol. 3, n.º 4, pp. 229-254, oct. 2011.

[212] A. Shah *et al.*, «Electron transfer in peptides», *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, n.º 4, pp. 1015-1027, feb. 2015.

[213] O. Folin y V. Ciocalteu, «On tyrosine and tryptophane determinations in proteins», *J. Biol. Chem.*, vol. 73, n.º 2, pp. 627-650, 1927.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I. RESULTADOS ANALÍTICOS

AI.1 Polifenoles totales de los vinos espumosos en envejecimiento *sur lie*

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	171,90	22,90	178,37	22,74	171,04	21,42	178,76	24,98
	1	160,10	11,81	162,88	16,71	171,69	18,91	151,14	13,83
	3	152,75	9,22	157,85	17,08	162,63	16,23	166,14	19,40
	6	150,10	21,63	160,00	17,54	164,40	21,89	158,52	17,47
	9	156,67	13,67	159,05	18,65	167,94	23,57	152,82	30,70
	13	140,59	18,07	159,59	17,89	157,43	17,65	165,11	21,73
	17	160,82	29,51	159,24	16,59	162,86	17,43	160,51	19,98
	21	160,38	20,15	163,34	19,58	166,53	20,78	144,39	7,18
	30	163,66	15,99	157,88	18,62	168,61	21,47	167,54	25,38
Charmat	0	208,73	32,05	190,28	6,96	192,85	4,06	194,65	2,22
	1	178,01	13,15	161,74	8,77	176,87	11,62	175,53	9,56
	3	167,45	32,13	171,82	13,76	180,38	14,92	177,72	1,19
	6	179,53	9,75	185,52	9,01	183,24	2,65	181,34	5,83
	9	186,28	13,71	186,00	6,58	178,29	10,42	168,40	1,67
	13	188,85	10,56	173,63	8,62	179,53	3,31	175,34	10,70
	17	176,77	19,28	187,71	5,57	182,95	5,28	183,14	12,14

Unidades: mg GAE/L. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.2 Hidroxicinamatos totales de los vinos espumosos en envejecimiento *sur lie*

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	21,46	1,56	23,05	0,44	21,68	0,37	20,98	0,25
	1	21,99	1,06	20,98	1,00	19,61	0,06	20,53	0,50
	3	23,13	0,93	23,27	0,25	21,50	0,00	20,31	1,43
	6	22,47	1,74	21,77	2,12	23,05	0,69	22,12	0,50
	9	23,84	0,06	23,40	0,31	22,87	2,06	22,47	0,62
	13	23,35	0,25	24,28	0,19	22,56	1,74	21,02	0,31
	17	24,02	1,93	25,03	0,00	22,47	1,37	23,22	0,06
	21	24,76	0,37	24,54	0,19	23,49	0,06	18,95	5,23
	30	24,24	1,99	24,81	1,56	23,18	1,74	24,19	0,19
Charmat	0	21,77	5,48	20,31	0,93	21,72	4,17	20,58	1,81
	1	21,50	3,49	22,61	1,68	21,64	2,18	22,87	3,80
	3	21,77	0,37	23,44	2,49	21,68	0,62	21,77	0,75
	6	22,47	2,99	22,08	0,69	22,61	3,55	23,57	2,55
	9	24,81	1,93	23,40	2,31	20,93	1,18	22,34	6,04
	13	24,02	1,93	24,41	1,50	21,90	3,55	24,28	2,06
	17	23,05	0,44	22,78	1,31	24,72	2,31	23,66	1,06

Unidades: mg ácido cafeico/L. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.3 Flavanoles totales de los vinos espumosos en envejecimiento *sur lie*

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	11,51	1,84	9,12	1,55	9,54	0,95	13,88	2,36
	1	18,89	1,51	17,17	1,37	11,39	1,14	15,96	2,71
	3	15,39	0,31	15,43	1,08	19,15	1,92	15,49	2,63
	6	12,04	2,41	17,70	4,42	15,87	1,43	16,92	1,18
	9	15,82	0,79	17,01	1,19	16,79	1,51	16,31	0,33
	13	17,32	3,46	12,77	2,17	19,00	1,90	22,24	0,89
	17	20,23	1,62	23,76	3,56	20,64	1,86	12,28	2,33
	21	18,89	0,94	20,09	1,00	20,88	2,13	18,92	1,32
	30	22,52	1,58	25,93	3,11	24,47	2,52	16,43	2,79
Charmat	0	14,34	1,15	12,35	1,73	18,80	1,90	13,95	2,37
	1	15,13	1,06	15,83	1,58	19,61	1,76	16,67	2,33
	3	14,00	1,40	16,57	1,66	20,60	1,98	14,90	2,53
	6	16,22	0,32	15,18	1,06	17,23	1,69	13,89	2,36
	9	14,52	1,45	17,01	0,85	18,47	2,03	15,08	2,56
	13	16,64	1,33	17,35	0,17	19,06	1,53	20,58	1,23
	17	19,03	0,19	18,43	0,74	19,09	1,72	16,99	1,87

Unidades: mg catequina/L. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.4 Actividad antioxidante medida con el método FRAP de los vinos espumosos *sur lie*

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	627,06	5,06	599,35	6,23	616,86	7,97	608,91	7,75
	1	593,15	2,75	619,56	2,38	592,55	8,14	536,41	8,08
	3	638,47	6,80	583,24	5,70	608,16	6,44	623,01	8,33
	6	576,34	7,25	586,09	4,94	605,00	40,41	590,75	10,76
	9	557,43	40,08	638,17	2,60	585,19	13,73	614,46	5,12
	13	609,21	2,06	647,78	8,11	559,38	3,06	577,54	6,44
	17	648,38	13,27	611,16	6,99	595,85	3,83	632,92	8,65
	21	587,14	6,80	671,34	30,97	624,52	2,51	561,48	58,62
	30	596,60	7,81	582,19	18,03	602,75	2,56	623,31	12,03
Charmat	0	780,35	13,58	860,61	13,13	835,72	21,43	741,22	7,27
	1	722,46	16,81	821,65	5,49	776,02	22,94	757,81	15,34
	3	722,10	9,93	849,43	21,17	769,17	24,10	731,48	16,59
	6	793,88	30,38	892,71	23,40	780,89	6,27	742,48	2,44
	9	765,20	22,24	972,79	6,89	800,55	29,28	680,80	24,01
	13	800,19	31,30	872,15	11,43	796,04	6,15	754,02	3,01
	17	777,83	25,91	897,40	13,56	807,95	6,76	752,94	17,59

Unidades: µM TEQ. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.5 Actividad antioxidante medida con el método DPPH de los vinos espumosos *sur lie*

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	197,60	0,38	185,00	16,18	167,84	16,91	176,07	14,13
	1	177,71	7,43	177,99	10,23	168,66	18,61	162,40	11,66
	3	177,00	7,76	163,28	14,96	170,46	16,90	169,05	18,33
	6	180,59	3,52	170,26	13,64	169,91	20,46	165,36	18,08
	9	190,30	2,68	171,61	21,78	164,73	19,12	169,63	11,31
	13	180,00	9,24	194,26	12,04	169,65	16,20	169,55	18,18
	17	191,89	7,06	175,02	9,86	175,23	22,86	163,39	20,02
	21	192,65	11,95	143,02	26,89	167,39	25,42	165,38	18,23
	30	181,02	7,40	185,77	9,15	182,88	19,23	172,20	23,00
Charmat	0	186,15	0,22	195,13	9,62	227,23	0,21	224,61	6,21
	1	181,24	7,27	170,57	2,41	207,09	2,81	213,78	4,61
	3	187,77	5,17	209,02	12,61	213,79	11,25	211,68	3,23
	6	179,42	1,61	224,75	7,66	221,35	4,09	216,48	0,62
	9	214,55	4,82	230,57	4,59	222,22	1,25	201,36	11,12
	13	173,61	5,74	207,61	14,01	217,51	2,24	217,12	11,43
	17	168,80	1,93	222,57	9,90	211,39	10,45	216,36	7,71

Unidades: µM TEQ. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.6 Contenido en SO_2 total de los vinos espumosos en envejecimiento *sur lie*

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	81,0	1,8	78,2	4,5	70,0	2,4	60,2	2,1
	1	76,5	2,9	72,4	3,2	60,5	0,9	56,1	0,8
	3	69,5	5,5	65,5	1,4	56,7	2,9	54,2	4,1
	6	71,4	6,7	70,0	5,5	53,5	1,3	51,0	3,6
	9	70,1	0,9	67,1	2,7	50,9	1,9	48,1	0,9
	13	66,9	2,6	63,2	0,6	49,3	2,8	45,2	1,8
	17	55,2	1,8	70,6	2,6	48,0	0,6	44,5	2,4
	21	66,9	2,9	61,1	3,6	47,1	0,2	42,6	1,3
	30	63,7	1,8	61,4	0,1	41,3	2,0	40,2	1,7
Charmat	0	72,8	0,7	77,2	2,1	53,5	5,4	59,9	3,0
	1	67,3	3,2	74,9	4,8	50,7	0,5	54,4	1,2
	3	66,4	1,8	72,6	2,9	51,2	0,9	55,8	1,2
	6	67,2	0,9	71,8	1,6	50,1	1,4	52,4	0,3
	9	66,7	5,0	71,6	3,2	47,0	0,7	53,9	0,7
	13	66,2	1,3	69,8	2,1	48,5	4,1	54,1	1,1
	17	60,3	1,1	64,9	0,6	45,9	0,5	52,8	1,6

Unidades: mg/L. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.7 Polifenoles totales de los vinos espumosos en envejecimiento comercial (sin lías)

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	197,65	12,35	190,74	11,05	189,09	11,69	193,77	8,49
	4	183,83	23,37	141,65	6,61	171,62	15,34	163,06	6,91
	8	185,43	8,56	163,69	11,09	174,42	11,91	177,27	4,64
	12	189,77	21,27	175,39	17,05	186,75	17,75	171,79	9,07
	21	195,48	28,80	194,39	10,99	169,39	10,86	176,59	12,90
cava	0	198,96	18,24	190,63	7,32	195,82	5,08	188,74	6,87
reserva	4	207,86	4,31	195,08	6,46	185,60	11,12	192,51	18,58
	12	193,08	6,14	160,49	9,17	180,98	6,39	183,04	8,65
	30	204,27	11,41	190,74	6,20	182,35	17,25	186,86	11,67
Charmat	0	191,43	33,56	188,91	13,28	163,06	12,34	151,93	16,89
	4	165,40	18,44	190,46	17,21	165,40	14,08	172,36	11,62
	8	171,96	19,58	175,56	22,04	167,74	19,07	169,57	16,78
	12	168,65	19,55	172,82	16,33	165,63	21,52	162,15	18,15
	21	175,44	22,31	176,19	15,24	161,57	10,54	164,26	12,25

Unidades: mg GAE/L. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.8 Hidroxicinamatos totales de los vinos espumosos en envejecimiento comercial (sin lías)

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	23,15	0,49	23,40	0,28	21,85	0,92	23,20	1,98
	4	24,05	2,62	18,90	3,39	21,00	0,28	20,55	1,34
	8	24,45	2,62	21,90	0,90	22,85	1,77	24,25	2,05
	12	24,90	3,54	24,25	1,20	23,55	0,64	15,80	9,76
	21	25,15	4,17	25,70	0,14	23,85	1,06	25,55	2,76
cava	0	24,00	0,14	23,40	0,42	23,70	1,98	23,60	1,41
reserva	4	25,05	0,78	25,15	2,19	24,45	1,77	25,15	0,35
	12	27,40	0,28	21,95	1,34	24,80	1,98	24,15	1,06
	30	27,20	1,56	28,35	0,35	26,70	2,26	25,75	0,78
Charmat	0	18,40	1,20	19,20	0,80	17,10	1,10	17,40	0,62
	4	17,83	1,55	18,23	1,69	18,33	1,38	18,00	1,51
	8	19,03	0,76	20,10	1,21	18,93	1,29	18,87	1,15
	12	18,53	2,65	19,77	0,97	18,47	2,58	17,10	1,67
	21	20,60	0,35	19,80	2,48	18,90	0,69	18,97	1,20

Unidades: mg ácido cafeico/L. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI. 9 Flavanoles totales de los vinos espumosos en envejecimiento comercial (sin lías)

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	10,08	0,54	8,16	1,53	10,41	0,34	15,40	0,75
	4	9,48	0,30	9,60	0,55	7,90	0,76	9,20	0,81
	8	12,12	0,60	9,48	0,80	12,50	0,71	12,90	0,97
	12	10,44	1,27	9,24	0,81	7,30	1,01	9,70	1,40
	21	11,16	0,81	12,36	1,66	14,40	0,32	9,60	0,68
cava reserva	0	15,50	2,27	12,10	0,71	9,80	0,94	11,30	0,57
	4	13,30	1,71	13,90	0,32	9,08	0,60	8,00	0,85
	12	12,40	0,25	10,70	0,31	9,00	0,88	9,30	0,79
	30	15,60	0,63	18,70	2,14	6,80	1,57	8,50	1,06
Charmat	0	11,70	2,04	11,80	1,57	7,23	0,51	9,80	0,44
	4	12,00	0,71	12,30	0,55	10,80	0,24	11,20	1,35
	8	14,10	1,06	12,40	0,82	8,20	0,64	11,20	0,30
	12	13,40	0,33	14,40	0,83	9,62	1,19	11,40	0,91
	21	14,60	0,73	14,20	0,99	11,20	0,28	12,80	0,68

Unidades: mg catequina/L. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.10 Actividad antioxidante medida con el método FRAP de los vinos espumosos en envejecimiento comercial (sin lías)

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	1031,7	47,7	1110,3	153,4	968,7	34,0	1087,0	84,0
	4	696,0	41,9	781,0	47,1	934,3	22,0	903,0	8,7
	8	930,3	36,5	1010,3	4,2	893,7	25,1	1015,7	37,3
	12	926,3	12,6	1052,0	20,5	926,7	6,8	973,0	49,4
	21	956,7	48,2	993,0	74,5	967,0	46,3	975,0	19,7
cava	0	971,0	31,4	1025,7	86,9	1142,0	85,3	1210,0	25,2
reserva	4	947,3	24,9	888,7	22,7	930,7	44,3	1104,3	41,3
	12	813,3	8,1	782,0	87,7	974,7	27,8	1034,0	14,5
	30	766,7	24,6	776,7	13,3	841,0	91,0	865,7	43,9
Charmat	0	902,3	15,3	1040,0	14,4	877,0	10,6	876,3	6,7
	4	761,0	12,5	840,7	5,9	764,7	16,6	814,7	13,6
	8	818,0	26,0	757,3	22,5	715,7	7,4	714,3	42,5
	12	823,3	16,3	835,0	16,5	765,7	0,6	727,7	7,1
	21	747,7	11,0	772,3	12,2	745,3	1,5	642,3	1,2

Unidades: µM TEQ. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.11 Actividad antioxidante medida con el método DPPH de los vinos espumosos en envejecimiento comercial (sin lías)

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	257,5	17,7	238,1	31,1	224,6	2,7	249,3	6,6
	4	220,1	1,6	218,1	3,0	209,8	1,9	208,2	2,4
	8	232,0	1,1	189,2	6,5	207,6	2,7	224,4	0,8
	12	207,0	2,8	217,3	0,6	206,9	5,4	217,5	6,0
	21	209,8	4,8	223,2	3,6	213,2	1,3	190,2	0,8
cava	0	251,0	25,3	231,0	28,4	229,4	15,8	241,3	9,4
reserva	4	212,5	11,2	187,8	15,3	212,9	16,7	214,2	6,3
	12	212,9	17,8	158,0	12,2	208,7	16,8	218,6	12,8
	30	178,3	11,0	166,8	0,6	193,1	10,5	201,4	2,0
Charmat	0	225,5	7,8	235,3	11,7	205,8	17,1	195,1	11,4
	4	184,6	3,3	211,4	3,0	182,0	15,6	182,2	0,6
	8	208,3	0,1	207,7	0,3	172,9	8,3	186,5	6,6
	12	196,4	11,2	213,1	5,9	170,2	11,2	166,3	34,2
	21	204,4	8,5	208,9	3,6	161,0	10,3	174,1	12,2

Unidades: µM TEQ. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.12 Contenido en SO_2 libre de los vinos espumosos en envejecimiento comercial (sin lías)

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	16	2	20	1	16	2	19	2
	4	9	1	13	1	8	1	12	1
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-
cava reserva	0	19	2	17	0	14	1	16	1
	4	9	0	6	0	8	0	10	0
	12	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	-	-
Charmat	0	15	1	21	1	19	2	24	2
	4	6	0	9	0	6	0	9	0
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-

Unidades: mg/L. El guión indica que el valor está por debajo del límite de cuantificación (6 mg/L). D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.13 Contenido en SO_2 total de los vinos espumosos en envejecimiento comercial (sin lías)

		Cupaje A				Cupaje B			
		Botella 1		Botella 2		Botella 1		Botella 2	
Tipo	Tiempo	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
cava	0	132	2	125	5	105	2	100	9
	4	125	5	121	2	81	9	87	8
	8	110	6	116	8	84	2	80	5
	12	106	6	110	8	86	1	78	2
	21	103	1	105	9	86	8	80	4
cava reserva	0	130	3	118	5	106	5	100	3
	4	115	7	108	7	97	1	102	7
	12	97	5	104	7	82	4	90	4
	30	100	1	96	7	84	2	90	2
Charmat	0	130	7	124	3	120	6	113	1
	4	117	1	114	1	97	3	90	1
	8	112	4	104	4	94	4	87	9
	12	108	6	100	5	91	9	83	3
	21	103	3	100	7	89	9	82	5

Unidades: mg/L. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.14 Contenido en ácido caftárico, ácido cafeico y ácido 2-S glutationil caftárico de los vinos espumosos medidos por HPLC

		Ácido caftárico				Ácido cafeico				Ácido 2-S-glutationil caftárico			
		Cupaje A		Cupaje B		Cupaje A		Cupaje B		Cupaje A		Cupaje B	
Tipo	Tiempo	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2
cava *sur lie*	9	5,68	6,04	5,05	5,38	4,46	5,35	4,02	4,76	1,33	1,41	1,30	1,32
	13	5,03	6,17	4,41	4,61	4,20	5,08	4,12	4,22	1,43	1,46	1,35	1,28
	17	5,43	5,59	4,35	4,55	4,79	4,91	4,55	4,62	1,39	1,53	1,51	1,38
	21	5,59	5,49	4,73	4,51	5,05	4,93	4,87	4,57	1,45	1,39	1,52	1,43
	30	5,34	5,34	4,65	4,53	5,10	5,10	4,98	4,54	1,47	1,47	1,62	1,53
cava comercial	0	4,55	5,41	4,23	5,23	0,65	0,79	0,54	0,64	1,86	2,06	12,18	25,01
	4	5,16	4,64	4,35	4,19	0,81	0,69	0,58	0,49	1,90	1,78	10,51	10,71
	8	5,06	4,51	4,98	4,43	0,86	0,78	0,86	0,76	1,63	1,69	6,49	13,42
	12	4,57	4,40	3,86	4,17	0,83	0,79	0,71	0,72	1,69	1,82	8,69	9,94
	21	4,12	4,62	4,13	3,57	0,84	0,97	0,84	0,68	1,62	1,86	5,37	7,92
cava reserva comercial	0	5,28	5,09	3,90	4,00	0,88	0,86	0,74	0,77	9,18	7,80	10,92	10,90
	4	4,88	5,01	3,87	3,96	0,81	0,85	0,73	0,80	8,02	7,54	9,53	9,52
	12	4,58	4,40	3,76	3,80	0,99	0,94	0,84	0,87	5,92	5,50	8,74	8,64
	30	4,14	4,17	3,32	3,38	1,09	1,01	0,86	0,89	4,76	5,66	5,45	7,20
Charmat comercial	0	3,80	3,83	3,96	4,11	0,47	0,49	0,38	0,45	2,11	2,38	2,85	3,19
	4	3,61	3,70	4,39	4,17	0,46	0,50	0,56	0,51	1,74	2,55	3,19	2,91
	8	3,71	3,63	4,10	3,92	0,55	0,58	0,60	0,55	1,86	1,88	2,34	2,46
	12	3,59	3,91	3,84	3,63	0,57	0,65	0,60	0,59	1,84	2,02	2,06	2,01
	21	3,50	3,38	3,78	3,82	0,67	0,67	0,73	0,74	1,73	1,54	1,97	1,80

Unidades: mg/L; B.1=botella 1; B.2= botella 2.

