

Modificacions de les Propietats Fisicoquímiques de les *Lies* de Segona Fermentació durant la Criança del Cava

Joan Josep Gallardo Chacón

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

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

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



Departament de Nutrició i Bromatologia
Facultat de Farmàcia

**Modificacions de les Propietats
Fisicoquímiques de les *Lies* de Segona
Fermentació durant la Criança del Cava**

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la
Universitat de Barcelona

Autor:

Joan Josep GALLARDO CHACÓN

Directors:

Dra. Susana BUXADERAS SÁNCHEZ

Dra. Núria RIUS i BOFILL

Dra. Stefania VICHI

Barcelona, 2010



Departament de Nutrició i Bromatologia
Facultat de Farmàcia

Modificacions de les Propietats Fisicoquímiques de les *Lies* de Segona Fermentació durant la Criança del Cava

Programa de doctorat “Alimentació i Nutrició” (2009-2010)

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la
Universitat de Barcelona

Autor:

Joan Josep GALLARDO CHACÓN

Directors:

Dra. Susana BUXADERAS SÁNCHEZ

Dra. Núria RIUS i BOFILL

Dra. Stefania VICHI

Barcelona, 2010

Aquest treball ha estat finançat per:

- La Comissió Interministerial de Ciència i Tecnologia dels Aliments a través dels projectes AGL2005-03451/ALI i AGL2008-03392/ALI.
- La beca predoctoral de “Formación del Personal Investigador” (BES-2006-12565) associada al projecte AGL2005-03451.

Per a la realització del present treball s’ha comptat amb la participació de l’empresa Freixenet S.A.

A la Lin i als pares

Agraïments

Agraeixo a les meves directores la seva tasca, que ha fet possible que ara em vegi acabant la tesi. A la Susana, la “jefa”, que m’escollís per al seu grup i que hagi estat allà coordinant les meves anades i vingudes per Micro, pel Parc, per Freixenet o per la Península recollint mostres, i que hagi trobat sempre el moment per redreçar-me quan em veia molt “dispers”. A la Núria, amb qui vaig començar a fer recerca durant el treball pràctic i el màster. I, finalment, però no per això menys important sinó ben al contrari, a l’Stefania, que ha estat mentora infinitament pacient, jefa exigent, companya de poiata i fantàstica amiga; tot això abans de les cinc, que havia d’anar a recollir les nenes.

A la meva colla, amb l’Arnau a primera línia, que és un paio brillant i una gran persona, seguit de la Rebeca, sempre disposada a xerrar de ciència i del que fes falta; gràcies a tots dos perquè he après molt dintre i fora del laboratori. A la resta del meu grup, l’Elvira, la Montse, la Paula, la M^a Ángeles, el Jordi Colom, la Gema, la P’nar, la Zaida i en César, que han ajudat a mantenir el que és, en paraules de Dr. Bosch (imprescindible als agraïments), el nostre “particular grup d’investigació”.

A Freixenet i UCSA i molt especialment a la Pilar Urpí, en Josep Buján, en Jordi Torrent i en Ramón Giró, que em van obrir les portes de les seves instal·lacions i ho van posar sempre tot de la seva part perquè tingués el material necessari per a la meva tesi. Ara que s’acaba m’enyoraré les cates i les expedicions a Sant Sadurní per anar a mostrejar. També a tots els professionals del Parc: la Carme, l’Elisenda i la resta de noies de microscòpia; en Jaume, la Jordina, en Ricard i la Chari de citometria, i en Raül per les estones al TOF-SIMS. Finalment, a la Dra Maria Izquierdo per ajudar-me, molt per sobre de les seves obligacions, a portar a bon port la tesi.

Al meu grup i a la resta de companys de la UPC, que han demostrat una infinita paciència amb les meves penúries de tesi i que m’han obert un nou horitzó a la ciència que espero que duri molt de temps. A tot el professorat de Micro i Nutrició i, per suposat, a tota la resta de personal (Lucia, Montse i Fernando). Un record aquí també als meus professors i companys de Filologia, que s’han amoïnat de mantenir-me l’esperit en bon estat de salut.

A la Lina, que s'ha carregat de paciència i que m'ha ensenyat i m'ensenya a posar, com fa ella, una mica d'ànima en cada cosa faig.