AI.15 Contenido en ácido fertárico y ácido *p*-coumárico de los vinos espumosos medidos por HPLC

		Ácido fertárico				Ácido *p*-coumárico			
		Cupaje A		Cupaje B		Cupaje A		Cupaje B	
Tipo	Tiempo	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2
cava *sur lie*	9	2,72	2,63	3,39	3,37	0,95	0,86	0,24	0,32
	13	2,23	2,30	2,76	3,00	0,97	0,72	0,17	0,31
	17	2,55	2,21	2,85	3,16	1,21	0,97	0,28	0,33
	21	2,30	2,29	3,84	2,82	1,06	0,92	0,46	0,37
	30	2,04	2,04	3,37	3,46	1,46	1,46	0,65	0,55
cava comercial	0	0,93	1,01	1,18	1,26	0,49	0,58	0,36	0,36
	4	0,98	0,89	1,13	1,08	0,60	0,59	0,41	0,38
	8	1,01	0,87	0,96	1,30	0,73	0,68	0,71	0,51
	12	0,91	0,87	1,18	1,28	0,70	0,65	0,55	0,61
	21	0,84	0,87	0,84	1,13	0,77	0,85	0,77	0,65
cava reserva comercial	0	1,00	0,99	1,19	1,23	0,67	0,64	0,43	0,48
	4	0,97	0,90	1,23	1,26	0,66	0,60	0,49	0,53
	12	0,94	0,79	1,22	1,24	0,80	0,69	0,64	0,69
	30	0,87	0,86	1,20	1,12	0,93	0,96	0,66	0,87
Charmat comercial	0	0,82	0,82	1,09	1,15	0,46	0,43	0,29	0,35
	4	0,78	0,81	1,31	1,26	0,40	0,44	0,46	0,45
	8	0,82	0,82	1,30	1,21	0,55	0,56	0,58	0,55
	12	0,80	0,84	1,23	1,18	0,58	0,63	0,61	0,57
	21	0,79	0,79	1,25	1,26	0,65	0,66	0,74	0,80

Unidades: mg/L; B.1=botella 1; B.2= botella 2.

AI.16 Contenido en ácido cis-coutárico y ácido trans-coutárico de los vinos espumosos medidos por HPLC

		Ácido cis-coutárico				Ácido trans-coutárico			
		Cupaje A		Cupaje B		Cupaje A		Cupaje B	
Tipo	Tiempo	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2
cava sur lie	9	2,55	3,11	3,24	4,05	1,38	1,55	1,10	1,52
	13	2,03	2,69	3,12	3,39	2,17	1,49	1,99	1,21
	17	2,02	2,16	2,92	3,52	1,94	2,04	1,98	2,01
	21	2,16	1,98	3,25	2,85	1,99	2,13	2,00	2,25
	30	1,85	1,85	3,24	2,88	2,61	2,35	2,17	2,49
cava comercial	0	0,93	1,06	2,07	2,19	1,20	1,41	1,04	1,19
	4	0,95	0,85	1,75	1,45	1,50	1,38	1,20	1,13
	8	0,84	0,71	1,25	1,61	1,83	1,63	1,75	1,50
	12	0,74	0,75	1,40	1,48	1,71	1,63	1,61	1,66
	21	0,63	0,69	0,94	1,16	1,82	1,93	1,79	1,72
cava reserva comercial	0	1,55	1,51	1,78	1,87	1,48	1,46	1,12	1,16
	4	1,37	1,39	1,70	1,71	1,48	1,52	1,24	1,28
	12	1,14	0,97	1,41	1,45	1,75	1,61	1,61	1,63
	30	0,94	0,88	0,82	1,02	1,85	1,96	1,91	2,00
Charmat comercial	0	0,85	0,85	1,08	1,13	1,07	1,10	0,85	1,18
	4	0,60	0,76	1,12	1,08	0,99	1,16	1,43	1,37
	8	0,58	0,65	0,94	0,93	1,41	1,39	1,66	1,64
	12	0,61	0,67	0,83	0,85	1,43	1,57	1,78	1,68
	21	0,55	0,54	0,71	0,84	1,60	1,62	2,11	2,06

Unidades: mg/L; B.1=botella 1; B.2= botella 2.

AI.17 Contenido en ácido gálico y ácido protocatéquico de los vinos espumosos medidos por HPLC

		Ácido gálico				Ácido protocatéquico			
		Cupaje A		Cupaje B		Cupaje A		Cupaje B	
Tipo	Tiempo	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2
cava *sur lie*	9	4,86	17,95	7,27	2,53	16,12	16,43	15,63	16,38
	13	7,21	5,41	7,76	2,94	16,15	16,13	16,21	16,67
	17	0,21	6,10	4,10	3,31	16,54	16,67	16,61	17,17
	21	20,24	20,29	9,65	8,95	16,70	16,92	18,90	17,47
	30	22,81	22,88	6,79	4,10	17,22	18,25	19,13	18,50
cava comercial	0	0,92	0,86	1,01	1,10	4,29	4,78	1,47	1,55
	4	0,95	0,86	0,99	0,91	5,00	4,52	1,29	1,49
	8	0,84	0,79	0,89	0,98	5,47	4,97	1,05	1,72
	12	0,82	0,78	1,03	0,99	5,05	5,03	1,35	1,71
	21	0,85	0,85	0,82	0,95	5,29	5,92	1,01	1,60
cava reserva comercial	0	0,85	0,77	0,99	0,98	1,38	1,37	1,68	1,68
	4	0,85	0,77	1,00	0,90	1,31	1,35	1,66	1,69
	12	0,80	0,77	0,93	0,94	1,29	1,26	1,70	1,69
	30	0,76	0,73	0,82	0,86	1,27	1,27	1,65	1,64
Charmat comercial	0	0,59	0,65	0,65	0,67	3,92	4,02	1,11	1,22
	4	0,60	0,64	0,71	0,67	3,68	4,18	1,27	1,22
	8	0,64	0,62	0,68	0,66	5,09	5,14	1,27	1,22
	12	0,65	0,63	0,67	0,71	5,24	5,66	1,22	1,27
	21	0,63	0,59	0,69	0,71	5,99	5,79	1,26	1,35

Unidades: mg/L; B.1=botella 1; B.2= botella 2.

AI.18 Contenido en tirosol y catequina de los vinos espumosos medidos por HPLC

		Tirosol				Catequina			
		Cupaje A		Cupaje B		Cupaje A		Cupaje B	
Tipo	Tiempo	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2	B. 1	B. 2
cava *sur lie*	9	16,69	17,97	16,04	14,70	6,90	7,07	7,35	8,15
	13	14,47	16,57	16,51	16,21	6,84	6,95	7,74	8,19
	17	15,02	17,61	17,15	17,19	6,94	6,95	7,96	8,10
	21	18,39	19,12	19,80	17,93	6,89	6,83	8,37	7,55
	30	20,29	21,52	21,54	20,36	7,13	7,51	8,75	7,92
cava comercial	0	11,59	11,77	3,71	3,99	0,39	0,48	0,48	0,47
	4	12,38	10,92	3,62	3,54	0,48	0,41	0,42	0,42
	8	12,75	11,18	3,43	4,01	0,46	0,46	0,42	0,47
	12	11,85	11,14	4,37	4,01	0,41	0,38	0,55	0,48
	21	11,50	13,55	3,62	3,69	0,44	0,44	0,34	0,40
cava reserva comercial	0	4,05	4,24	7,42	7,43	0,43	0,44	0,46	0,48
	4	3,91	4,08	7,34	7,46	0,40	0,41	0,48	0,50
	12	4,23	3,93	7,50	7,46	0,42	0,39	0,46	0,46
	30	4,02	4,39	7,25	7,24	0,41	0,40	0,37	0,42
Charmat comercial	0	3,24	3,85	13,03	13,47	0,53	0,54	0,47	0,51
	4	2,76	3,89	14,45	14,28	0,42	0,43	0,45	0,49
	8	3,33	3,52	13,94	13,15	0,46	0,47	0,49	0,43
	12	4,00	3,97	12,73	12,69	0,42	0,48	0,46	0,42
	21	3,26	3,03	13,50	14,42	0,41	0,42	0,41	0,41

Unidades: mg/L; B.1=botella 1; B.2= botella 2.

AI.19 Número de células por gramo seco, porcentaje de células antes de la disrupción y después de la disrupción, y porcentaje de ruptura promedio de las muestras de lías

	Células/g DW		% CAD		% CDD		% RP	
Muestra	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
1ª Fermentación	1,67E+09	2,10E+08	56	7	8	2	86	6
2ª Fermentación	1,12E+10	5,87E+07	83	5	29	3	65	7
Charmat	2,76E+10	1,02E+08	96	4	31	3	68	5
Levaduras secas inactivas	2,30E+09	0,14E+08	93	6	65	5	30	4

Códigos: % CAD=porcentaje de células antes de la disrupción; % CDD=porcentaje de células después de la disrupción; % RP=porcentaje de ruptura promedio. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.20 Porcentaje de sólidos, pH, y ácido tartárico de las muestras de lías

	% sólidos		pH		% Ac. tartárico	
Muestras	Media	DS	Media	DS	Media	DS
1FS	68	2	3,3	0,2	78	9
2FS	12	1	3,1	0,1	18	2
XS	29	2	3,2	0,1	5	0

Códigos: 1FS=lías de primera fermentación del cava antes del lavado; 2FS= lías de segunda fermentación de cava antes del lavado; XS= lías de segunda fermentación del Charmat antes del lavado. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.21 Contenidos en fenoles individuales de las muestras de lías medidos por HPLC

		Ác. Gálico		Tirosol		Ác. Caftárico		Catequina		Ác. Cafeico		Epicatequina		Ác. Coumárico		Ác. Ferúlico	
Muestra	Fracción	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
1ª	ES	2,0	0,4	15,4	1,6	42,9	6,1	29,1	3,8	4,2	1,0	11,2		0,7	0,0	1,7	0,1
Fermentación	WY	nd		12,3	0,8	8,6	1,4	9,8	1,8	2,5	0,1	nd		nd		2,2	0,0
	CWY	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Cyt	nd		nd		7,1	0,6	8,5	1,1	1,8	0,2	nd		nd		nd	
2ª	ES	nd		nd		349,2	28,2	nd		8,7	0,3	72,5		10,0	0,7	4,2	0,5
Fermentación	WY	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	CWY	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Cyt	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
Charmat	ES	nd		nd		396,0	34,7	50,3	4,2	15,6	1,2	171,9		3,8	0,0	nd	
	WY	nd		nd		100,5	8,9	23,4	1,5	1,3	0,1	nd		nd		nd	
	CWY	nd		nd		80,0	10,1	21,5	2,7	0,9	0,1	6,8	1,2	nd		nd	
	Cyt	nd		nd		20,3	1,3	nd		nd		nd		nd		nd	

Unidades: µg/g de peso seco. Códigos: ES=lía entera sucia; WY=lía entera limpia; CWY=paredes; Cyt=citoplasma. D.S.=desviación estándar; nd=datos por debajo de límite de detección; n=3.

	Ác. gálico	Tirosol	Ác. caftárico	Catequina	Ác. cafeico	Epicatequina	Ác. coumárico	Ác. ferúlico
LDD (mg/L)	0,05	0,26	0,05	0,25	0,03	0,23	0,02	0,03

Límites de detección (LDD) de los fenoles con el método analítico aplicado.

AI.22 Contenido en polisacáridos, proteína soluble, péptidos y aminoácidos libres de las muestras de lías

		% Polisacáridos		% Proteína soluble		% Péptidos		% Aminoácidos	
Muestra	Fracción	Media	DS	Media	SD	Media	SD	Media	SD
1ª	WY	13,4	0,7	2,7	0,2	-		0,02	0,00
Fermentación	CWY	10,9	0,4	2,7	0,1	-		0,01	0,00
	Cyt	2,1	0,4	0,1	0,0	-		0,01	0,00
2ª	WY	72,3	6,7	8,5	0,7	-		0,05	0,01
Fermentación	CWY	74,5	6,5	8,7	0,5	-		0,08	0,01
	Cyt	0,5	0,1	0,4	0,1	-		0,01	0,01
Charmat	WY	70,7	6,8	15,5	1,4	-		0,05	0,01
	CWY	67,8	4,0	15,0	0,5	-		0,05	0,01
	Cyt	8,1	0,4	0,7	0,1	-		0,01	0,00
Levadura	WY	56,6	6,1	21,2	1,5	3,40	0,04	5,76	0,04
Seca Inactiva	CWY	46,9	4,2	15,5	1,2	-		0,11	0,01
	Cyt	9,9	0,6	2,7	0,6	3,32	0,02	5,42	0,06

Porcentajes en peso referidos al peso seco de levadura entera. Códigos: ES=lía entera sucia; WY=lía entera limpia; CWY=paredes; Cyt=citoplasma. D.S.=desviación estándar; n=3. El guion indica que la medida está por debajo del límite de cuantificación.

AI.23 Contenido en tioles totales, glutatión reducido y oxidado de las muestras de lías

		% Tioles totales		% Glutatión reducido		% Glutatión oxidado	
Muestra	Fracción	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
1ª	WY	0,038	0,001	-		-	
Fermentación	CWY	0,033	0,002	-		-	
	Cyt	0,015	0,002	-		-	
2ª	WY	0,037	0,002	-		-	
Fermentación	CWY	0,035	0,001	-		-	
	Cyt	0,015	0,002	-		-	
Charmat	WY	0,154	0,006	-		-	
	CWY	0,184	0,015	-		-	
	Cyt	0,017	0,002	-		-	
Levadura	WY	3,282	0,373	2,254	0,249	0,294	0,003
Seca Inactiva	CWY	0,532	0,031	0,126	0,012	-	
	Cyt	2,920	0,021	1,956	0,047	0,329	0,014

Porcentajes en peso referidos al peso seco de levadura entera. Códigos: ES=lía entera sucia; WY=lía entera limpia; CWY=paredes; Cyt=citoplasma. D.S.=desviación estándar; n=3. El guion indica que la medida está por debajo del límite de cuantificación.