Als pares, què hagués estat de la tesi sense els esmorzars de forquilla els dissabtes on parlant de tot hem arreglat el món i ens hem oblidat de tots el maldecaps més enllà del pa amb tomàquet. Als meus germans, el David i la Nines, als qui m'estimo més que no els hi recordo. A n'Arturo, en Jordi, en Jaime, na Mònica, n'Ivan, en Ramón, na Carol i a la resta d'amics, que s'han guanyat a pols la coautoria moral de la tesi per la paciència aguantant les meves coses.

Finalment, i amb una dosi brutal de carinyo, és necessari i just el recordar-me dels companys de bata. En escriure aquesta part he sentit una miqueta de vertigen pensant que em deixaria algú i, al final, he decidit d'evitar noms propis. Així, gràcies a tots i cadascun amb els qui he compartit estudis i doctorat, no sé si és l'habitual, però em considero molt afortunat perquè m'he trobat sempre envoltat, en totes les etapes de la meva formació, d'una quantitat grandiosa de persones amb talent. Ja em podeu creure quan us dic que ja no em mancaran referents, ni pel que fa als joves companys que han fet camí amb mi ni pel que fa a tots els que són una fita per marcar-me en anar fent la meva carrera.

Corre pels països àrabs una dita que fa: “escull abans el veí que la casa i el company abans que el camí”; cal que doni gràcies perquè heu estat sense demanar-ho els millors veïns i companys per aquesta part del viatge.

Ce qui embellit le désert, dit le petit prince, c'est qu'il cache un puits quelque part[...]

Le Petit Prince, Antoine de Saint Exupéry.

Feu que sigui modest en tot excepte en el desig de conèixer l'art de la meua professió. No permeteu que m'assetgi el pensament que ja en sé prou. Ans al contrari, concediu-me la força, l'alegria i l'ambició de saber més cada dia. Puix que l'art és inacabable, i la ment de l'home sempre pot creure.

Maimònides

Índex

1	Introducció	5
1.1	Història del mètode tradicional	5
1.2	Elaboració del cava	6
1.2.1	La verema	7
1.2.2	Obtenció del most	8
1.2.3	La primera fermentació	8
1.2.4	El tiratge	9
1.2.5	Fase de rima o criança del cava	10
1.2.6	Degollament	11
2	Interès i objectius	13
3	Antecedents bibliogràfics	17
3.1	Canvis ultraestructurals	17
3.1.1	Citologia de la paret i la membrana de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
3.1.2	Canvis morfològics al llarg de l'envelliment	20
3.2	Autòlisi dels llevats	23
3.2.1	La proteòlisi	24
3.2.2	La degradació de polisacàrids	25
3.2.3	Degradació de l'àcid nucleic	26
3.2.4	Degradació dels lípids	27
3.3	Compostos volàtils	27
3.4	Compostos antioxidants	29
3.4.1	Activitat de les <i>lies</i> contra l'enfosquiment dels vins	29

3.4.2	Les <i>lies</i> com a agent antioxidant	30
3.5	Procés de floculació	34
3.5.1	Elements proteics que participen a la floculació	35
3.5.2	Efecte del nutrients, compostos del medi i factors de creixement	36
3.5.3	Efecte de paràmetres físics	38
4	Metodologia i pla de treball	41
4.1	Mostreig	41
4.2	Primera Part	42
4.2.1	Soques de llevat	44
4.2.2	Vins escumosos	44
4.2.3	Obtenció del pèl·let de <i>lies</i>	44
4.2.4	Tractament de les mostres per a l'observació amb TEM	44
4.3	Segona part	45
4.3.1	Estudi de les modificacions de les propietats superficials de les <i>lies</i> al llarg de la rima i el seu efecte sobre la floculació	45
4.3.2	Efecte del contacte de les <i>lies</i> amb la fracció volàtil dels vins escumosos	46
4.3.3	Propietats antioxidants de les parets dels llevats	48
5	Resultats i discussió	49
5.1	Canvis ultraestructurals al llarg de la rima	49
5.1.1	Ultraestructura general del llevat viable del peu de cuba	49
5.1.2	Evolució de la ultraestructura durant la cria	50
5.2	Modificació de les propietats fisicoquímiques	57
5.2.1	Modificació de les propietats superficials de les <i>lies</i> al llarg de la rima	57
5.2.2	Anàlisi dels volàtils de la superfície de les <i>lies</i> de vins escumosos mitjançant l'optimització de la microextracció a l'espai de cap	65
5.2.3	Activitat antioxidant de la superfície de les cèl·lules de les <i>lies</i> du- rant l'envelliment en rima dels vins escumosos	74