AI.24 Actividad antioxidante de las muestras de lías y sus fracciones

		Folin-Ciocalteau		FRAP		DPPH	
		Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
1ª	WY	10,30	1,26	3,46	0,32	8,19	0,99
Fermentación	DY	18,79	0,55	4,34	0,44	10,73	0,48
	CWY	15,72	0,19	3,83	0,86	8,75	0,55
	Cyt	2,39	0,12	1,49	0,47	0,51	0,08
2ª	WY	26,90	0,47	2,38	0,24	5,71	0,75
Fermentación	DY	32,71	2,56	2,72	0,36	5,35	0,36
	CWY	32,33	0,43	2,43	0,31	5,24	0,42
	Cyt	1,06	0,81	0,53	0,22	0,63	0,06
Charmat	WY	48,35	4,43	7,82	0,34	11,27	2,98
	DY	65,42	5,03	8,63	1,61	17,89	2,46
	CWY	56,63	2,01	8,00	0,60	19,83	2,36
	Cyt	1,86	0,44	0,18	0,04	0,38	0,01
Levadura	WY	35,79	7,33	8,32	0,28	13,82	2,75
Seca Inactiva	DY	52,37	2,31	8,39	0,60	12,89	1,79
	CWY	27,02	3,51	0,57	0,06	4,02	0,33
	Cyt	30,35	2,36	8,23	0,43	8,68	1,06

Unidades: mg TEQ /g peso seco (valores referidos al peso seco de levadura entera). Códigos: WY=lía entera limpia; DY=lía después de la disrupción; CWY=paredes; Cyt=citoplasma. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.25 Actividades antioxidantes de diferentes productos comerciales procedentes de *Saccharomyces Cerevisiae*

	Folin-Ciocalteau		FRAP		DPPH	
Muestra	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
Levadura	28,43	1,33	9,26	0,23	14,25	0,53
Autolisado	59,53	1,49	5,01	0,45	6,44	0,31
Extracto	60,80	0,82	4,31	0,48	5,21	0,47
Glucanos	0,30	0,01	-		-	
Mananos	2,01	0,07	0,13	0,04	0,19	0,01
Zimosan A	10,77	1,12	6,24	1,10	2,70	0,12

D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.26 Composición en peso seco de las paredes celulares de las muestras de lías

	% Pared (*)		% Polisacáridos		% Proteína		% Tioles	
	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
1ª Fermentación	70	5	15,6	0,6	3,8	0,1	0,047	0,040
2ª Fermentación	94	8	79,2	6,9	9,2	0,5	0,037	0,027
Charmat	95	7	71,4	4,2	15,8	0,5	0,194	0,077
Levadura Seca Inactiva	77	6	60,9	5,5	20,1	1,6	0,691	0,045

(*) porcentaje en peso seco de la pared respecto a la muestra entera. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.27 Actividades antioxidantes de las paredes celulares de las muestras de lías antes del fraccionamiento

	Folin-Ciocalteau		FRAP		DPPH	
	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
1ª Fermentación	22,45	0,27	5,47	1,22	12,50	0,78
2ª Fermentación	34,39	0,46	2,59	0,33	5,58	0,45
Charmat	59,61	2,12	8,42	0,63	20,87	2,49
Levadura Seca Inactiva	35,09	4,56	0,74	0,07	5,23	0,42

Unidades: mg TEQ /g peso seco. D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.28 Contenido en polisacáridos, proteína soluble, péptidos y aminoácidos libres de las fracciones obtenidas de la pared

		% Polisacáridos		% proteína soluble		% Péptidos		% Aminoácidos libres		% Tioles totales	
Muestra	Fracción	Media	D.S	Media	D.S	Media	D.S	Media	D.S	Media	D.S
1ª	F1	1,88	0,29	0,23	0,03	0,10	0,01	0,02	0,01	0,015	0,004
Fermentación	F2	1,31	0,06	2,29	0,14	0,52	0,07	0,23	0,02	0,008	0,000
	F3	0,67	0,12	0,45	0,01	0,18	0,01	0,07	0,01	0,005	0,001
	F4	8,62	1,81	0,1	0,04	0,01	0,00	0,04	0,01	-	
2ª	F1	20,6	2,18	1,83	0,05	2,90	0,13	0,05	0,00	0,030	0,007
Fermentación	F2	5,49	0,23	0,73	0,03	5,53	0,11	0,41	0,05	0,018	0,004
	F3	8,98	0,78	0,11	0,04	0,80	0,2	0,13	0,00	0,001	0,001
	F4	41,13	0,67	0,1	0,02	0,08	0,02	-		-	
Charmat	F1	12,99	0,52	1,99	0,08	2,81	0,66	0,06	0,00	0,096	0,009
	F2	8,49	0,62	0,66	0,01	10,31	1,33	1,29	0,05	0,033	0,006
	F3	5,69	0,31	0,32	0,03	1,59	0,13	0,46	0,03	0,01	0,001
	F4	36,82	0,42	0,15	0,01	0,13	0,02	0,07	0,01	-	
Levadura	F1	16,62	1,09	4,12	0,2	4,22	0,61	0,06	0,01	0,066	0,002
Seca Inactiva	F2	9,07	1,07	0,12	0,04	11,48	0,99	1,12	0,08	0,042	0,001
	F3	6,83	0,99	0,24	0,08	0,94	0,12	0,40	0,01	0,101	0,020
	F4	29,32	0,13	0,32	0,01	0,07	0,02	0,01	0,00	0,024	0,001

Porcentajes en peso referidos al peso seco de pared inicial. D.S.=desviación estándar; n=3. El guion indica que la medida está por debajo del límite de cuantificación.

AI.29 Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas de las paredes celulares de las lías

		Folin-Ciocalteau		FRAP		DPPH	
Muestra	Fracción	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
1ª	F1	5,23	0,20	3,28	0,25	1,85	0,03
Fermentación	F2	9,95	0,21	2,38	0,20	1,78	0,01
	F3	4,80	0,39	0,80	0,13	0,65	0,14
	F4	2,65	0,20	0,61	0,15	0,35	0,09
2ª	F1	13,09	0,65	3,18	0,47	3,42	0,13
Fermentación	F2	21,93	0,18	2,65	0,28	3,63	0,13
	F3	4,96	1,06	0,33	0,02	0,76	0,08
	F4	0,59	0,20	0,01	0,00	0,10	0,01
Charmat	F1	17,69	0,65	8,01	0,20	10,75	0,17
	F2	78,60	4,44	12,03	0,95	11,71	0,18
	F3	11,54	1,20	2,29	0,26	2,41	0,34
	F4	5,24	1,39	0,47	0,17	0,97	0,25
Levadura	F1	11,06	0,24	0,83	0,09	0,64	0,08
Seca Inactiva	F2	37,50	1,40	1,29	0,21	1,53	0,13
	F3	11,48	0,50	0,65	0,17	0,57	0,01
	F4	3,36	1,00	0,09	0,02	0,14	0,02

Unidades: mg TEQ /g peso seco (valores referidos al peso seco de pared). D.S.=desviación estándar; n=3.

AI.30 Contenido en polisacáridos, proteína soluble, péptidos, aminoácidos libres y tioles de los precipitados (P) y sobrendantes (S) obtenidos con los dos tratamientos para la obtención de manoproteínas

			% Polisacáridos		% Proteínas		% Péptidos		% Aminoácidos		% Tioles	
Muestra	Tratamiento	Fracción	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
2ª Fermentación	30 mM	P	63,3	1,6	0,75	0,44	0,02	0,00	0,09	0,01	0,015	0,001
	30 mM	S	15,8	0,5	8,73	0,33	0,78	0,05	0,04	0,00	0,027	0,012
	β-Glu	P	49,1	2,4	5,16	0,21	0,01	0,00	0,01	0,00	0,022	0,003
	β-Glu	S	28,8	1,7	4,34	0,5	0,07	0,02	0,06	0,01	0,012	0,000
Charmat	30 mM	P	56,6	1,7	0,14	0,00	0,05	0,02	0,01	0,00	0,043	0,008
	30 mM	S	13,4	0,3	13,36	1,53	0,47	0,03	0,01	0,01	0,069	0,010
	β-Glu	P	50,7	0,7	9,88	1,17	0,03	0,00	0,01	0,00	0,087	0,004
	β-Glu	S	18,2	1,1	4,35	0,34	0,06	0,00	0,02	0,00	0,074	0,021
Levadura Seca Inactiva	30 mM	P	43,1	1,4	9,29	0,21	0,03	0,01	0,01	0,00	0,167	0,054
	30 mM	S	12,1	1,2	12,91	0,28	0,54	0,02	0,07	0,01	0,291	0,030
	β-Glu	P	42,8	2,3	18,84	0,89	0,06	0,00	0,02	0,01	0,286	0,017
	β-Glu	S	13,4	1,2	2,83	0,26	0,09	0,01	0,04	0,01	0,161	0,017

Porcentajes en peso referidos al peso seco de pared inicial. Códigos: 30 mM=tratamiento básico suave; β-Glu=tratamiento con β-Glucanasa. D.S.=desviación estándar; n=3.

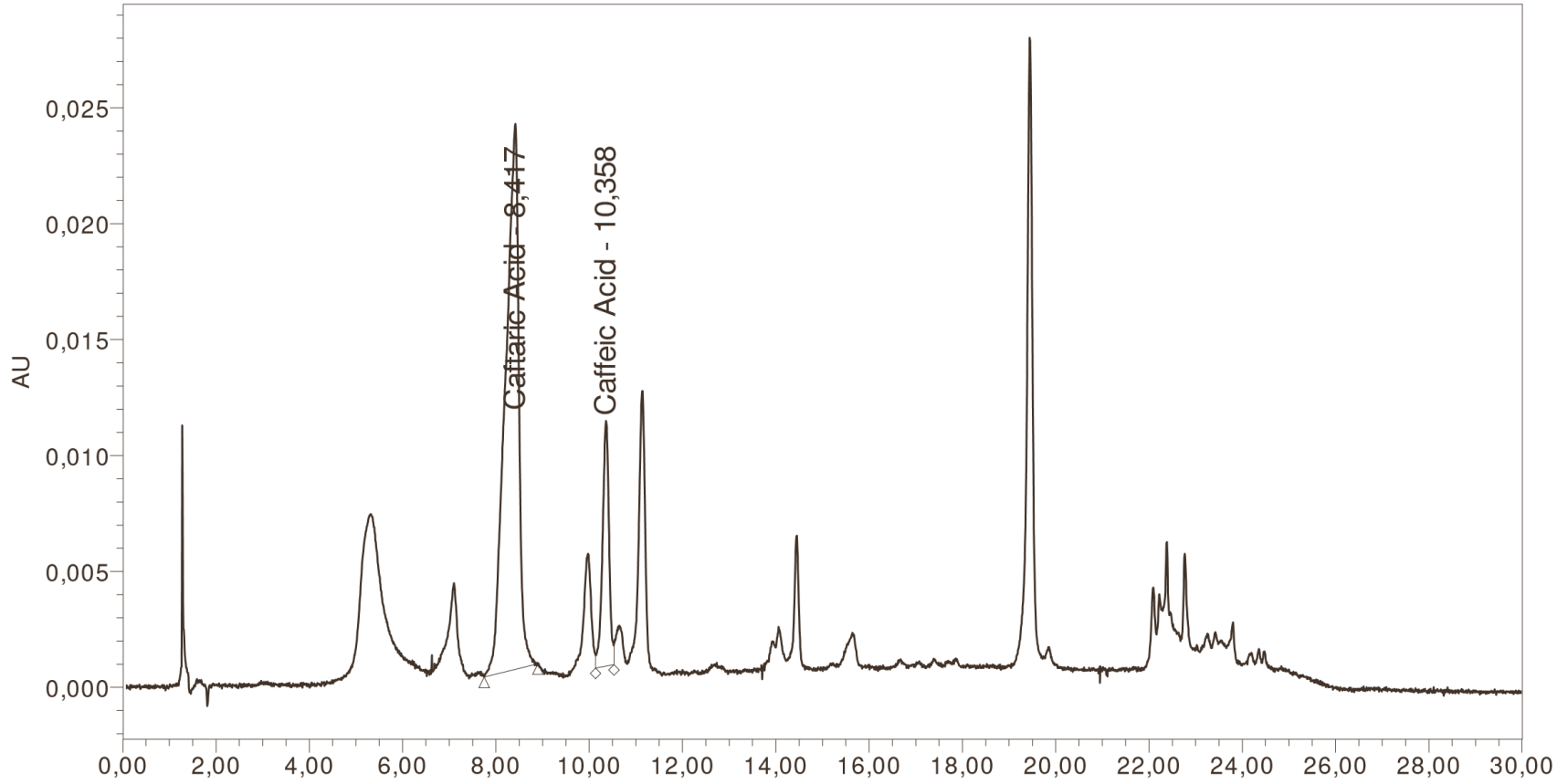
AI.32 Actividad antioxidante de los precipitados (P) y sobrenadantes (S) obtenidos con los dos tratamientos para la obtención de manoproteínas

			Folin-Ciocalteau		FRAP		DPPH	
Muestra	Tratamiento	Fracción	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
2ª	30 mM	P	44,81	2,12	3,44	0,61	5,05	0,08
Fermentación	30 mM	S	6,03	0,44	1,16	0,23	0,95	0,06
	β-Glu	P	13,34	1,77	1,05	0,07	2,54	0,04
	β-Glu	S	25,02	1,42	1,00	0,02	2,32	0,29
Charmat	30 mM	P	106,06	4,91	9,44	0,29	18,06	0,85
	30 mM	S	8,85	1,16	0,88	0,05	2,48	0,15
	β-Glu	P	17,33	1,99	2,31	0,23	5,74	0,11
	β-Glu	S	58,36	3,62	6,11	0,43	14,59	0,61
Levadura	30 mM	P	36,18	0,61	0,40	0,02	2,85	0,19
Seca Inactiva	30 mM	S	18,16	0,84	0,06	0,01	1,17	0,16
	β-Glu	P	3,68	0,81	0,00	0,00	0,60	0,03
	β-Glu	S	16,68	1,58	0,45	0,05	3,72	0,20

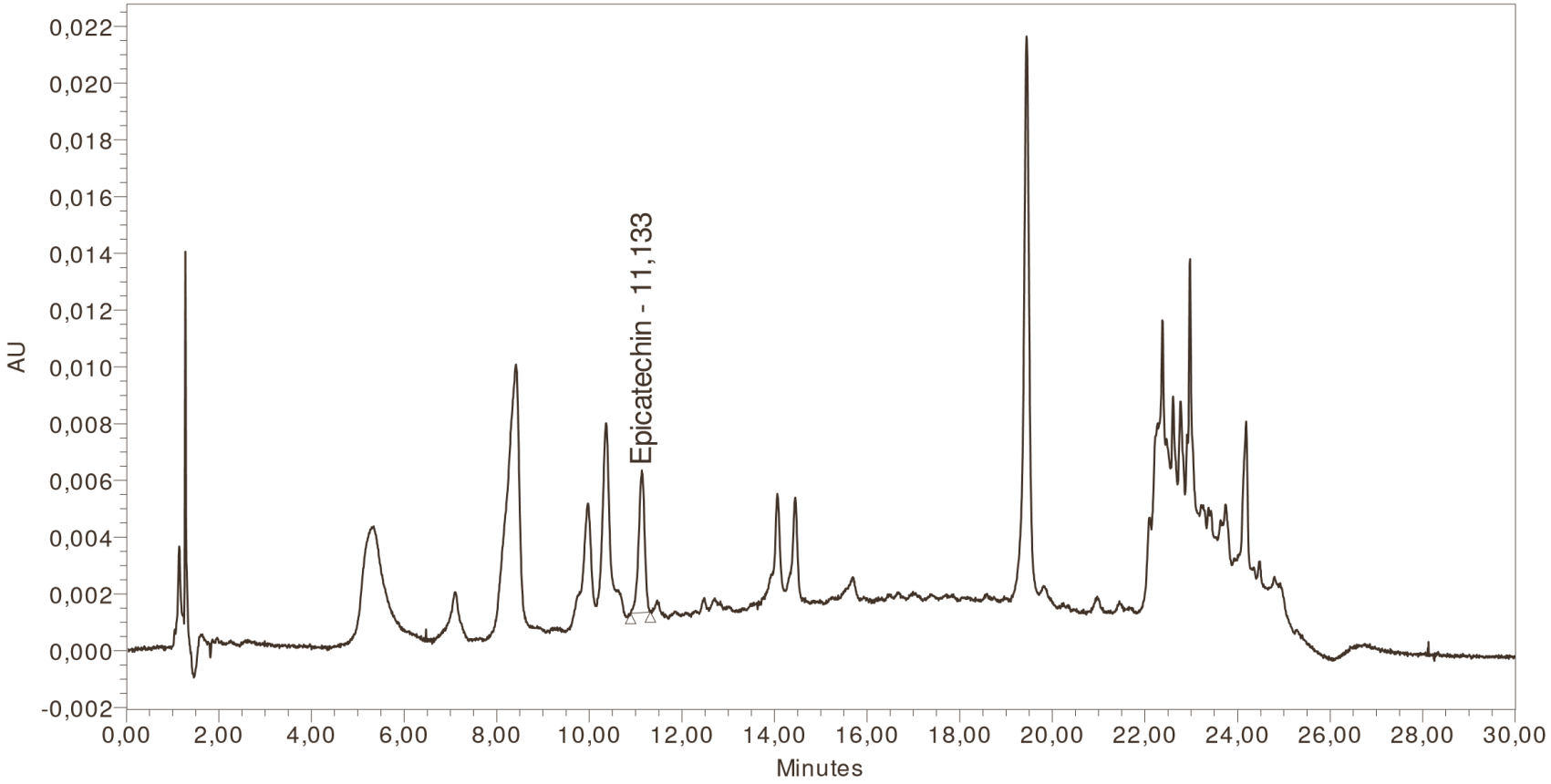
Unidades: mg TEQ /g peso seco (valores referidos al peso seco de pared). Códigos: 30 mM=tratamiento básico suave; β-Glu=tratamiento con β-Glucanasa. D.S.=desviación estándar; n

ANEXO II. CROMATOGRAMAS

AII.1 Cromatograma a 329 nm de las lías de segunda fermentación del Charmat antes del lavado

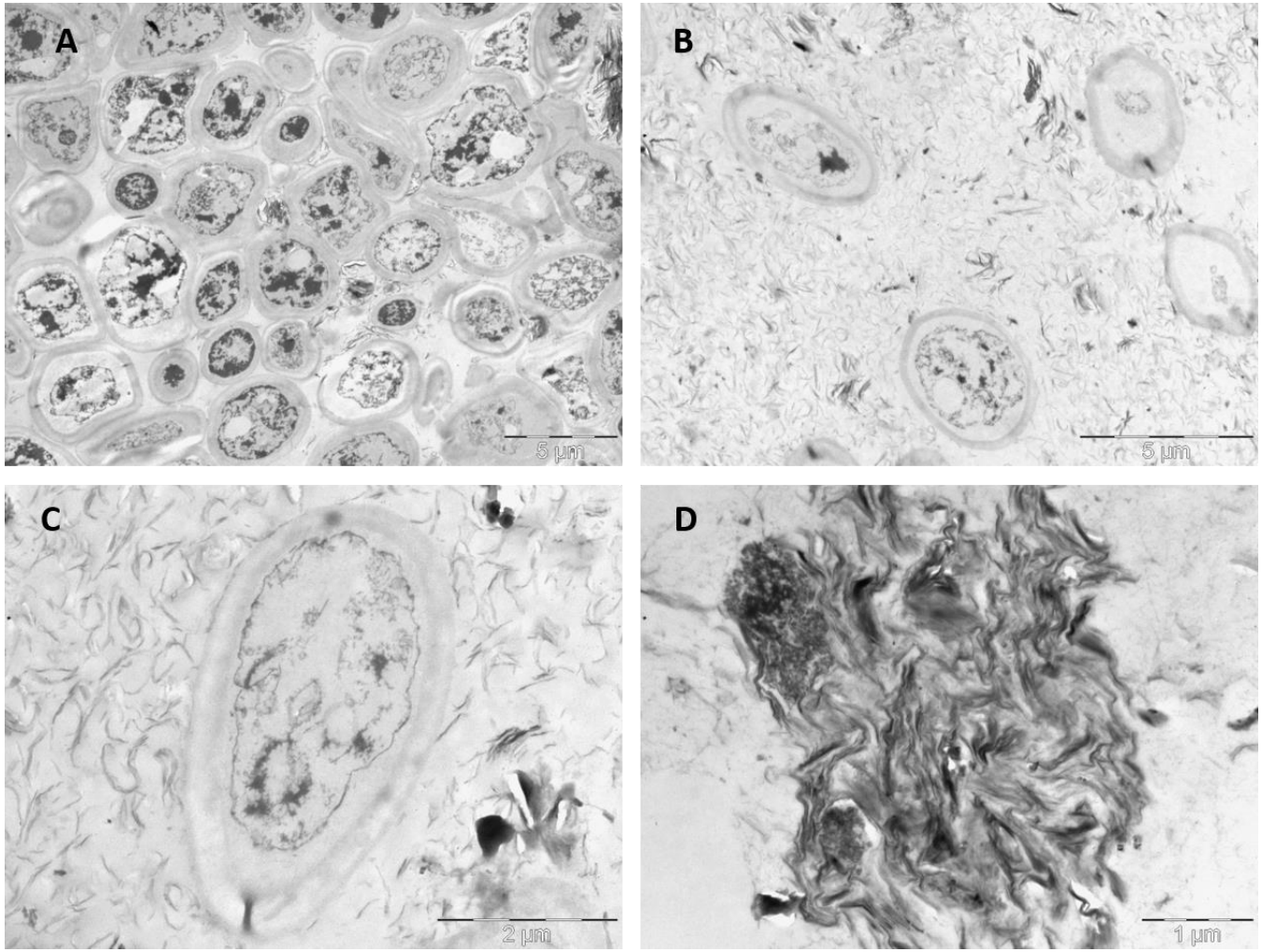


AII.2 Cromatograma a 279 nm de las lías de segunda fermentación del Charmat antes del lavado