6 Comentari dels resultats**103****7 Conclusions****107**

CAPÍTOL 1

Introducció

1.1 Breu història del mètode tradicional

El mètode *champenoise* (França), tradicional (Espanya) o *classico* (Itàlia) consisteix en una segona fermentació del vi a l'ampolla tancada. Durant aquest procés es genera CO_2 , que queda dissolt en el medi líquid. En servir-se, el producte presenta la característica efervescència dels vins escumosos.

Durant el s.XVII, els productors de vi de la regió de *Champagne* van començar a experimentar amb noves tècniques de vinificació i viticultura. D'entre tots, destaca *Dom Pierre Pérignon*, encarregat del celler de l'abadia d'*Hautvillers*, que va encetar diverses línies de recerca enològica relacionades amb la selecció de diferents raïms varietals, amb el control del premsat per obtenir vins blancs de raïms negres i amb la premsa simultània de barreges de vins per obtenir vins de gran qualitat entre d'altres [73]. Els vins de la *Champagne* esdevingueren, doncs, famosos i, durant la segona meitat del s.XVII, es va incrementar la seva exportació cap a Anglaterra. El transport es feia en barrils a finals de la tardor o a l'hivern i els vins s'embotellaven a l'arribada. Hom podia observar com els vins desenvolupaven efervescència un cop havien passat uns pocs mesos emmagatzemats a l'ampolla. La raó era que els vins de la zona entre *Epernay* i *Reims* no acabaven d'exhaurir tot el sucre abans de l'arribada de l'hivern i la fermentació podia reprendre's quan la climatologia es tornava més favorable. L'ús de l'ampolla de vidre de qualitat capaç de resistir les altes pressions i del tap de suro garantien la permanència del gas carbònic de la segona fermentació [13].

Sembla que van ser els comerciants anglesos els qui afegiren sucre per tal de garantir que

es produís la segona fermentació [73]. Malgrat tot, la producció del *champagne* va tornar a França de la mà de *Dom Pierre Pérignon*, que va recollir tot el saber de la seva època sobre el tema i va estandarditzar el procés d'elaboració del producte [23].

La popularització del *champagne* la trobem sota el regnat de Lluís XV, en ple s.XVIII. L'extravagància de la cort i la proximitat entre París i la regió de *Champagne* afavoriren la difusió d'aquesta beguda efervescent que s'ha relacionat amb figures tant populars com *Madame de Pompadour*, *Voltaire* o el Duc de *Richelieu*.

L'origen del cava es troba associat a l'esplendor de la viticultura catalana de mitjans del s. XIX. En aquell moment, diverses famílies de Sant Sadurní d'Anoia comencen a fer recerca sobre aquesta nova tècnica d'elaboració i l'apliquen als conreus de la zona. Fruit dels estudis i dels assaigs que fan, vinculats al prestigiós Institut Agrícola Català de Sant Isidre, aposten per les varietats autòctones de raïm blanc [19]. D'aquesta manera, neix el cava, amb una entitat peculiar que li és pròpia i diferent de qualsevol altre vi escumós de qualitat. Al 1872, Josep Raventós i Fatjó, de la històrica casa Codorniu, elabora les primeres 3.000 ampolles de cava seguint el mètode tradicional de segona fermentació en l'ampolla. Tanmateix, és el seu fill i hereu, Manuel Raventós i Domènech, qui inicia l'expansió i la consolidació de la casa. Poc després, a començaments del s. XX va néixer Freixenet, una empresa familiar creada per Pere Ferrer i Dolors Sala. Codorniu, Freixenet i altres productors de la vila fan de Sant Sadurní d'Anoia la capital neuràlgica del Cava. Durant els anys 20 del segle passat, el cava es consolida al mercat espanyol, on té un gran creixement en els anys 60 i s'estén al mercat internacional en els 80. Avui, és un dels sectors més dinàmics i pròspers de la viticultura, bàsicament, amb una producció que ha superat els 200 milions d'ampolles l'any, que arriben als consumidors de tot el món [19].

1.2 **Elaboració del cava pel mètode tradicional**

El cava és un vi escumós de qualitat produït en una regió determinada que s'elabora per la refermentació d'un vi base. El procés de producció està estretament regulat pel

“Reglament de la denominació *cava* i del seu consell regulador”, que data de 1991 [7]. Aquest reglament ha patit diverses modificacions, la darrera de les quals fou al 2007 [8]. A continuació es resumeixen les etapes més rellevants de l’elaboració del cava. (Fig. 1.1)

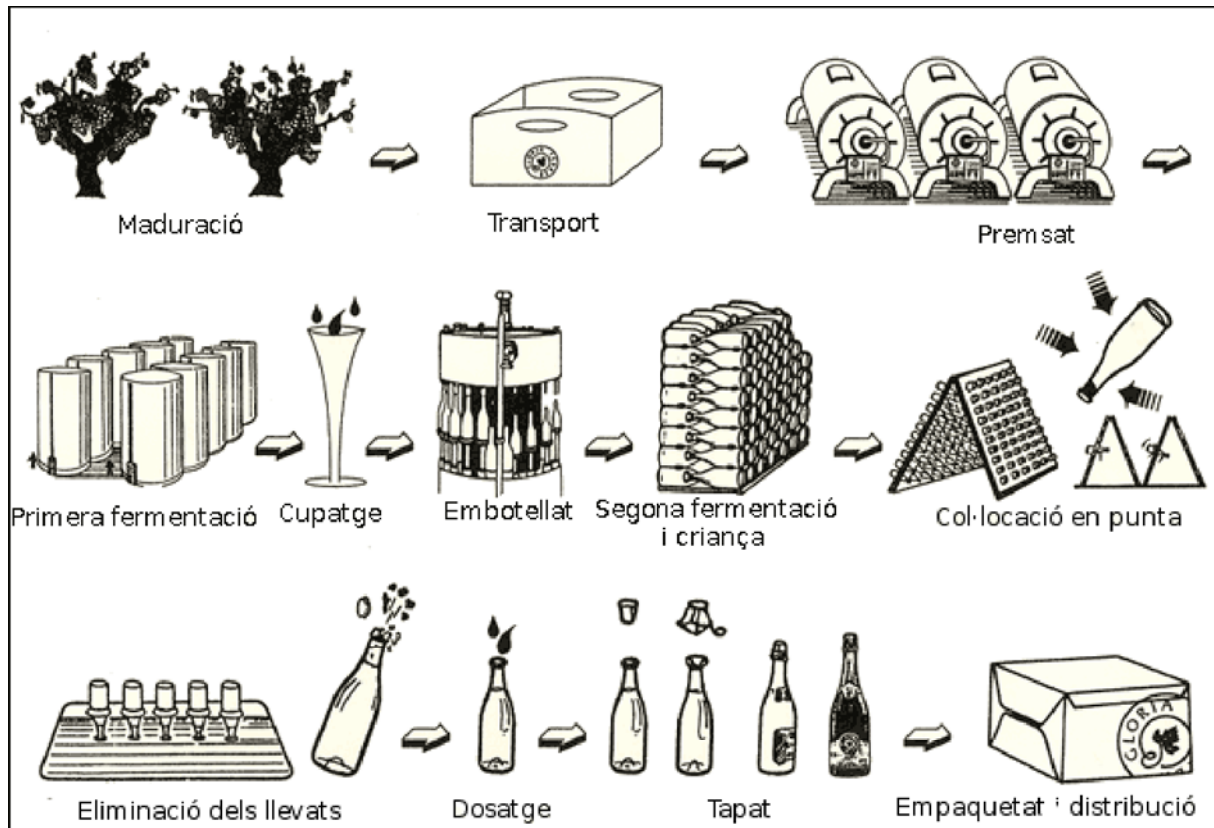


Figura 1.1: Representació esquemàtica de les etapes per a l’elaboració dels vins escumosos pel mètode *champenoise*