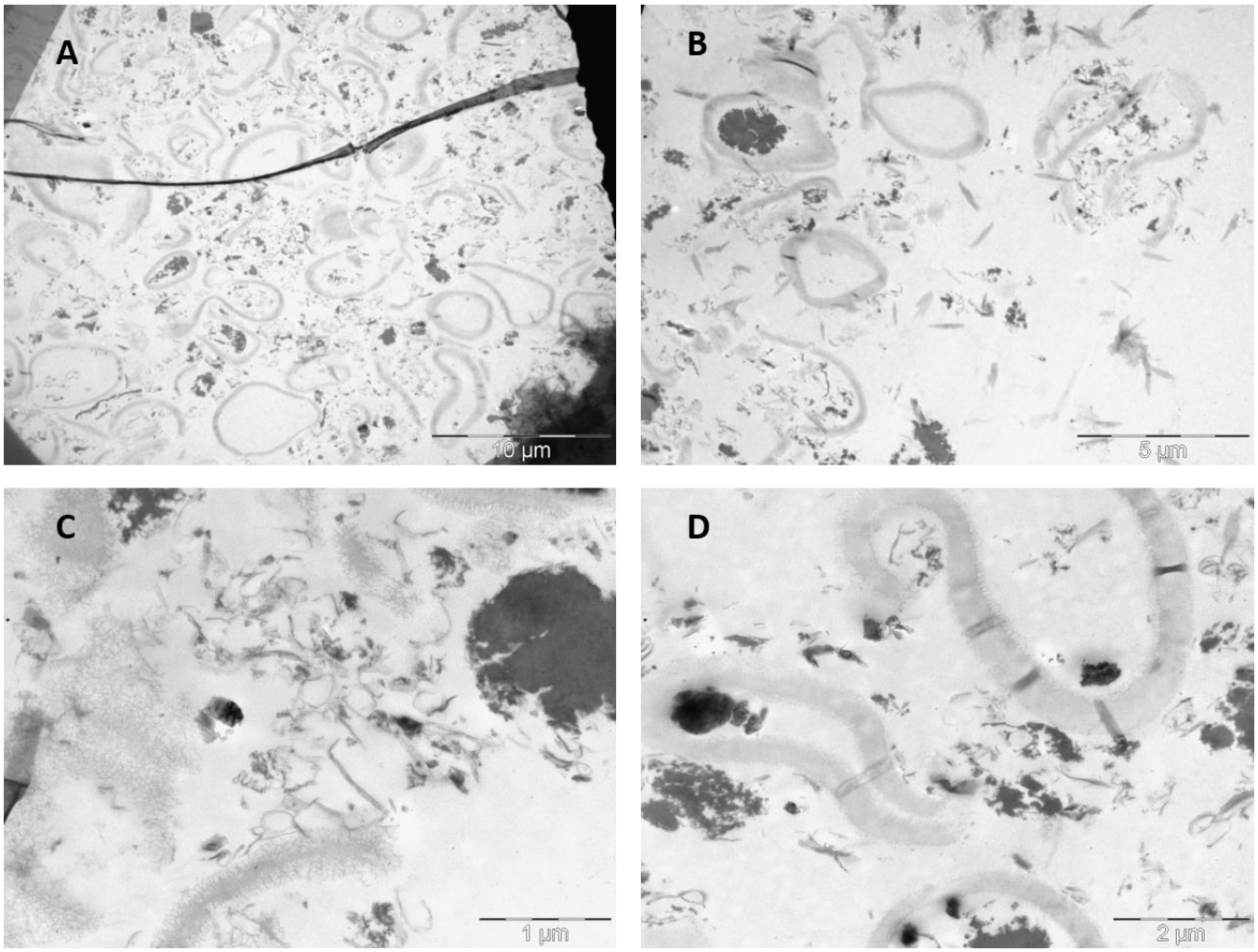
ANEXO III. IMÁGENES DE MICROSCOPÍA

AIII.1 Imágenes de microscopía de transmisión electrónica de lías de segunda fermentación del cava

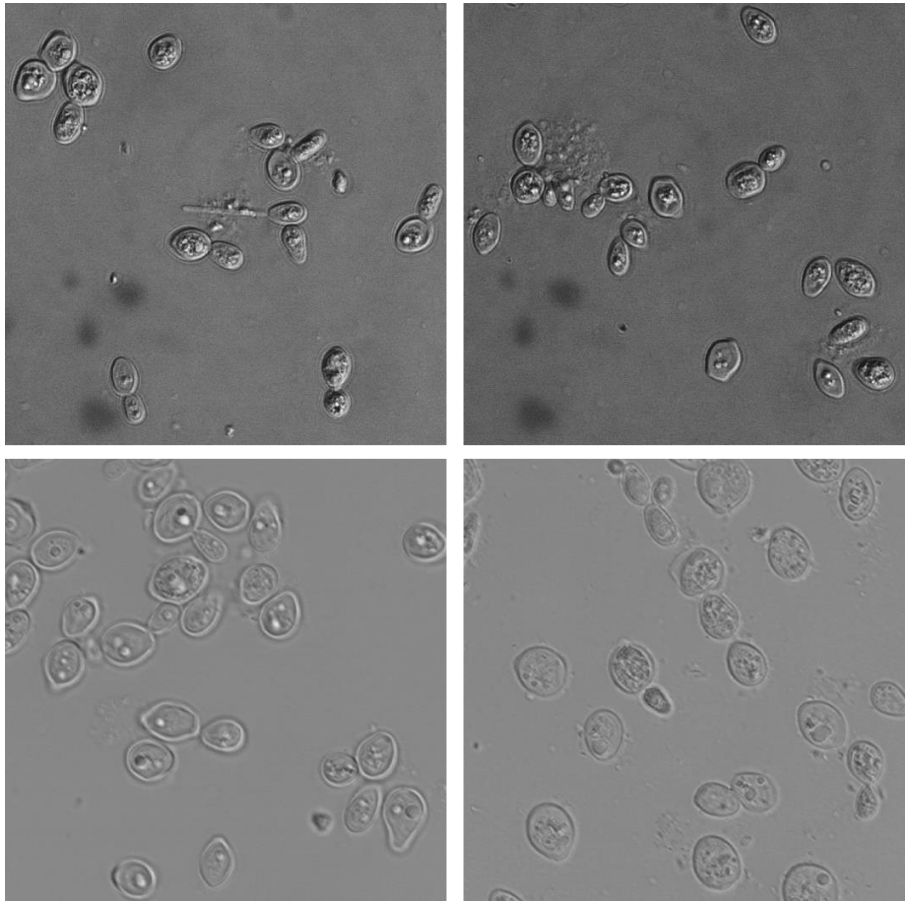


Lías antes de la disrupción: A, B y C; fracción citoplasma: D.

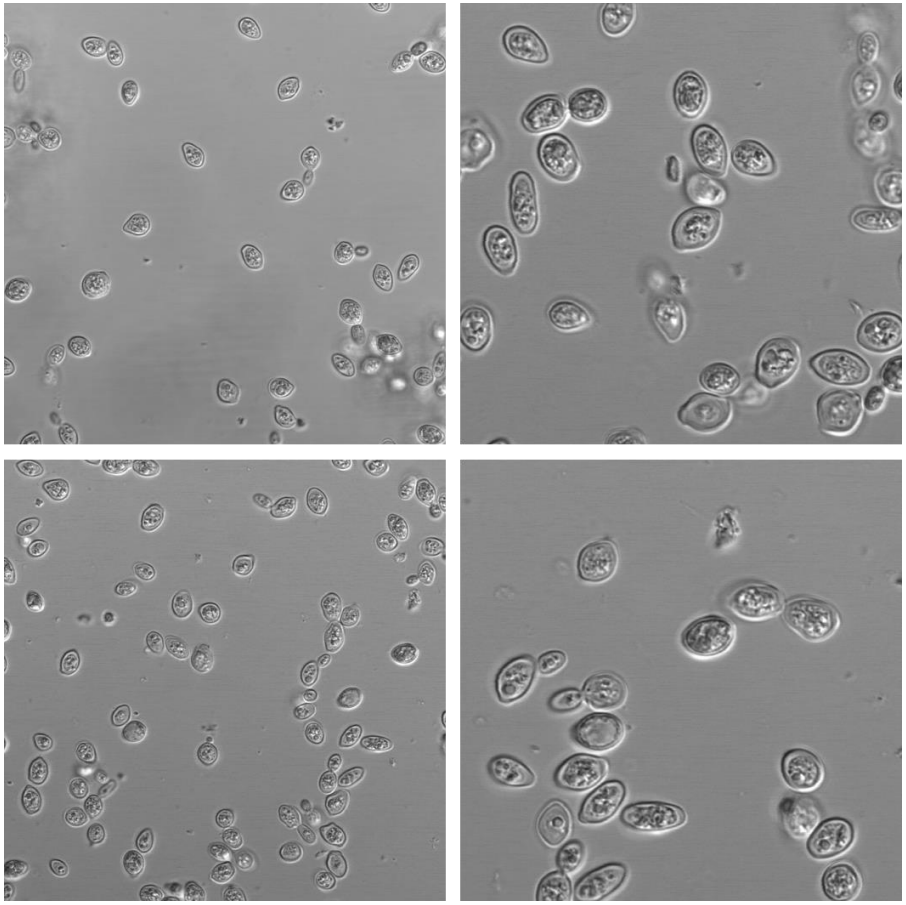
AIII.2 Imágenes de microscopía de transmisión electrónica de las paredes de lías de segunda fermentación del cava después de la disrupción



AIII.3 Imágenes de microscopía confocal de las lías de segunda fermentación del cava



AIII.4 Imágenes de microscopía confocal de las lías de segunda fermentación del Charmat



ANEXO IV. PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS

A. Serra-Cayuela, M. A. Aguilera-Curiel, M. Riu-Aumatell, S. Buxaderas, y E. López-Tamames, (2013), «Browning during biological aging and commercial storage of Cava sparkling wine and the use of 5-HMF as a quality marker», Food Res. Int., vol. 53, n. 1, pp. 226-231.

Food Research International 53 (2013) 226–231

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Browning during biological aging and commercial storage of Cava sparkling wine and the use of 5-HMF as a quality marker

A. Serra-Cayuela, M.A. Aguilera-Curiel, M. Riu-Aumatell *, S. Buxaderas, E. López-Tamames

Departament de Nutrició i Bromatologia, Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments (XaRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Campus de l'Alimentació de Torribera, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 November 2012
Accepted 19 April 2013

Keywords:
Browning
Aging
Sparkling wine
5-Hydroxymethylfurfural
Storage
Lees

ABSTRACT

The quality of sparkling wines can deteriorate due to browning, which is mainly attributed to the oxidation of phenols. The aim of this study was to assess the browning (measured as the absorbance at 420 nm) of two real series of Cava sparkling wines (A and B) during aging *sur lie* (biological aging, with lees) and commercial storage (without lees) under real conditions, over almost two years, since lees may reduce the effect by adsorbing the precursors and the browning compounds. The role of phenolics and 5-HMF (5-hydroxymethylfurfural) was also assessed. A significant linear increment in browning was observed in all four Cava series in both kinds of aging. No differences in browning were observed between the two types of aging (biological vs. commercial storage). In contrast, the 5-HMF content increased linearly with time although its rate of formation was dependent on the type of aging (biological or storage). The phenolic compounds *trans*-coutaric and *p*-coumaric increased significantly with time and were significantly correlated with browning. The most aged sparkling wines (*Gran Reserva*) had highest A_{420} and 5-HMF values. 5-HMF was correlated with browning and can be used as a quality marker.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cava is a high-quality sparkling wine produced using a traditional method whereby a base wine is re-fermented in a sealed bottle. Wines must be in contact with lees under anaerobic conditions for at least 9 months in the bottle for them to achieve Cava status (Official Journal of the European Union, Commission Regulation (EC), 2009, sec. Regulations).

The term *Reserva* applies to wines that have been kept in contact with the lees for at least 15 months, while *Gran Reserva* refers to wines that have been kept in contact with the lees for at least 30 months, both involving the second fermentation process. Wine is a dynamic product in terms of its physicochemical and sensory properties and undergoes many transformations that begin just after grape crushing, and continue during the winemaking process, fermentations and throughout aging and storage. Together with aroma, color is a significant characteristic of white wines and its deterioration is recognized by consumers. Once the bottle has been sealed, browning can no longer be corrected. Thus, it is important for wineries to optimize the aging of the wines and understand how the wine develops during both the aging process and its subsequent commercial storage (shelf-life). The oxidation of phenolic compounds is believed to be the main contributing factor in the browning process (Cheynier, Masson, Rigaud, & Moutounet, 1993; Li, Guo, & Wang, 2008; Singleton, 1987) and it is widely accepted that there are two main mechanisms: enzymatic and non-enzymatic (Li et al., 2008; Oliveira, Ferreira, De Freitas, & Silva, 2011). The former occurs mostly when grape must is obtained and is associated with polyphenol oxidase (PPO), the activity of which increases in the presence of O_2 and inhibited in the presence of SO_2 and ethanol (Ribéreau-Gayon, Dubourdie, Donèche, & Lonvaud, 2006). In contrast, non-enzymatic browning in wine may arise from the chemical oxidation of phenols and the subsequent polymerization of the oxidized products (Li et al., 2008; Oliveira et al., 2011; Waterhouse & Laurie, 2006). However, it has also been reported that in a white model wine and in white wine supplemented with catechin and epicatechin, xanthylium salts (yellow-orange) are formed over time due to the reaction of flavanols and aldehydes such as glyoxylic acid (Es-Safi, Le Guernevé, Cheynier, & Moutounet, 2000; Maury, Clark, & Scollary, 2010) or furfurals (Nonier, Vivas, Vivas de Gaulejac, Pianet, & Fouquet, 2007). Although most authors attribute browning to the presence of phenols (Oliveira et al., 2011; Waterhouse & Laurie, 2006), it is difficult to clarify which compounds are involved in this phenomenon due to the large quantity of different substances present in wine, such as proteins, amino acids and reducing sugars, and the potential interactions between these substances (Li et al., 2008; Zoecklein, 1995).

Browning has already been studied in white and specialty wines as well as in accelerated tests (Bosch-Fusté et al., 2009;

* Corresponding author. Tel.: +34 934033795; fax: +34 934035931.
E-mail address: monserius@ub.edu (M. Riu-Aumatell).

0963-9969/$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.010

Ibern-Gómez et al., 2000; Kallithraka, Salacha, & Tzourou, 2009; Lopez-Toledano, Mayen, Merida, & Medina, 2006). Sparkling wines have a lower oxygen content than white wines due to the overpressure produced by CO_2, which inhibits the entrance of oxygen. In addition aging takes place while in contact with lees, which is not common in white wines. Ibern-Gómez et al. (2000) studied the development of browning during biological aging in Cava from different coupages, and the observed increase was thought to be associated with the oxidation of phenolic compounds such as caftaric acid. However, in studies of wines undergoing biological aging, other authors state that the wall of the yeast is capable of adsorbing compounds from the wine (Del Barrio-Galán, Pérez-Magariño, Ortega-Heras, Williams, & Doco, 2011; Mazauric & Salmon, 2005) and thus the precursors or the actual compounds that are responsible for the browning (Razmkhab et al., 2002). According to these authors, the lees should inhibit browning. However, an accelerated study of Cava sparkling wines showed an increase in browning over time (Bosch-Fusté et al., 2009), though real sparkling wine is not monitored during commercial storage. The difference between biological aging and aging during commercial storage is dependent on the fact that during biological aging the wine is in contact with the lees, while prior to commercial storage, the lees are removed – following the dosage step – and sugar and sulfur dioxide (SO_2) are added. SO_2 is an antioxidant and an antimicrobial compound that is generated during the fermentation process by the *Saccharomyces cerevisiae* yeast present in the wine, though most of it is added with the *liqueur d'expédition* to regulate the growth of harmful yeast and bacteria (Oliveira et al., 2011). It has been reported that this substance interacts with compounds involved in the browning process (Danilewicz, Seccombe, & Whelan, 2008; Li et al., 2008).

Absorbance at a wavelength of 420 nm is a measure of the intensity of yellow coloring in white wine, and has previously been used as a parameter for measuring the browning of white wines (Singleton & Kramlinga, 1976; Zoecklein, 1995). However, Cava sparkling wines are mainly produced from a *coupage* of base wines of Macabeu, Xarel·lo and Parellada cultivars. These white grape varieties tend to give a pale and straw-yellow Cava (Buxaderas & López-Tamames, 2003), and thus absorbance and other parameters used to estimate browning are too low to be of use. Thus, an alternative quality marker would be useful for Cava producers. In their accelerated study, Bosch-Fusté et al. (2009) observed a linear increase in a particular substance with time. This compound has been identified as 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), which is a classic product of the Maillard reaction; however, in the case of sparkling wines it is probably formed from the multiple dehydration of hexoses and ketopentoses (Pereira, Albuquerque, Ferreira, Cacho, & Marques, 2011). HMF has previously been used as a browning marker and indicator of inadequate storage in various foodstuffs such as honey, jam, fruit juices and milk (Gaspar & Lucena, 2009; Rada-Mendoza, Sanz, Olano, & Villamiel, 2004; Teixidó, Moyano, Santos, & Galceran, 2008). In a wine medium, this aldehyde can polymerize with phenols to produce brown compounds (Nonier et al., 2007).

In this study, two different real Cava series were monitored during biological aging (*sur lie* A and B series) and during shelf-life storage (A and B series). The aim of this study was to assess browning by means of absorbance at a wavelength of 420 nm in real sparkling Cava wines over time and under constant cellar conditions at a temperature of 16 °C. The trends observed during biological aging and during commercial storage were compared, by means of browning and phenol content. To the best of our knowledge, no other study has compared the browning of real sparkling wine samples during biological aging and storage. Furthermore, the development of 5-HMF at both stages was studied to determine whether this furfural can be used as an aging marker and also to determine its involvement in the browning process.