1.2.1 La verema

La vinificació del cava segons el mètode tradicional comença amb la verema, que es fa un cop el raïm ha arribat a la seva maduresa tecnològica. Això sol succeir entre les darreries d’agost i principis de setembre. Per determinar-la es fan servir una sèrie de paràmetres:

- grau alcohòlic volumètric natural mínim: de 8,5 – 9% vol.
- acidesa total: de 8 a 12 g/l en H_2SO_4
- percentatge d’àcid màlic: del 50 al 65 % de l’acidesa total

- relació sucres/acidesa: al voltant de 15/20 unitats
- manteniment de condicions sanitàries adequades de la verema

Les varietats permeses per a l'elaboració de cava són:

- raïms blancs : Xarel·lo, Parellada, Macabeo, *Chardonnay* i Malvasia (Subirat Parent).
- raïms negres: Garnatxa negra, Monastrell, *Pinot Noir* i Trepal¹.

Tot i això, les varietats més abundants i amb una trajectòria més ampla són: Xarel·lo, Parellada i Macabeo.

1.2.2 Obtenció del most

El raïm es premsa per obtenir el most. Es pot premsar el raïm sencer o se'l pot sotmetre prèviament a un trepig. El rendiment ve determinat per la reglamentació, que indica que la quantitat màxima de most ha de ser de 1 hl per cada 150 kg de raïm.

A la sortida de les premses, i per evitar l'oxidació del most, aquest se sulfita amb 50 – 60 mg/l d'àcid sulfurós i se sotmet a un desfangat que pot ésser o bé estàtic, per decantació, o bé dinàmic, per filtració o centrifugació [13].

Després del desfangat i abans de la fermentació, generalment es corregeix l'acidesa amb àcid tartàric i s'addicionen bentonites per facilitar la precipitació de proteïnes i l'eliminació parcial de polifenols.

1.2.3 La primera fermentació

La fermentació es duu a terme en dipòsits d'acer inoxidable a una temperatura controlada entre 16–18°C. El peu de cuba² ha de garantir una fermentació ràpida que es dugui a terme

¹Aquesta varietat de raïm negre és exclusiva per a l'elaboració de caves rosats. La resta de raïms negres poden ésser utilitzats per a l'elaboració de caves blancs i rosats; destaca la incorporació del *Pinot Noir* com a varietat apta per a la vinificació en blanc en la darrera legislació [8]

²S'entén per peu de cuba un cert volum de most en plena fermentació, preparat a partir de most estèril o medi de cultiu sembrat amb un cultiu pur de llevat seleccionat. Les espècies més utilitzades són *Saccharomyces cerevisiae* o *S. bayanus* [13]

en la seva totalitat. Per a l'elaboració del cava, els diferents vins varietals es preparen per separat per mantenir inalterades les seves característiques i complementar-les després mitjançant una barreja, que dóna lloc a l'anomenat vi base.

El paràmetres de control del vi són, segons la legislació [8]:

- Graduació alcohòlica adquirida: 9,5 – 11,5 % vol
- Acidesa total mínima (en àcid tartàric): 5,5 g/l
- Extracte sec no reductor: 13 – 22 g/l
- Acidesa volàtil real (en àcid acètic): inferior a 0,60 g/l
- Anhídrid sulfurós (màxim): 140 mg/l
- Cendres: 0,70 – 2 g/l
- pH: 2,8 – 3,3

El cupatge

El cupatge és la barreja de vins monovarietals, per constituir el vi base i aconseguir les característiques organolèptiques òptimes per a l'elaboració del cava. Les condicions de limpidesa amb les que el vi arriba al tiratge han d'ésser extraordinàries, ja que no existeix cap més tractament al cava fins l'eliminació de les *lies*. Abans del tiratge, es filtra el vi per filtres de membrana de 0,65 μ m de diàmetre de porus.

1.2.4 El tiratge

El tiratge és un procés que inclou l'embotellat del vi base i l'addició del licor de tiratge. Aquest licor conté el sucre i els llevats que realitzaran la segona fermentació en ampolla; a més, es pot afegir quelcom que faciliti la floculació de les *lies*.