2. Material and methods

2.1. Standards and reagents

5-Hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF, 99%), formic acid, gallic acid, protocatechuic acid, tyrosol, caftaric acid, caffeic acid, catechin, *p*-coumaric and potassium metabisulfite were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Scharlau (Sentmenat, Spain) and was passed through a GHP membrane filter (0.22 μm) from Waters (Milford, Milford, MA, USA). Folin–Ciocalteu reagent, sodium carbonate anhydrous, ethanol (PA) and sulfuric acid 1/3 (w/v), starch solution 2% and iodine (0.01 M) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2. Samples

A parallel study was designed to compare biological aging and commercial storage (Fig. 1). For this purpose, 500 bottles of 750 mL of two different quality blends (A and B) of white wines from the Macabeu, Xarel·lo and Parellada white grape variety were bottled after adding the "*liqueur de tirage*". This liqueur was mixed with the base wines, giving around $1–2 \times 10^6$ yeast cells mL^{-1} (yeast starter), 22–24 g of sucrose L^{-1} and 0.04 g L^{-1} per bottle of calcium bentonite (Bentosan, acquired from Gon-Cruz S.L., La Rioja, Spain). All processes were conducted on an industrial scale at the Freixenet S.A. winery employing the traditional method. The yeast employed was the F5 from the Freixenet S.A. wineries private selection. Yeast was conditioned following the steps employed for the industrial conditions of the winery, including several stages for acclimatization to the alcoholic medium. Following the second fermentation, and after 9 months in contact with the lees (minimum legal time required to be considered Cava), 40 bottles were sampled. Half of the bottles ($n = 20$) were disgorged in order to remove the lees, and afterwards the *liqueur d'expédition* (mainly SO_2 and sugars) was added to produce commercial sparkling wine. The dosage operation was performed using the triblock gravity filling and corking Perrier GCD 3112 system, to all bottles at the same time. The resulting liqueur contained wine, sucrose and the correct amount of sulfite to ensure adequate hygiene quality during storage; the initial contents are shown in Table 1. At this point (coded as zero), four bottles of the biologically aged wine (two of wine A and two of wine B) and the same number of commercially stored bottles were opened and frozen. The remaining bottles were stored under cellar conditions (16 °C) and at 4, 8, 12 and 21 months the same operation was performed. In summary (Fig. 1), there were thus four series with five sampling points (0, 4, 8, 12 and 21 months); two corresponding to the biological aging period (after 9 months) and two during commercial storage. During biological aging bottles were sealed with a plastic bidule and a crown cap, while after disgorging a commercial conglomerate stopper with two natural cork disks was employed. Within each aging type (biological and commercial), half of the bottles contained a blend of white wines, and the other half a different white base wine (series A and B respectively).

Table 1 shows the main physical and chemical characteristics of these sparkling wines. In order to remove the lees and to degas the product, the biologically aged wines were centrifuged at 4 °C for 15 min at 1410 g (Rotina 48CR, Tuttlingen, Germany), and the supernatant was then placed in a 250 mL amber flask. Commercial sparkling wines were also degassed. All samples were stored at −20 °C until analysis.

2.3. Analytical procedures

2.3.1. General parameters

Absorbance at 420 nm was measured using a 10 mm path length quartz cuvette and the total phenol (TP) content was determined using the Folin–Ciocalteu method. The free and the total SO_2 composition were measured using the Ripper test, as described in the Compendium

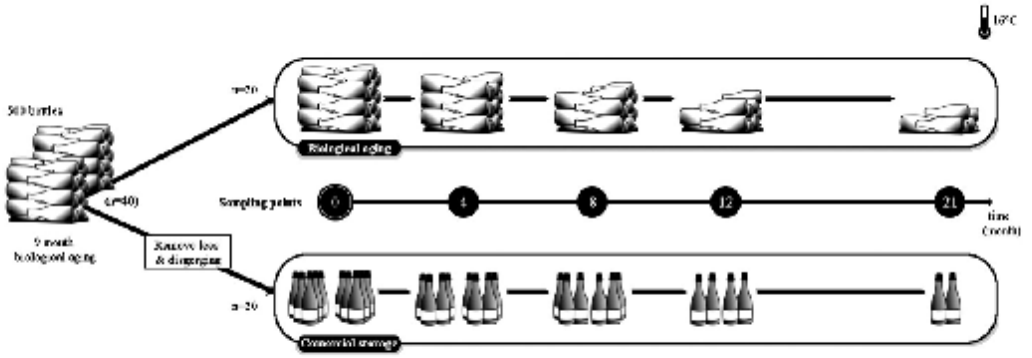


Fig. 1. Sampling scheme. A parallel study of the evolution of sparkling wines during biological aging and commercial storage. Sampling was performed at 0, 4, 8, 12 and 21 months, with two bottles of each wine (A and B) sampled at each point for each type of aging (biological and commercial).

of International Methods of Analysis (Organization International de la Vigne et du Vin, 2012). TP is expressed as mg of gallic acid equivalents per liter of wine (mg L^{-1} GAE). To determine the absorbance at 420 nm, wine samples were first filtered through cellulose filters and the values were multiplied 1000-fold. A Shimadzu® UV-3600 spectrophotometer (Duisburg, Germany) was used and all samples were analyzed in duplicate.

2.3.2. HMF and phenol quantification. UHPLC-DAD

Quantification of 5-HMF was performed as follows: 5 μL of the sample was injected into a UHPLC system (Waters, Milford, MA) using a BEH C_{18} column (50 × 1.0 mm × 1.7 μm), coupled to a DAD detector. Detection was achieved at the maximum absorption wavelength of each compound. The mobile phase consisted of eluent A as a solution of acetonitrile/water/formic acid (2.97:1, v/v/v) and eluent B as a solution of acetonitrile/water/formic acid (80:19:1, v/v/v). Linear gradient conditions were as follows: 0′—0% B, 3′—20% B, 3.5′—100% B, 4′—0% B, 5′—0% B at a flow rate of 0.800 ml/min. Quantification was carried out by using an external calibration curve for each standard, or standards of the same family when not available. All samples were analyzed in duplicate.

2.4. Statistical analysis

Pearson correlation was employed to determine the correlation between the variables A_{420}, 5-HMF, phenols and time. Significant relationships were determinate by the Analysis of Covariance (ANCOVA) using the General Linear Model (GLM) to compare the slopes of the two types of aging (*sur lie* or commercial storage) and to establish their kinetics according to base wine (A or B), while time was treated as a co-variable.

A Multiple Regression was performed to assess the ability of 5-HMF, and *trans*-coutaric, and *p*-coumaric acids to predict and evaluate the contribution to the browning (A_{420} values). The Akaike information criterion was used to select the significant predictors for the model.

In the case of biological aging (*sur lie*), Analysis of Variance (ANOVA) was employed to determine the 95% confidence region of 5-HMF and A_{420} according to the quality of the sparkling wines Cava (>9 months), *Reserva* (>15 months) and *Gran Reserva* (30 months).

Differences were considered significant when $P < 0.05$. Version 2.14 of the R package (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, Europe) was used for all statistical analyses and graphical issues.

Table 1
Physicochemical characteristics of the sparkling wines at initial point (9 months of aging).

	A aging	A storage	B aging	B storage
pH	3.02	3.02	3.02	3.03
Total sugar content (g L^{-1})	0.21	9.8	0.71	10.2
Alcohol content (% vol)	11.62	11.59	11.72	11.68
Overpressure (bar)	7.1	6.2	7.1	6.2
Titratable acidity (g L^{-1})	3.73	3.74	3.58	3.56
Citric acid (g L^{-1})	0.21	0.20	0.19	0.20
Malic acid (g L^{-1})	0.93	0.90	0.54	0.63
Lactic acid (g L^{-1})	0.57	0.49	0.53	0.42
Free sulfite (mg L^{-1})	[a]	9	[a]	8
Total sulfite (mg L^{-1})	70	118	50	100

[a] Below the limit of quantification.

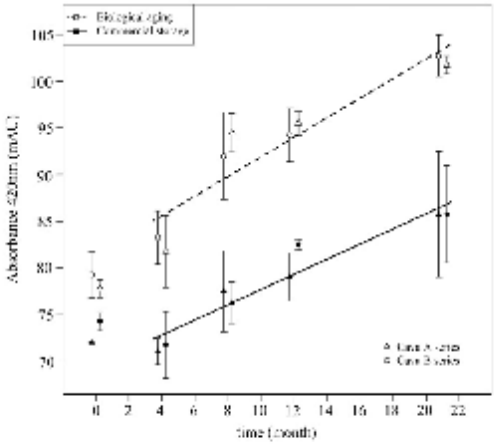


Fig. 2. Development of browning during biological aging and commercial storage, expressed as the mean and standard deviation (n = 4) of the two Cava series A and B. The fitted linear regression lines for both Cava types (biological aging and commercial storage) are all presented.

Table 2
GLM results of the development of browning (without the dosage point coded as zero) *t*-coutaric acid, *p*-coumaric acid and HMF. Browning (A_{420}), is expressed as mAU and time (*t*) in months. HMF and *p*-coumaric are expressed as mg L^{-1}, and *t*-coutaric in equivalents of *p*-coumaric.

Aging	Model	n	R^2	P
Browning				
Biological	$A_{420} = 80.81 + 1.13 \cdot t$	32	0.786	<0.05
Storage	$A_{420} = 69.08 + 0.87 \cdot t$	32	0.672	<0.05
t-Coutaric				
Biological	*t*-Coutaric = 1.50 + 0.05·*t*	40	0.690	<0.05
Storage	*t*-Coutaric = 1.26 + 0.03·*t*	40	0.688	<0.05
p-Coumaric				
Biological	*p*-Coumaric = 0.52 + 0.02·*t*	40	0.418	<0.05
Storage	*p*-Coumaric = 0.46 + 0.02·*t*	40	0.581	<0.05
5-HMF				
Biological	HMF = 0.53 + 0.04·*t*	40	0.956	<0.05
Storage	HMF = 0.41 + 0.07·*t*	40	0.962	<0.05

3. Results and discussion

3.1. Browning development

The development of browning, expressed as the absorbance at 420 nm (A_{420}), during the two types of aging (biological aging and commercial storage) was compared (Fig. 2). After 9 months of biological aging half of the bottles of Cava types A and B were opened, the lees were removed and the *liqueur d'expédition* was added (commercial storage). The others were allowed to continue the biological aging process. Thus, we compared the development of browning of the same sparkling wine (A and B) under two different processes i.e. aging with lees (biological aging) and commercial storage (Fig. 1). In both aging conditions a linear increase in browning was observed over time. No differences were found in the A_{420} formation ratio between the two Cava series (A and B) according to ANCOVA. Both series were therefore combined, however, as Fig. 2 shows, a decrease was observed during the first 4 months in the commercial wines (storage A and B). This decrease in browning during the first 4 months in the commercial storage samples (Fig. 2) may be associated with the addition of SO_2 when the *liqueur d'expédition* was added (Table 1) as this would bleach any colored compounds (Jackson & Jackson, 2008; Nonier, Vivas, de Gaulejac, Absalon, & Vitry, 2010). The bleaching effect is estimated to produce a reduction of 8 mAU, which equates to approximately 11% of the initial value. Due to this bleaching effect, the initial point (coded as time zero) was omitted when performing the regression models (Table 2) and statistical comparisons. There were not statistical differences ($P < 0.05$) found between samples from the two aging types according to ANCOVA, so a pooled model was constructed for both types resulting in the rate of browning of 1 mAU/month. The point of interception in the model differed between processes ($P < 0.05$), as shown by the different elevations of the regression slopes shown in Fig. 2. Thus, commercial wines had lower A_{420} values, probably due to the bleaching effect of SO_2. However, there was no further effect of SO_2 on browning kinetics. In the case of biological aging, the free sulfite was always below the limit of quantification (<6 mg L^{-1}), while in the commercial series it could only be quantified at the initial time point (Table 1), since by 4 months it was below the limit of quantification (<6 mg L^{-1}).

This leads to the conclusion that time is the factor with the greatest impact on the development of browning rather than the lees. Despite their capacity to absorb browning compounds (Del Barrio-Galán et al., 2011; Mazauric & Salmon, 2005; Razmkhab et al., 2002) and their ability to inhibit browning in Sherry wines (Lopez-Toledano et al., 2006) lees do not seem to be critical in inhibiting browning in Cava.

In the case of biological aging the sparkling wines of higher quality (*Reserva* and *Gran Reserva*) had higher values of A_{420}. For both aging types the increase in A_{420} after 20 months was approximately 15 mAU, i.e. 19% of the initial value. Due to the aforementioned bleaching effect, the commercial sparkling wine samples had a lower A_{420} than the biologically aged samples, and did not return to the same values as before the addition of SO_2 until approximately 8 months later.

3.2. Phenol evolution

The initial (time zero) and final (after 21 months of aging) values of total phenol content (TP) and the phenols found in the samples are shown in Table 3 to illustrate the level at these points. TP did not vary during biological or commercial aging (Table 4), which is consistent with an accelerated white wine browning test carried out by Kallithraka et al. (2009). Table 4 shows the Pearson's coefficient of correlation (*r*) between time and browning for each individual phenol for each sparkling wine (A and B) and the two types of aging (biological and commercial). Gallic acid, catechin and particularly GRP increased with time during biological aging, but tended to decrease during the commercial storage. Tartaric esterified hydroxycinnamic acids (*cis*-coutaric acid, caftaric acid and fertaric acid) tended to decrease during both types of aging, except in the case of *trans*-coutaric which increased. This could be attributed to the *cis*/*trans* isomerization (Ibern-Gómez et al., 2000). The same patterns of behavior were observed

Table 3
Phenol content at the initial (zero point) and final (21 months of aging) of all series. Total phenol is reported as mg L^{-1} of gallic acid equivalents. Phenols are expressed as mg L^{-1} using the external calibration with the standard when available; Caftaric acid and GRP are given as caffeic acid equivalents, *cis*/*trans*-coutaric acid as *p*-coumaric acid equivalents and fertaric acid as ferulic acid equivalent.

Compound	Commercial storage				Biological aging			
	Wine A		Wine B		Wine A		Wine B	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Total phenol	194.2	194.9	191.5	177.8	157.9	160.8	160.4	168.1
Gallic acid	0.89	0.85	1.06	0.89	11.41	14.80	4.90	5.45
Protocatechuic acid	4.54	5.61	1.51	1.31	16.28	17.71	16.00	18.81
Tyrosol	11.68	12.53	3.85	3.66	17.33	20.9	15.37	20.95
Caftaric acid	4.98	4.37	4.73	3.85	5.86	5.30	5.21	4.59
GRP	1.96	1.74	13.60	6.65	1.37	1.52	1.31	1.58
cis-Coutaric acid	1.00	0.66	2.13	1.05	2.83	1.91	3.65	3.06
trans-Coutaric acid	1.31	1.88	1.12	1.76	1.47	2.50	1.31	2.33
Catechin	0.44	0.44	0.48	0.37	6.99	7.36	7.75	8.34
Caffeic acid	0.72	0.91	0.59	0.76	4.91	5.11	4.39	4.76
Fertaric acid	0.97	0.86	1.22	0.99	2.68	2.07	3.38	3.42
p-Coumaric acid	0.54	0.81	0.36	0.71	0.91	1.52	0.28	0.60

GRP: grape reaction product (2-*S*-glutathionylcaftaric acid).

Table 4
Pearson's correlation (n = 10) of phenols and total phenol with time and browning (A_{420}) for each sparkling wine and type of aging.

Compound	Commercial storage				Biological aging			
	Wine A		Wine B		Wine A		Wine B	
	Time	A_{420}	Time	A_{420}	Time	A_{420}	Time	A_{420}
Total phenol	0.035	0.001	0.065	0.098	0.020	0.189	0.010	0.022
Gallic acid	−0.439	−0.468	−0.563	−0.528	**0.659**	0.583	0.207	0.134
Protocatechuic acid	**0.792**	0.506	−0.195	−0.411	**0.767**	**0.776**	**0.902**	**0.841**
Tyrosol	0.329	−0.009	0.034	0.102	**0.759**	**0.715**	**0.954**	**0.857**
Caftaric acid	**−0.621**	**−0.712**	**−0.624**	−0.366	−0.486	−0.402	−0.465	−0.552
GRP	−0.514	**−0.643**	**−0.749**	**−0.680**	0.467	0.514	**0.895**	**0.869**
cis-Coutaric acid	**−0.889**	**−0.847**	**−0.879**	**−0.746**	**−0.775**	**−0.798**	−0.524	−0.517
trans-Coutaric acid	**0.872**	**0.686**	**0.868**	**0.776**	**0.865**	**0.845**	**0.813**	**0.856**
Catechin	−0.151	−0.115	−0.370	−0.303	0.603	0.579	0.454	0.401
Caffeic acid	**0.740**	0.476	0.611	**0.653**	0.345	0.345	0.582	**0.638**
Fertaric acid	**−0.654**	**−0.659**	−0.423	−0.561	**−0.807**	**−0.774**	−0.267	−0.173
p-Coumaric acid	**0.907**	**0.711**	**0.861**	**0.810**	**0.837**	**0.821**	**0.888**	**0.780**

In bold: significant regression model ($P < 0.05$); GRP: grape reaction product (2-S-glutathionylcaftaric acid).

when the content of these phenols was related with browning. This could be due to the hydrolysis of these compounds to form their corresponding acids; *p*-coumaric, caffeic and ferulic acids (not detected) rather than the oxidation of these phenolics. Thus, *trans*-coutaric and *p*-coumaric increased significantly with time ($P < 0.05$) in all cases, and aware a significantly correlated with browning. Table 2 shows the regression model of these phenols, with series A and B combined, in each aging period.

3.3. HMF evolution

There were no differences in 5-HMF between the two sparkling wine series (A and B). However, there was a significant difference in the rate of formation between the two aging types (Fig. 3). Thus, higher levels of this furfural were produced during commercial storage than during biological aging ($P < 0.05$). The development of this furfural during the two aging processes is illustrated in Table 2. Contrary to *trans*-coutaric and *p*-coumaric, 5-HMF showed strong linearity with time, in all cases with a coefficient of determination (R^2) greater than 0.9 (Table 2), which is consistent with the results reported by Câmara, Alves, and Marques (2006) for Madeira wines. Unlike browning, 5-HMF was always formed and the percentage increase was much higher: 151% for biological aging and 282% for commercial storage. Furthermore, it showed much less variability (Figs. 2 and 3), meaning that the measurement of this parameter was more sensitive than that of A_{420}.

The addition of sugar to commercial wines during expedition could play a major role in furfural formation. Since 5-HMF is sugar dependent, furfural formation increases with sugar content (Câmara et al., 2006; Pereira et al., 2011). The sugar content in the wines aged biologically compared to those aged during commercial storage differed by more than tenfold (Table 1), which may explain the variation in the pattern of 5-HMF development.

3.4. Browning vs. 5-HMF and phenols

Multiple regression was employed to construct two models (biological and commercial aging) for predicting browning. 5-HMF, *p*-coumaric acid and *trans*-coutaric acid were selected as predictors, since these compounds evolved significantly in all the sparkling wines series (Tables 2 and 3). However, phenols were not statistically

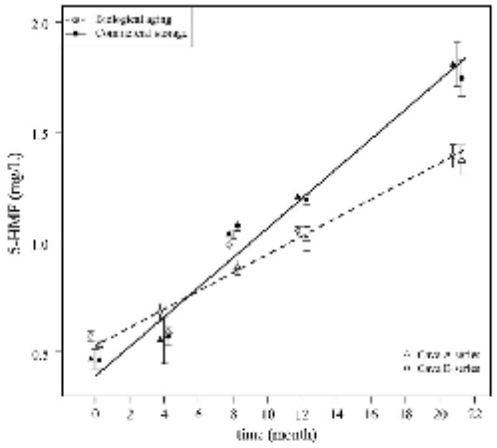


Fig. 3. Comparison of 5-HMF development during biological aging and commercial storage, expressed as the mean and standard deviation (n = 4) of the two Cava series A and B. The fitted linear regression lines for both aging types are also presented.

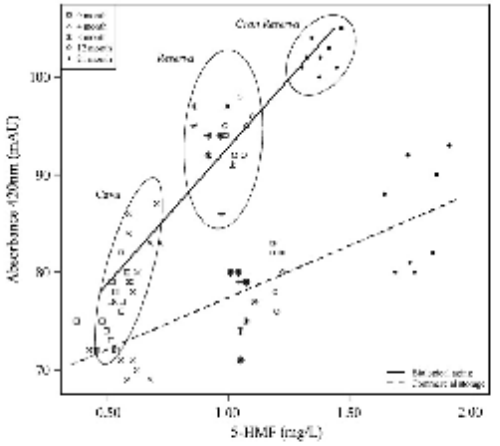


Fig. 4. Correlation between the absorbance at 420 nm and 5-HMF of the samples of Cava following biological aging and commercial storage. Sur lie samples are grouped by their quality categories (Cava, Reserva and Gran Reserva), displaying the 95% confidence region of both parameters.

significant (data not shown), and only 5-HMF was used to construct the models, which were as follows; $A_{420} = 63 + 28[5\text{-HMF}]$ for biological aging and $A_{420} = 67 + 11[5\text{-HMF}]$ for commercial storage. Fig. 4 shows the correlation between A_{420} and 5-HMF, $r = 0.936$ ($P < 0.05$) for biological aging and $r = 0.831$ ($P < 0.05$) for commercial storage. This relationship could stem from the correlation of both parameters with time (Table 2). Moreover, Fig. 4 shows that wines can be grouped by time, and in the case of biological aging, the samples can be grouped according to their quality categories. It is also apparent that 5-HMF can discriminate between quality categories better than the absorbance at 420 nm, as there is no overlap between the 95% confidence ellipses on 5-HMF axis, unlike on the A_{420} axis. Compared to A_{420}, 5-HMF content is thus a better time quality marker since it is more precise, and more sensitive than A_{420}. Furthermore it is not affected by the addition of SO_2, making it more useful than A_{420}, which is influenced by bleaching phenomena (Figs. 2 and 3). Although spectroscopic measurement is less expensive, the values of absorbance are very low and less specific, making it difficult to observe significant changes.

4. Conclusions

An increase in browning, measured as A_{420}, was observed for both biological aging and commercial storage over time. No differences were found between the kinetics of the two aging types. No variation was observed in the TP content, and although some phenolic compounds decreased (*cis*-coutaric acid, caftaric acid and fertaric acid) and others increased (*trans*-coutaric acid and *p*-coumaric acid) with aging, their impact on the browning of Cava seems to be negligible. This could indicate that compounds other than phenols may also play a role in browning. There was a correlation between 5-HMF levels, time and browning (A_{420}), making 5-HMF a viable quality marker. The measurement of 5-HMF allowed better discrimination, in the biological aging period, between quality categories, in comparison with measurement of A_{420}. 5-HMF was a more effective marker than A_{420}; however, further studies are required to verify its potential as a marker since these types of compounds are usually dependent on temperature and sugar content.

Acknowledgments

The authors are grateful to Freixenet S.A. wineries for providing the samples. This study was made possible thanks to the financial assistance provided by the *Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología* (CICYT) (Spain) AGL2011-23872, from the *Generalitat de Catalunya*, Project 2009SGR-606. The PhD student Arnau Serra-Cayuela was awarded a grant from the *Universitat de Barcelona* (UB-APIF) and the PhD student M. Ángeles Aguilera-Curiel with the grant BES-2009-027531.

References

Bosch-Fusté, J., Sartini, E., Flores-Rubio, C., Calvach, J., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2009). Viability of total phenol index value as quality marker of sparkling wines, "Cavas". *Food Chemistry, 114*(3), 782–790. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.013.

Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2003). WINES|Production of sparkling wines. In En Benjamin Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 6203–6209) (2nd ed.). Oxford: Academic Press (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122270555X012979)

Câmara, J. S., Alves, M. A., & Marques, J. C. (2006). Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. *Analytica Chimica Acta, 563*(1–2), 188–197. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.031.

Cheynier, V., Masson, G., Rigaud, J., & Moutounet, M. (1993). Estimation of must oxidation during pressing in champagne. *American Journal of Enology and Viticulture, 44*(4), 393–399.

Danilewicz, J. C., Seccombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *American Journal of Enology and Viticulture, 59*(2), 128–136.

Del Barrio-Galán, R., Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Williams, P., & Doco, T. (2011). Effect of aging on lees and of three different dry yeast derivative products on Verdejo white wine composition and sensorial characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59*(23), 12433–12442.

Es-Safi, N. -E., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). New phenolic compounds obtained by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic medium. *Tetrahedron Letters, 41*(12), 1917–1921. http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00043-5.

Gaspar, E. M. S. M., & Lucena, A. F. F. (2009). Improved HPLC methodology for food control — Furfurals and patulin as markers of quality. *Food Chemistry, 114*(4), 1576–1582. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.097.

Ibern-Gómez, M., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S., Singleton, V. L., & De la Torre-Boronat, M. C. (2000). Browning of Cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. *American Journal of Enology and Viticulture, 51*(1), 29–36.

Jackson, R., & Jackson, R. S. (2008). *Wine science, third edition: Principles and applications* (3rd ed.). Academic Press.

Kallithraka, S., Salacha, M. I., & Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry, 113*(2), 500–505. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.083.

Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry, 108*(1), 1–13. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.065.

Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (2006). Yeasts used to delay browning in white wines. *Food Chemistry, 97*(3), 498–504. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.030.

Maury, C., Clark, A. C., & Scollary, G. R. (2010). Determination of the impact of bottle colour and phenolic concentration on pigment development in white wine stored under external conditions. *Analytica Chimica Acta, 660*(1–2), 81–86. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.048.

Mazauric, J. -P., & Salmon, J. -M. (2005). Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: I. Analysis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(14), 5647–5653. http://dx.doi.org/10.1021/jf050308f.

Nonier, M. F., Vivas, N., de Gaulejac, N. V., Absalon, C., & Vitry, C. (2010). Study by LC/ESI/MSn and ESI/HR/MS of SO_2 interactions in flavanols–aldehydes nucleophilic reactions. *Food Chemistry, 122*(3), 488–494. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.029.

Nonier, M., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Planet, L., & Fouquet, E. (2007). A kinetic study of the reactions of (+)-catechin with aldehydes derived from toasted oak. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 87*(11), 2081–2091. http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2968.

Official Journal of the European Union, Commission Regulation (EC) (2009). *52 L193 § regulations.*

Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International, 44*(5), 1115–1126. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.050.

Organization International de la Vigne et du Vin (2012). *Compendium of international methods of wine and must analysis, Vol. I–II,* O.I.V.

Pereira, V., Albuquerque, F. M., Ferreira, A. C., Cacho, J., & Marques, J. C. (2011). Evolution of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (F) in fortified wines submitted to overheating conditions. *Food Research International, 44*(1), 71–76. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.011.

Rada-Mendoza, M., Sanz, M. L., Olano, A., & Villamiel, M. (2004). Formation of hydroxymethylfurfural and furosine during the storage of jams and fruit-based infant foods. *Food Chemistry, 85*(4), 605–609. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.002.

Razmkhah, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J. M., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (2002). Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(25), 7432–7437. http://dx.doi.org/10.1021/jf025733c.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdie, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006). *The microbiology of wine and vinifications* (2nd ed.). *En Handbook of enology, Vol. 1,* Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd.

Singleton, V. L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture, 38*(1), 69–77.

Singleton, V. L., & Kramlinga, T. E. (1976). Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *American Journal of Enology and Viticulture, 27*(4), 157–160.

Teixidó, E., Moyano, E., Santos, F. J., & Galceran, M. T. (2008). Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. *Journal of Chromatography. A, 1185*(1), 102–108. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.057.

Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture, 57*(3), 306–313.

Zoecklein, B. W. (1995). *Wine analysis and production.* Chapman & Hall.

M.A. Aguilera-Curiel, A. Serra-Cayuela, S. Vichi, S. Buxaderas, E. López-Tamames (2011), «Role of lees in antioxidant activity of sparkling wines during LONG-TERM SUR LIE aging», Wine Active Compounds 2011 symposium, p.121-122

1 Role of lees in antioxidant activity of sparkling wines during long-term *sur lie* aging

Mª Ángeles Aguilera-Curiel, Arnau Serra-Cayuela, Stefania Vichi, Susana Buxaderas, Elvira López-Tamames

Department of Nutrition and Bromatology, Reference Network in Food Technology (TARTA), School of Pharmacy, Av. Joan XXIII sin 08028 Barcelona, University of Barcelona, Spain

Introduction

Cava is a quality sparkling wine (Certified Brand of Origin) elaborated using a traditional method that consists of a second fermentation followed by biological ageing in contact with lees in anaerobic conditions for at least 9 months (Council Regulation (EC), 1493/1999). Long periods of aging involve improved quality, although it could mean more wine browning associated to the oxidation of phenols [1]. However, other authors believe that during this biological aging there is no browning due to the protection provided by yeast against it, as has been widely described in model wines [2] and through the evaluation of the antioxidant activity of the lees' cell surface [3]. However, there is limited data on the antioxidant capacity of sparkling wines [4], and none relating to changes throughout the aging process. Moreover, the direct effect of the lees during *sur lie* aging and how they contribute to prevention of oxidation of sparkling wines and the possible compounds involved are still unknown.

The aim of this study was to investigate stability against wine oxidation during a long-term aging and analyse the role of lees. Two approaches have been employed. The first approach consisted in evaluating changes in antioxidant activity in two *Cava* series (n = 50), *sur lie* aged over the course of more than 30 months. The second approach used was to compare the oxidation-related parameters between two *Cava* series (n = 80), with and without lees, stored for 48 months (14-16°C). All samples were obtained in the same way on an industrial scale and in real time conditions.

Materials and methods

Reagents and standards

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hidroxyl-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxylic acid (TROLOX), 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-5-triazine) (TPTZ), Iron (III) chloride hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), Methanol (HPLC grade), Sodium acetate thihydrate were obtained from Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). Folin-Ciocalteau's Reagent, Sodium carbonate anhydrous, Hydrochloric acid (0.1 mol/L), Acetic acid glacial (HPLC grade) from Panreac (Barcelona, Spain).

Wine Samples

The study was carried out using two different coupages of sparkling wines (A and B), which were periodically collected at the times of *sur lie*: 0, 1, 3, 6, 9, 13, 18, 21, 30 and 48 months. Sampling points corresponded to the aging periods of *Cava* sparkling wine categories: *Cava* (>9 months), Reserve (>18 months) and Grand Reserve (>30 months) (Official Gazette of the Government no. 50, February 2007). In addition, these two series of *Cava* at 9 months underwent riddling, lees were removed and expedition liqueur was added. The resulting two series of *Cava* were stored under 3 different conditions (refrigerator at 8°C, in the cellar at 14°C and at room temperature 22°C) and subsequently collected at 4, 9, 12, 21 and 39 months.

Methods

The antiradical activity of *cavas* was determined using the DPPH free radical method [5] modified as follows. A stock solution of DPPH was prepared by diluting 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl in free radical form in a mix (60:40) of methanol:acetate buffer (pH 5.5, 0.1 M) and the reaction was carried out in a microplate. FRAP was used to measure the reductive power of a sample [6]. Trolox was employed as the standard in both methods and the results were expressed as µM Trolox equivalents/µL *cava*.

All determinations were carried out in triplicate. Total poliphenols were determined by reac-

tion with Folin-Ciocalteau reagent, and were expressed as mg/L of gallic acid, method adopted from [7]. The Total phenol index (TPI) was measured at 280 nm, Hydroxycinnamates was measured at 320 nm and the Browning index at 420 nm. All measurements were performed using a Shimadzu UV-3600 spectrophotometer (Duisburg, Germany).

Results and discussion

The antioxidant activity of Cava sparkling wine did not change significantly during the surlie aging, or by FRAP, DPPH, or by Folin method. However, the absorbance at 420 nm increased, indicating that compounds other than phenolics were involved in the browning; these compounds were probably sugars, as indicated by [8].

Over the course of 30 months of aging, the antioxidant activities of sparkling wine, *surlie*, as determined by FRAP (**Figure 1**) and by the Folin method, decreased significantly ($p < 0.0177$ and $p < 0.0182$, respectively).

When comparing the samples with and without lees, it appears that the antioxidant activity of commercial samples was higher (**Table 1**). This could be due to the sulfite added with the expedition liquor. However, no significant difference was observed in terms of browning.

Regarding antioxidant activities during Cava storage under 3 different conditions: the wines decreased their antioxidant activity as determined by FRAP ($p < 0.0244$) and Folin ($p < 0.0019$), especially at cellar and at room temperatures in the early months of storage (**Figure 2**). Furthermore, the browning increased more markedly in storage in the latter two conditions, while it did not significantly changed in the refrigerator. ■

Table 1: Antioxidant activities of sparkling wines. Comparison of samples with and without lees.

Sparkling wines	Folin*	FRAP*	DPPH*	Abs 280 nm	Abs 320 nm	Abs 420 nm
Commercial n = 60	172	35.99	1.33	5.32	3.15	0.074
Surlie n = 80	140	29.03	1.59	5.47	2.75	0.077

*Denotes significant differences at 0.001

Figure 1: Box and Whisker Chart of FRAP results during aging (30 months) of surlie sparkling wine

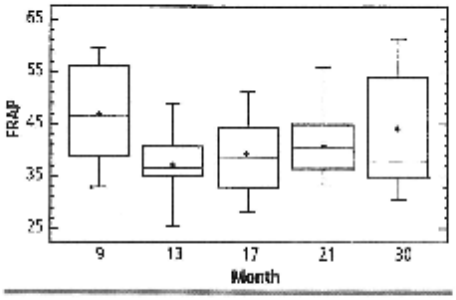
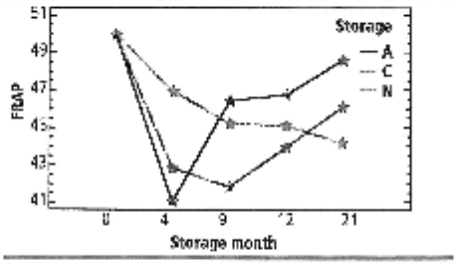


Figure 2: Antioxidant activity by FRAP method during storage in the refrigerator N, in the cellar C and at room temperature A



References

1. Bartowsky, E (2005) Oenococcus oeni and malolactic fermentation - moving into the molecular arena. Australian Journal of Grape and Wine Research 11: 174-187.

2. Bartowsky, E., Costello, P., McCarthy, J. (2008). MLF - adding an 'extra dimension' to wine flavour and quality. Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker (533a): 60-65.

3. Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J. and Ferreira, V. (2007) Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 4501-4510.

4. Krieger, S.A., Lemperle, E. and Ernst, M. (2000) Management of malolactic fermentation with regard to flavor modification in wine. Proceedings of 5th International Symposium on Cool Climate Viticulture and Oenology, Melbourne, Australia.

5. Pineau, B., Barbe, J.C., Van Leeuwen, C. and Dubourdieu, D. (2009) Examples of Perceptive Interactions Involved in Specific "Red-" and "Black-berry" Aromas in Red Wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 3702-3708.

6. Ribéreau-Gayon, J., Dubourdieu, D., Donèche, B. and Lonvaud, A. (2006) Lactic Acid Bacteria. In: Handbook of Enology: The microbiology of wine and vinifications. Eds J. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche and A. Lonvaud (John Wiley & Sons, Ltd): pp. 115-181.

7. Siebert, T.E., Smythe, H.E., Capone, D.L., Neuwöhner, C., Pardon, K.H., Skouroumounis, G.K., Herderich, M.J., Sefton, M.A. and Pollnitz, A.P. (2005) Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS = SPME-GC-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry 381, 937-947.

8. Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. and Pretorius, I.S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Australian Journal of Grape and Wine Research 11: 139-173. ■

ROLE OF LEES IN ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SPARKLING WINES DURING LONG-TERM *SUR LIE* AGING

Mª Ángeles AGUILERA-CURIEL, Arnau SERRA-CAYUELA, Stefania VICHI, Susana BUXADERAS, Elvira LÓPEZ-TAMAMES

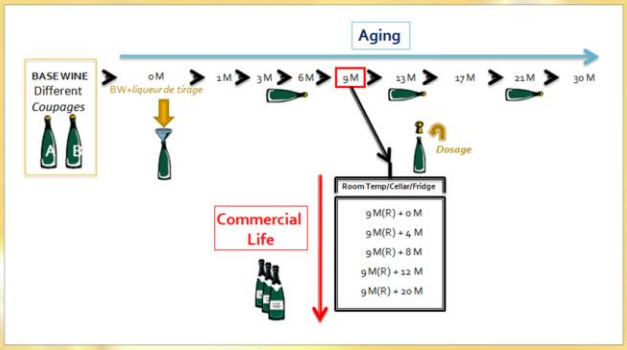
Department of Nutrition and Food Science, Reference Network in Food Technology (XaRTA), School of Pharmacy, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, University of Barcelona, Spain

Cava is a quality sparkling wine (Certified Brand of Origin) elaborated using a traditional method that consists of a second fermentation followed by biological ageing in contact with lees in anaerobic conditions for at least 9 months (Council Regulation (EC), 1493/1999).