La quantitat de sucres a afegir ha de ésser, d'acord amb la legislació, inferior a 25 g sacarosa per litre. L'ampolla on es duu a terme la segona fermentació és la mateixa que

arribarà al consumidor; el producte, ja acabat i en ampolles de 750 cc o superiors en capacitat, ha de tenir una pressió mínima superior a 3,5 bars a 20°C després del degollament. S'utilitzen per a la segona fermentació llevats seleccionats en base a les seves propietats aromatitzants, floculants i aglomerants i a la capacitat de formar *lies* poc voluminoses i escassament adherides a les parets internes del vidre de l'ampolla.

El nombre de microorganismes és un paràmetre important per al correcte desenvolupament de la fermentació, ja que quantitats massa grans de cèl·lules poden originar fermentacions massa ràpides i un nombre excessiu de llevats al final de la mateixa; per contra, pocs llevats poden derivar en dificultats per acabar la fermentació.

Es tracta d'escollir espècies que:

- resisteixin bé a l'alcohol.
- no massa exigents en matèries nutritives.
- amb tendència a aglomerar-se entre si i no adherir-se a les parets de vidre de l'ampolla.

Algunes de les espècies més utilitzades són *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces bayanus* [13, 78].

1.2.5 Fase de rima o criaça del cava

Les ampolles tancades hermèticament es col·loquen a la cava apilades en posició horitzontal; és la denominada rima. A partir d'aquest moment té lloc la segona fermentació en ampolla; durant la fermentació es genera CO_2 , de manera que augmenta la pressió en el vi.

És molt important que la fermentació es perllongui fins a assolir el grau alcohòlic previst i fins que el CO_2 s'homogenitzi completament amb el vi, de manera que el seu despreniment posterior sigui fi i lent. La temperatura òptima és de 11 – 15 °C [13].

L'envelliment del cava es produeix després de la fermentació en l'ampolla. Durant aquest procés es manté el contacte entre el cava i els llevats. El Consell Regulador del Cava

estableix que el temps d'envelliment o criaça ha d'ésser de, com a mínim, 9 mesos des de l'embotellament fins a l'eliminació de les *lies*. La indicació "Reserva" únicament podrà utilitzar-se en caves amb més de 15 mesos des del tiratge fins el degollament. Finalment, els caves de tipus "Brut nature", "Extra brut" i "Brut" amb més de 30 mesos d'envelliment en rima poden ésser qualificats de "Gran Reserva".

Quan s'acaba la fase de rima, cada ampolla és sotmesa a un procés de remoció, amb canvis adequats de posició, fins a aconseguir que tot el sediment (*lies*) quedi perfectament aglomerat al coll de l'ampolla. Posteriorment, són emmagatzemades en posició invertida fins a l'eliminació de les *lies* en el procés anomenat degollament.

Les característiques que, segons la legislació, ha de tenir el Cava un cop acabat tot el procés d'elaboració es resumeixen a continuació [7]:

- Graduació alcohòlica adquirida: 10,8 – 12,8% vol.
- Acidesa total mínima (en àcid tartàric): 5,5 g/l.
- Extracte sec no reductor: 13 – 22 g/l.
- Acidesa volàtil real (en àcid acètic) inferior a 0,65 g/l.
- Anhídrid sulfurós total inferior a 170 mg/l.
- Cendres: 0,70 – 2 g/l.
- pH 2,8 – 3,3.
- Sobrepressió mínima 3,5 bar a 20°C.

1.2.6 Degollament

Per cada ampolla, s'eliminen les *lies* que han quedat al coll, aconseguint que el vi quedi sense rastres de sediments o terbolesa. Per fer-ho, es congela el coll de l'ampolla i es destapa fent que la pressió interior expulsi el bloc congelat que conté les *lies*. El cava resultant d'aquests processos és un vi amb poc o bé sense gens de sucre i amb una acidesa

relativament alta, qualitats que condicionen les seves característiques organolèptiques.

L'ejecció de les *lies* congelades produeix una pèrdua indeterminada de vi que es compensa afegint-hi el licor d'expedició. D'aquesta manera hom pot igualar el volum a totes les ampolles. D'acord amb la reglamentació, el licor d'expedició pot estar compost de vi, destil·lat de vi, most, sacarosa i altres productes que estiguin autoritzats per als vins en general.