Long periods of aging involve improved quality, although it could mean more wine browning associated to the oxidation of phenols [1]. However, it has been widely described in model wines there is no browning due to the protection provided by yeast against it [2], and through the decrease of the antioxidant activity of the lees' cell surface along aging [3]. However, there is limited data on the antioxidant capacity of sparkling wines [4], and how lees contribute to prevention of oxidation of sparkling wines and the possible compounds involved are still unknown.

The aim of this study was to investigate stability against wine oxidation during a long-term aging and commercial life, and analyze the role of lees.

SAMPLING



ANALYTICAL METHODS

Folin-Ciocalteau: spectroscopic determination by Folin-Ciocalteau reagent and absorbance at 765 nm. Results were expressed as ppm of Gallic Acid Equivalents.

FRAP [6]: measured the reductive power of a sample by the reduction of complex TPTZ-Fe^{3+} to TPTZ- Fe^{2+} and absorbance at 593 nm (intense blue). Results were expressed as ppm of Trolox Equivalents.

DPPH [5]: measured the antioxidant capacity by acceptance of hydrogen by DPPH• radical (intense violet) from antioxidants and determination of absorbance at 517 nm (disappearance of violet colour). Results were expressed as µL cava/ppm Trolox.

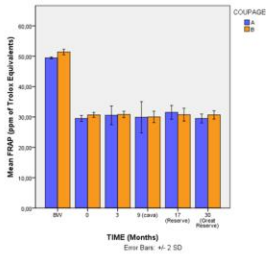
Total Polyphenol Index: measured at 280 nm and expressed as Arbitrary Units.

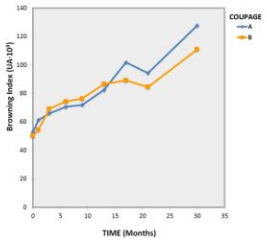
Hidroxycinammic acids: measured at 320 nm and expressed as Arbitrary Units.

Browning Index: measured at 420 nm and expressed as arbitrary Units (A.U.·10^3).

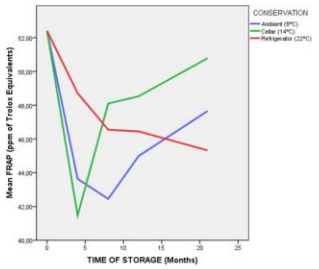
RESULTS AND DISCUSSION

The antioxidant activity of *Cava* sparkling wine did not change significantly during the *sur lie* aging, or by FRAP,DPPH, or by Folin method. However, the absorbance at 420 nm increased proportionally over time of aging, indicating that compounds others than phenolics were involved in the browning; these compounds were probably sugars, as indicated by Bosch-Fusté *et al.* 2009 [7].





Over the course of 39 months of storage, the antioxidant activities of commercial sparkling wine, without lees, as determined by FRAP and by the Folin method, decreased significantly ($p<0.0177$ and $p<0.0182$, respectively), especially at cellar and at room temperatures in the early months of storage. Furthermore, the browning increased more markedly in storage in the latter two conditions, whereas it did not significantly change in the refrigerator.



Comparing mean values for antioxidant capacity (Folin, FRAP and DPPH) of commercial and *Sur lie* sparkling wines, it appears that values for commercial wines were higher, but this may be due to the sulfite added with the expedition liquor. However, no significant differences were observed in terms of browning.

SPARKLING WINE	FOLIN*	FRAP*	DPPH*	ABS 280 nm	ABS 320 nm	ABS 420 nm
Commercial (n=60)	172	35.99	1.33	5.32	3.15	74
Sur lie (n=80)	140	29.03	1.69	5.47	2.75	77

*Denotes significant differences at 0.001

CONCLUSION

Lees may possess a buffer action in the antioxidant capacity of cava (measured as FRAP values). Whereas antioxidant capacity remains constant in sparkling wine *Sur lie* during time, it descends in the wine without lees (commercial sparkling wine), mainly in the first four months and stored at temperature above 14-16ºC.

REFERENCES

1. M. Ibern-Gomez, C. Andres-Lacueva, R. M. Lamuela-Raventos, S. Buxaderas, V. L. Singleton, and M. C. de la Torre-Boronat. Am. J. Enol. Vitic. 51 (1) (2000) 29-36.
2. Salmon J. LWT - Food Science and Technology. 39(9) (2006) 959-965.
3. J. J. Gallardo-Chacón, S. Vichi, P. Urpí, E. López-Tamames, and S. Buxaderas. Int. J. Food Microbiol. 143(1-2) (2010) 48-53.
4. C.A. Stefenon, M. Colombo, C. de M. Bonesi, V. Marzarotto, R. Vanderlinde, M. Salvador, J.A.P. Henriques. Food Chemistry. 119(1) (2010) 12-18.
5. P. Molyneux, J. Sci. Technol., 26 (2) (2004) 211-219
6. I.F.F. Benzie and J.J. Strain. Anal. Biochem. 239 (292) (1996) 70–76.
7. Bosch-Fusté, E. Sartini, C. Flores-Rubio, J. Caixach, E. López-Tamames, S. Buxaderas. Food Chem. 114 (3) (2009) 782-790.

Aknowledgements:
We are grateful to Freixenet S.A. Wineries for providing samples. This study was made possible thanks to financial assistance from CICyT AGL 2008-03392/ALI, the *Generalitat de Catalunya* project 2009 SGR606, and the *Ministerio de Ciencia e Innovación* throught a grant to the PhD student M. Ángeles Aguilera Curiel.

R. Tudela, M.A. Aguilera-Curiel, M. Riu-Aumatell, S. Buxaderas, E. López-Tamames, (2013) «Evaluación de la autólisis de las levaduras durante el envejecimiento del cava», 1ª Jornada de recerca en Viticultura i Enologia a Catalunya, p.39.

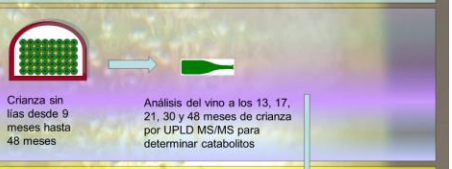
Evaluación de la autólisis de las levaduras durante el envejecimiento del cava

Tudela, R.; Aguilera-Curiel, M.A.; Riu-Aumatell, M.; Buxaderas, S.; López-Tamames, E
Departament de Nutrició i Bromatologia. Facultat de Farmacia. Universitat de Barcelona Av. Prat de la Riba, 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

El cava es un vino espumoso de calidad elaborado mediante el método tradicional, que envejece en contacto con las lías durante un mínimo de 9 meses. El objetivo de este trabajo es profundizar en el conocimiento de la crianza del cava en contacto con las lías de la segunda fermentación, tanto en aspectos morfológicos y ultra-estructurales de las lías, como en la evolución con el tiempo de crianza de componentes del cava con posible relación con la autolisis. Para alcanzar el objetivo se han analizado las lías y el vino en distintos puntos de muestreo de tres series de cava elaborados en las Bodegas Freixenet. Estas tres series de cava se diferencian en el tipo de vino base, pero la segunda fermentación siempre se ha utilizado la misma cepa de levadura.

MUESTREO:



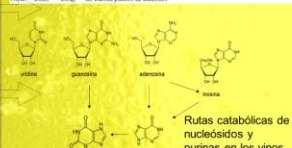
RESULTADOS

Se ha analizado el contenido en el cava de siete catabolitos de ARN, adenosina, guanosina, inosina, uridina, hipoxantina, xantina, y ácido urico utilizando la técnica UHPLC-MS/MS

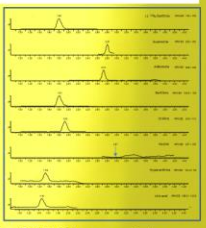
Tabla 1. Evolución del contenido de catabolitos del Cava durante el envejecimiento con lías (mg/L). Diferentes letras indican diferencias significativas por ANOVA

Catabolitos	serie	0 meses	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	13 meses	17 meses	21 meses	30 meses	39 meses	48 meses
Adenosina	A	^{1}~0.01^{a}	~0.01^{a}	^{2}~0.02^{a}	0.17^{b} ± 0.01	0.09^{c} ± 0.01	0.15^{b} ± 0.01	0.16^{b} ± 0.01	0.05^{d} ± 0.01	0.07^{cd} ± 0.01	-	0.03^{d} ± 0.01
	B	~0.01^{a}	~0.01^{a}	~0.02^{a}	0.09^{b} ± 0.01	0.05^{bd} ± 0.01	0.09^{b} ± 0.01	0.12^{b} ± 0.01	0.05^{d} ± 0.01	0.07^{cd} ± 0.01	-	0.04^{d} ± 0.01
	C	~0.01^{a}	~0.01^{a}	~0.01^{a}	0.02^{b} ± 0.01	0.14^{c} ± 0.01	0.09^{d} ± 0.01	-	0.14^{c} ± 0.01	-	0.06^{b} ± 0.01	-
Guanosina	A	^{1}~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	0.36^{c} ± 0.04	0.27^{b} ± 0.03	0.27^{b} ± 0.03	0.34^{bc} ± 0.03	0.24^{b} ± 0.02	~0.06^{a}	-	~0.06^{a}
	B	~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	^{2}~0.18^{b}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	-	~0.06^{a}
	C	~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	0.20^{c} ± 0.01	-	~0.11^{b}	-	~0.06^{a}	-
Uridina	A	18.96^{ab} ± 0.51	20.36^{b} ± 0.55	17.72^{a} ± 0.48	20.67^{b} ± 0.54	21.74^{c} ± 0.59	20.37^{bc} ± 0.55	25.12^{d} ± 0.68	24.92^{d} ± 0.67	26.62^{de} ± 0.72	-	28.38^{e} ± 0.77
	B	10.01^{a} ± 0.29	10.51^{a} ± 0.28	13.26^{b} ± 0.36	13.36^{b} ± 0.36	13.45^{b} ± 0.36	14.23^{bc} ± 0.38	15.53^{de} ± 0.42	14.73^{cd} ± 0.40	15.96^{e} ± 0.43	-	10.07^{a} ± 0.49
	C	15.46^{b} ± 0.42	16.17^{b} ± 0.44	16.60^{b} ± 0.45	18.39^{c} ± 0.50	16.11^{b} ± 0.43	19.33^{cd} ± 0.52	-	19.11^{c} ± 0.52	-	22.39^{e} ± 0.60	-
Hipoxantina	A	^{2}~0.44^{a}	~0.44^{a}	0.66^{c} ± 0.06	1.05^{e} ± 0.10	0.90^{d} ± 0.09	0.82^{cd} ± 0.08	0.81^{cd} ± 0.08	0.53^{bc} ± 0.05	0.45^{b} ± 0.04	-	0.95^{d} ± 0.09
	B	0.54^{b} ± 0.05	0.97^{d} ± 0.09	1.28^{fg} ± 0.12	1.06^{ef} ± 0.09	1.14^{fg} ± 0.11	1.03^{ef} ± 0.10	1.19^{fg} ± 0.11	1.43^{g} ± 0.13	1.30^{g} ± 0.12	-	1.07^{ef} ± 0.10
	C	~0.64^{a}	1.76^{b} ± 0.16	1.86^{b} ± 0.17	1.74^{b-d} ± 0.16	1.84^{bc} ± 0.17	1.86^{b} ± 0.16	-	1.62^{a} ± 0.15	-	1.85^{b} ± 0.17	-
Xantina	A	8.31^{b} ± 0.26	9.86^{cd} ± 0.32	9.36^{c} ± 0.30	9.72^{cd} ± 0.31	9.82^{cd} ± 0.31	9.59^{cd} ± 0.31	9.47^{cd} ± 0.30	9.05^{bc} ± 0.32	10.20^{d} ± 0.33	-	10.06^{cd} ± 0.32
	B	10.19^{ab} ± 0.33	10.29^{a} ± 0.33	11.72^{cd} ± 0.37	11.27^{b-d} ± 0.36	11.31^{b-d} ± 0.36	11.25^{b-d} ± 0.36	11.22^{b-d} ± 0.36	1.87^{a-d} ± 0.35	11.78^{d} ± 0.38	-	10.86^{a-d} ± 0.35
	C	9.54^{b} ± 0.31	10.56^{b} ± 0.34	10.16^{abc} ± 0.32	10.15^{abc} ± 0.32	10.85^{c} ± 0.35	10.70^{bc} ± 0.34	-	9.93^{ab} ± 0.32	-	10.88^{c} ± 0.35	-
Ácido úrico	A	0.74^{a} ± 0.07	0.77^{ab} ± 0.08	1.17^{c} ± 0.12	1.31^{c} ± 0.13	1.02^{c} ± 0.10	0.77^{ab} ± 0.08	0.75^{a} ± 0.07	0.93^{ab} ± 0.09	0.78^{ab} ± 0.08	-	0.88^{ab} ± 0.09
	B	0.65^{a} ± 0.06	0.92^{c} ± 0.09	0.83^{b} ± 0.08	0.64^{ab} ± 0.06	0.73^{c} ± 0.07	0.86^{d} ± 0.08	0.76^{bc} ± 0.07	0.84^{d} ± 0.08	0.81^{d} ± 0.08	-	0.82^{d} ± 0.08
	C	0.44^{a} ± 0.04	0.48^{a} ± 0.04	^{2}~0.36^{b}	0.51^{c} ± 0.05	0.49^{bc} ± 0.05	0.47^{bc} ± 0.05	-	0.49^{bc} ± 0.05	-	0.47^{c} ± 0.04	-

Nota: ^{1}=LOD; ^{2}=LOQ; ~ no entren puntos de muestreo



Rutas catabólicas de nucleósidos y purinas en los vinos espumosos, de acuerdo con la degradación celular observada con TEM.

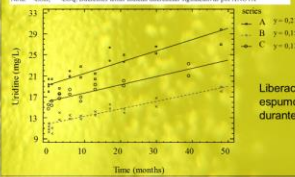


Perfil MRM correspondiente a quantifier transition de adenosina, guanosina, inosina, uridina, hipoxantina, xantina, y ácido úrico encontrado en las muestras de cava.

Tabla 2. Evolución del contenido de catabolitos del Cava durante el envejecimiento sin lías (mg/L)

Catabolitos	serie	13 meses	17 meses	21 meses	30 meses	48 meses
Adenosina	Ac	^{1}~0.01^{a}	~0.01^{a}	~0.01^{a}	~0.01^{a}	~0.01^{a}
	Bc	^{2}~0.02^{a}	~0.02^{a}	~0.02^{a}	~0.02^{a}	~0.02^{a}
Guanosina	Ac	^{1}~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}
	Bc	~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}	~0.06^{a}
Uridina	Ac	22.06^{a} ± 0.60	22.17^{a} ± 0.60	22.66^{a} ± 0.61	23.20^{a} ± 0.63	23.28^{a} ± 0.63
	Bc	14.12^{a} ± 0.38	14.07^{a} ± 0.38	14.95^{a} ± 0.40	15.20^{a} ± 0.41	15.04^{a} ± 0.41
Hipoxantina	Ac	^{2}~0.44	~0.44	~0.44	~0.44	~0.44
	Bc	1.01^{a} ± 0.09	1.05^{a} ± 0.10	1.12^{a} ± 0.10	1.07^{a} ± 0.10	1.17^{a} ± 0.11
Xantina	Ac	10.30^{b} ± 0.33	10.00^{b} ± 0.32	10.02^{b} ± 0.32	9.74^{b} ± 0.31	9.80^{b} ± 0.31
	Bc	10.54^{ab} ± 0.34	10.16^{a} ± 0.33	11.65^{a} ± 0.37	11.35^{a} ± 0.36	11.05^{a} ± 0.35
Ácido úrico	Ac	0.62^{a} ± 0.06	0.82^{a} ± 0.08	0.71^{ab} ± 0.07	0.70^{ab} ± 0.07	0.77^{ab} ± 0.08
	Bc	0.74^{a} ± 0.07	0.68^{a} ± 0.07	0.81^{a} ± 0.08	0.76^{a} ± 0.08	0.83^{a} ± 0.08

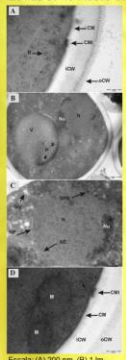
Nota: ^{1}=LOD; ^{2}=LOQ. Diferentes letras indican diferencias significativas por ANOVA



Liberación de la uridina en el vino espumoso (Cava series A, B, and C) durante el envejecimiento *sur lie*.

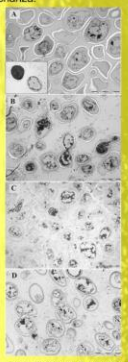
RESULTADOS

Se han identificado los cambios ultraestructurales de las levaduras utilizando la técnica de criofijación "Highpressure Freezing" en combinación con microscopía electrónica de transmisión (TEM) desde las levaduras del pie de cuba hasta las lías de 48 meses de crianza.



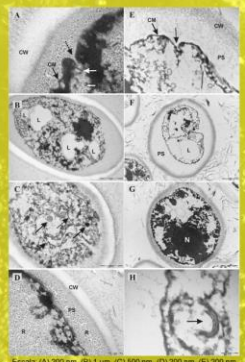
Escala: (A) 200 nm, (B) 1 lm, (C) 500 nm, and (D) 200 nm.

Las micrografías muestran la ultraestructura de la cepa de *S. cerevisiae* utilizada en este estudio antes de ser inoculadas en la botella de cava. En la imagen A se puede observar con detalle la pared celular formada por una capa interna amorfa, transparente a los electrones (iCW), y una capa electro-densa (oCW) formada por material microbrilar compuesto fundamentalmente de manoproteínas.



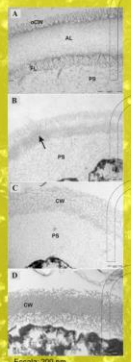
Escala: (A–D) 5 µm; (A, inferior) 2 µm.

La visión a bajo aumento de secciones ultrafinas permite obtener una imagen global de las lías de 9 meses (A), 18 meses (B), 30 meses (C), y 48 meses (D) de envejecimiento. Todas las células están plamolizadas aunque a los 9 meses se pueden encontrar algunas que no (inserto en la figura A)



Escala: (A) 200 nm, (B) 1 µm, (C) 500 nm, (D) 200 nm, (E) 200 nm, (F) 1 µm, (G) 1 µm, (H) 100 nm.

Las secciones de ultrafinos de lías de *Saccharomyces cerevisiae* muestran diferentes estadios de autólisis a los 9 meses (A-D) y a los 48 meses (E-H) de crianza. La autolisis se acompaña por una gran pérdida y desorganización de los contenidos intracelulares. La membrana celular se invagina y llega a romperse aunque conserva la doble capa (Fig A y E). Fragmentos de doble membrana de la membrana plasmática o de orgánulos como las mitocondrias, el núcleo, o autofagosomas se observan en el citoplasma de la célula (Fig. C, flecha discontinua). Gotas de lípidos se pueden observar en las lías de 9 meses (Fig. B) y a los 48 meses (Fig. F). La degradación del contenido citoplasmático se observa a los 9 meses en forma de vesículas de diferente material (Fig. C, flechas sólidas) y hay presencia de ribosomas (R) en el espacio periplásmico (Fig. D). Sin embargo, se puede observar el núcleo y las mitocondrias en algunas células 48 meses (Fig. G). En la figura H se muestra algunos orgánulos de doble membrana, pero debido al proceso de degradación no es posible discernir si pertenecieran al sistema de Golgi y o al reticulo endoplasmático.



Escala: 200 nm.

Estas micrografías confirman que la pared celular de las levaduras no se rompe a lo largo de la crianza, 9 meses (A), 18 meses (B), 30 meses (C), y 48 meses (D) A los 9 meses, la completa separación de la membrana plasmática permite observar que la capa interna de la pared celular (iCW) está compuesta de dos capas diferentes: una capa microfibrilar (FL) y otra amorfa (AL).A los 18 meses el material microfibroso aparece más difuso y la zona media se va degradando (Figura B flecha) De los 30 meses en adelante la pared consiste en una estructura enmarañada de fibras electro-densas.

Abreviaturas: CM, mebrana celular; CMI, invaginaciones de la membrana celular; CW, pared celular; iCW, pared celular interna; oCW, pared celular externa; cyt, citosol; Gly, gránulo de glicogeno; L, lipid droplet; M, mitocondria; N, nucleo; NE, envoltura nuclear; NP, poro nuclear; Nu, nucleolo; P, peroxisome; Po, polifosfato; PS, espacio periplásmico; R,ribosoma; SPB, spindle pole body; V, vacuola; ve, vesicula.

CONCLUSIONES

•La estructura estratificada de la pared celular desaparece a lo largo del tiempo. La zona media amorfa del interior de la pared se va degradando a partir de los 18 meses de crianza y el material microfibroso aparece mas difuso. A partir de los 30 meses en adelante la pared de la célula consiste en una estructura enmarañada de fibras, aunque se mantiene sin roturas a lo largo de los 48 meses de crianza. Sin embargo, sí se observaron roturas en la membrana plasmática.
•Debido a la autólisis las lías presentan una gran pérdida y desorganización de los contenidos intracelulares que aumenta a lo largo del envejecimiento.

•La Uridina es el nucleósido principal en el cava y su contenido aumenta significativamente a lo largo del envejecimiento.
• La xantina parece ser la purina más abundante y probablemente estos catabolitos sean de origen fermentativo.
• En la crianza sin lías las cantidades de catabolitos no aumentan con el tiempo. Estos productos de degradación podrían ser liberados al vino espumoso debido a la degradación de la pared celular, y las roturas de la membrana plasmática que se producen durante la autólisis de la levadura.

BIBLIOGRAFÍA

"Ultrastructural changes of sparkling wine lees during long-term aging in real enological conditions". Tudela R, Gallardo-Chacón JJ, Rius N, López-Tamames E, Buxaderas S. (2012) *FEMS Yeast Research*, 12:466-76.

"Changes in RNA catabolites of sparkling wines during the biological ageing", Tudela R, Riu-Aumatell M, Castellari M, Buxaderas S, López-Tamames E. (2013) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Ciencia y Tecnología, proyectos AGL2008-03392 y AGL2011-03392, por la Generalitat de Catalunya,proyecto SGR2009-606, y por XaRTA (Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments; ajuts de valorització de la recerca). A bodegas Freixenet S.A. por las muestras.

M. Riu-Aumatell, R. Tudela, M.A. Aguilera-Curiel, S. Buxaderas, E. López-Tamames, (2015) «Sparkling wine lees: antioxidant and biological effect », 33rd International Cava Congress, Sant Sadurní d'Anoia, (Barcelona), p.33-36.

Sparkling wine lees : antioxidant and biological effect

Montserrat Riu-Aumatell*, Rebeca Tudela, M. Ángeles Aguilera-Curiel, Susana Buxaderas and Elvira López-Tamames

Departament de Nutrició i Bromatologia, Universitat de Barcelona, Campus de l'Alimentació de Torribera, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

Abstract: Cava (Spanish sparkling wine) is elaborated by the traditional method that consists in second fermentation of a base wine by the addition of sugars, yeast and fermentation coadjuvants. Once the second fermentation was finished the wine is aged in contact with lees by a period longer than 9 months. The lees removed of each cava bottle are used actually for distillation and represents approximately 200 tones every year. The aim of the present work is the characterization the yeast lees in order to depth in the knowledge of the autolysis process and suggest a possible reuse of the cava lees. The work was focused by three different approaches: morphological characterization by microscopy techniques, evolution of the autolysis by hyphenated techniques as UHPLC-MS/MS, and chemical characterization of the antioxidant capacity of the cava lees. The results showed as the yeast lees are disorganized during autolysis but the cell wall remains unbroken. This disorganization contributes to the exchange between cava lees and wine which contributes to the particular characteristics of final product. Also, a possible marker of autolysis, uridine was determined. Finally, the characterization of lees showed as its antioxidant capacity could be attributed to cell wall and particularly at protein fraction.

Keywords: yeast lees, antioxidant activity, bioactive compounds, sparkling wine, by-products

Introduction

The elaboration of Cava is performed by the traditional method in which a second fermentation is followed by an ageing time in contact with the lees. During this period of minimum 9 months for these Spanish sparkling wines, some compounds as proteins, lipids, amino acids could be released from yeast lees to wine providing the particular bouquet of aged wine.

Lees are defined as the residues formed at the bottom of receptacles containing wine, after fermentation, during storage or after authorized treatments, as well as the residue obtained following the filtration or centrifugation of this product. Lees are mainly composed of microorganisms (mainly yeasts), tartaric acid, inorganic matter, and phenolic compounds (Teixeira *et al.*, 2014). Yeast lees are composed mainly by a cell wall (25-50 % of the cell volume) and the main macromolecules identified are mannoproteins, β-glucans and chitin. β-glucans forms an elastic microfibrillar polysaccharide skeleton in the inner part of the cell wall where the mannoproteins anchor to form the outermost layer (Gallardo-Chacón *et al.*, 2009).

The role of lees during winemaking is double for one hand, adsorb some compounds related with the quality of cava as off-flavors as volatile phenols and bioactive compounds as polyphenols or volatile compounds and for the other hand, release some enzymes or other compounds to the medium (Teixeira *et al.*, 2014; Vichi *et al.*, 2010). The wastes generated each year by the oenology industry is a problem for the environment, but its low nutritional value make unsuitable for to be used as a supplement in animal feed (Devesa-Rey *et al.*, 2011). Actually, the 200 tones of cava lees produced every year are distilled for alcohol.

The aim of the work is to evaluate some characteristics of wine lees in order to clarify the autolysis and suggest a possible reuse as ingredient or supplement of natural origin. The possible antioxidant capacity of yeast lees suggests its possible reuse as bioactive component. The yeast lees could be a possible source of bioactive compounds as β-glucans or glutathione. In this sense our research group identified some catabolites of RNA from yeast lees and its role on the named autolysis period. Firstly, the structural morphology of plasmolyzed cells was evaluated.

*Corresponding author: montserin@ub.edu

Material and methods

Samples: the samples used are *Saccharomyces cerevisiae* strain F11 belonged to the private collection of Freixenet winery S.A.

Transmission Electron Microscopy (TEM): yeast pellets were transfered to a depth planchettes, then cryoimmovilized. After several acetone rinses samples were infiltrated in resin and polymerized at 60°C. Ultrathin sections were obtained and observed in electron microscope (JEM-10101).

Fractionation: the samples were disrupted mechanically, in a ball mill and the cell wall was obtained by centrifugation. The sediments were washed previously to the chemical analysis application. Afterwards, cell wall was fractionated in order to obtain 4 fractions: F1 with hot water, F2 with protease treatment, F3 with lipase treatment and the remaining sediment was called F4.

The methods used in order to evaluate the antioxidant capacity of yeast lees are determined by **ET-methods** as total phenols assay by Folin-Ciocalteau reagent, Ferric Ion reducing antioxidant power assay (FRAP) and 2,2-diphenylpicrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH).

The characterization of yeast lees was obtained by: total polysaccharides (phenol-sulphuric method), protein determination (Bradford method), thiol content (DTDP method) and Aminoacid determination (Ninhydrin method). (Doi *et al.*, 1981).

Catabolites determination: RNA catabolites were determined by UHPLC-MS/MS with an Acquity Ultra-Performance Liquid chromatography system equipped by a binary pump system and photodiode array detector (DAD), ZSpray electrospray and triple quadrupole detector. Catabolites were quantified by calibration curves (Tudela *et al.*, 2013).

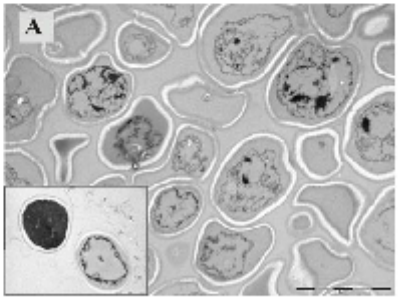


Figure 1. View of ultrathin sections of sparkling wine lees of 9 months of ageing.

Results and discussion

In Figure 1, it could be observed the global image of yeast lees of 9 months of ageing obtained by TEM. It could be observed as most of the cells are plasmolyzed although some of them could remain entire. During *sur lie* ageing the lees suffer cytoplasmic degradation and disorganization of the organelles. This process called autolysis is a slow process associated of cell death that involves intracellular enzymes and the release of some compounds to the wine. The amorphous middle of the inside of the wall is degraded after 18 months of aging and the microfibrous material appears more diffuse (data not show). From 30 months onwards the cell wall consists of a tangled fiber structure, but remains unbroken throughout the 48 months of aging (Tudela, *et al.*, 2013). However, other cracks were observed in the plasma membrane.

As a result of the autolysis process, some catabolites of RNA degradation could be identified and quantified in Cava (Spanish sparkling wine). Adenosine, guanosine, inosine, uridine, hypoxanthine, xanthine and uric acid were determined by UHPLC-MS/MS during 4 years of ageing time.

The main nucleoside quantified is uridine and its content increase lineally when lees are present while when lees are removed the nucleosides remain unchanged. Uridine is proposed as autolysis marker due to the lineal relation with ageing time.

The development of soft ionization techniques as UHPLC-MS/MS facilitates de detection of some minor compounds in wine and is a promising technique for to continue deepening in the knowledge of the autolysis.

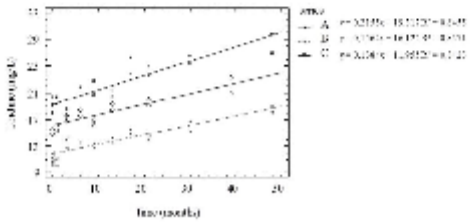


Figure 2. Uridine release of sparkling wine of different cava series during ageing time (source Tudela *et al.*, 2013).

Table 1. Mean values of composition of yeast lees. (WY: whole yeast, YCW: yeast cell wall).

	WY	YCW
Thiol groups (mg Glu –eq/g)	0.40	0.81
% amino acid	0.05	
% proteins	8.5	9.3
% sugars	72.3	74.6

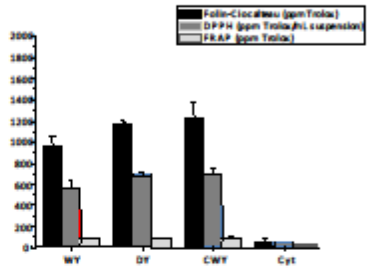


Figure 3. Mean values (ppm of Trolox) of antioxidant capacity of lees.

Finally, the possible reuse of yeast lees in order to increase its value was proposed and so, the characterization of yeast cells was performed. The first topic of interest is to analyze were resides the antioxidant capacity of lees and to assess which compounds are responsible of this antioxidant capacity. The yeast cells were disrupted in order to obtain different fractions whole yeast, disrupted yeast, yeast cell walls and supernatant. The results suggest that antioxidant capacity is located in the cell wall probably due to the emptying of the cell inner during autolysis and the lack of antioxidant substances thereof (Figure 3).

There aren't significant differences in characterization between whole yeast and cell wall but there is significant differences in thiol groups that can be explained by the better accessibility to the reactant groups when cells are disrupted (Table 1). The values of antioxidant capacity (Figure 3) were lower of that found in the literature. In order to explain this fact possible polyphenols compounds were extracted from washed lees and analyzed, not being obtained. Thereby, these lower values can be explained by the absence of polyphenols retained on the lees which are responsible for most of FRAP antioxidant activity, and also greatly in DPPH antioxidant activity (Güngör *et al.*, 2011).

When the characterization of cell walls was performed the content in polysaccharides of lees is approximately 75 %, which agree with the literature, and the amount of protein is 9.3 %, below to quote in the literature (15 %) (Table 2).

Once the antioxidant of yeast lees was performed is attributed to cell wall a fraction process was performed in order to attribute which compounds are responsible of the antioxidant capacity (Table 3).

The first fraction, obtained with hot water, consists mainly in mannoproteins. The second one was obtained by protease treatment and consists basically in hydrolyzed proteins, while the third one was obtained after by lipase treatment. Thus, the last fraction consists mostly on glucans. Comparing the sequential fractions obtained (F1, F2, F3 y F4), the antioxidant values measured by the Folin-Ciocalteau method were higher in F2 (hydrolyzed proteins) than in F1 (mannoproteins) corresponding with an increase in amino acid content and in the degree of hydrolysis (Table 2 and 3).

Folin-Ciocalteau values are higher in F2 fraction as DPPH (Table 3) while the values of FRAP are higher in the first fraction. The last one composed by glucans show the low antioxidant activity except by Folin method. It could be concluded that the antioxidant capacity resides basically in mannoproteins fraction. In the literature some studies have determined that the antioxidant capacity of the wall of *S. Cerevisiae* is mainly due to protein content, and the thiol groups of these proteins (especially in denatured state) are primarily responsible for its antioxidant activity (Jaehrig *et al.*, 2007). Not only the protein thiol groups may act as antioxidants, but potentially the 20 amino acids found in proteins can do it, especially those with aromatic groups.

Moreover, the antioxidant activity of a protein can be increased by destruction of its tertiary structure, which improves the accessibility of the interior R groups (Sarmadi and Ismail, 2010). This implies that the antioxidant activity of the wall may be due to several factors: the conformational state or protein denaturation degree, which can determine the accessibility of chemically active groups, and the type of amino acids that constitute the protein. Also, and according to other authors (Gallardo-Chacón *et al.*, 2010) a high correlation between FRAP and DPPH were found ($R2 = 0.97$, $P < 0.05$),

Table 2. Composition in % of dry weight of fractions obtained by cell walls (PS: polysaccharides, PR: proteins).

	YCW	F1	F2	F3	F4
% PS	74.6	20.5	4.8	3.9	45.4
% PR	9.3	4.0	2.7	2.0	0.7

Table 3. Mean values of antioxidant capacity determined by different antioxidant method (F-C: Folin-Ciocalteau method).

	F1	F2	F3	F4
F-C (mg Trolox-eq/L)	430.8	613.0	46.0	74.2
FRAP (mg Trolox-eq/L)	108.0	82.2	5.6	3.8
DPPH (EC_{50} T/EEC $_{50}$)	327.6	337.7	58.9	-
Thiol (mg Glu-eq/ L)	46.6	35.6	26.0	-
Amino acids (mg Leu-eq/L)	16.8	112.1	113.4	7.0

but none of them are correlated with Folin-Ciocalteau values.

In conclusion, cava lees are disorganized during ageing but the cell wall is not broken. The exchanges between wine and cells were confirmed and a possible marker of ageing time was identified. Finally, cava lees, composed, basically, by yeast cell walls have antioxidant capacity attributable to the protein content.

Finally, yeast lees could be an interesting material to be reutilized in the industry as natural fiber for its antioxidant capacity.

Acknowledgments : This study was made possible thanks to Freixenet S.A. winery for providing samples. And from Ministerio de Ciencia y Tecnología, project AGL2011-23872 and by the Generalitat de Catalunya, project SGR01438 and Xarta (Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments).

References

Devesa-Rey R., Vecino X., Varela-Alende J.L., Barral M.T., Cruz J.M., Moldes A.B., 2011. Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste management*, **31**, 2327-2335.

Doi E., Shibata D., Matoba T., 1981. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Analytical Biochemistry*, **118**, 1, 173-184.

Gallardo-Chacón J.J., Vichi S., López-Tamames E., Buxaderas S., 2009. Analysis of sparkling wine lees surface volatiles by optimized solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 3279-3285.

Gallardo-Chacón J.J., Vichi S., Urpí, P., López-Tamames E., Buxaderas S., 2010. Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine sur lie aging. International *Journal of Food Microbiology*, **143**, 1–2, 48–53.

Güngör N., Ozyürek M., Güçlü K., Cekiç S. D., Apak R., 2011. Comparative evaluation of antioxidant capacities of thiol-based antioxidants measured by different in vitro methods. *Talanta*, **83**, 5, 1650-1658.

Jaehrig S. C., Rohn S., Kroh L. W., Fleischer L.-G., Kurz T., 2007. *In vitro* Potential Antioxidant Activity of (1→3),(1→6)-β-d-Glucan and Protein Fractions from *Saccharomyces cerevisiae* Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 12, 4710-4716.

Sarmadi B.H., Ismail A., 2010. Antioxidative peptids from food proteins: A review. *Peptides*, **31**, 10, 1949-1956.

Teixeira A., Baenas N., Dominguez-Perles R., Barros A., Rosa E., Moreno D.A., Garcia-Viguera C., 2014. Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 15638-15678.

Tudela R., Riu-Aumatell M., Castellari M., Buxaderas S., López-Tamames E., 2013. Changes in RNA catabolites of sparkling wines during biological aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**, 6028-6035.

Vichi S., Gallardo-Chacón J.J., Pradelles R., Chassagne D., López-Tamames E., Buxaderas S., 2010. Surface properties of *Saccharomyces cerevisiae* lees during sparkling wine ageing and their effect on flocculation. *International Journal of Food Microbiology*, **140**, 125-130.