L'addició del licor d'expedició permetrà obtenir diferents tipus de cava, amb especificació concreta segons el seu contingut en sucres. En aquest sentit, la legislació contempla els següents tipus de cava:

- Brut Nature: Fins 3 g/l i sense addició de sucre³.
- Extra brut: Fins 6 g/l.
- Brut: Fins 15 g/l.
- Extra sec: Entre 12 i 20 g/l.
- Sec: Entre 17 i 35 g/l.
- Semi-sec: Entre 33 i 50 g/l.
- Dolç: Més de 50 g/l.

Després de l'addició del licor d'expedició, es procedeix al tapat de l'ampolla amb el suro definitiu. Abans del consum, cal que el licor d'expedició s'amalgami amb el cava i per això s'aconsella un temps de repòs de com a mínim 2 mesos.

³Per a l'elaboració dels escumosos d'aquesta categoria, se sol afegir un excedent de sucre, que no pot superar el màxim establert per la legislació, al començament de la segona fermentació a fi i efecte d'evitar l'addició de sucre en el licor d'expedició.

CAPÍTOL 2

Interès i objectius

Els caves són vins escumosos que es distingeixen per la seva criança particular en contacte amb els llevats de la segona fermentació per un període no inferior a 9 mesos. Com més es perllonga la criança, se suposa una millor qualitat; així, la categoria “Gran Reserva” implica com a mínim 30 mesos d’envelliment en rima. Tanmateix, encara avui es desconeix l’etiologia dels canvis que se succeeixen en el vins de tipus cava durant el seu envelliment. Les raons científiques que expliquen aquests canvis podrien ésser de tipus fisicoquímic o de tipus biològic, duts a terme per enzims alliberats per les *lies*, el vi o ambdós. El conjunt de modificacions que transformen un cava jove en un altre de més evolucionat, amb noves sensacions aromàtiques, són percebudes de manera molt positiva pels experts, malgrat que tant els caves joves com els que han patit un llarg envelliment tenen gran acceptació en el mercat.

Sembla ser que existeix prou consens entre els enòlegs i la bibliografia consultada sobre els factors que serien determinants per a la qualitat organolèptica del cava: el tipus de vi base en el qual es realitza la segona fermentació; així com el temps que romanen les *lies* en contacte amb el vi durant la fase de criança. Existeixen evidències científiques que les *lies* de llevat pateixen, durant el contacte amb el vi, el fenomen conegut amb el nom d’autòlisi, que implica la degradació de la cèl.lula. Nogensmenys, es desconeixen els mecanismes que involucren l’autòlisi amb la qualitat organolèptica dels vins escumosos. Se suposa, però, que existeix una relació bidireccional entre les cèl.lules mortes i el vi. D’una banda, els enzims i altres components alliberats durant l’autòlisi de les cèl.lules de llevat poden provocar reaccions químiques i enzimàtiques i, d’altra banda, les cèl.lules han mostrat la capacitat de retenir aromes dels vins.

Considerant els antecedents exposats, en aquest treball s'ha proposat identificar possibles mecanismes que expliquin la relació entre la criaça del vi escumós en contacte amb les *lies* i el temps d'envelliment. Per assolir aquesta fita, s'han plantejat els següents objectius concrets:

1. Avaluar les propietats fisicoquímiques de les *lies* atenent a les seves modificacions al llarg de la criaça.

Aquest objectiu, al seu torn, comprèn dues parts: el seguiment dels canvis morfològics de les cèl·lules de llevat causats per l'autòlisi durant un període llarg de criaça del vi; i, una segona part, que ha suposat la caracterització de les propietats fisicoquímiques i la identificació dels canvis que es poden produir durant l'envelliment. Això es fa a fi i efecte que els canvis morfològics de les *lies* proveeixin d'arguments per a l'estudi dels possibles canvis observats en les seves propietats fisicoquímiques en funció del temps.

2. Estudiar la capacitat de les *lies* per retenir compostos volàtils que participen en l'aroma del vi, així com la seva possible intervenció en la protecció dels escumosos en rima enfront de l'oxidació.

Tant la capacitat per retenir aromes com l'activitat antioxidant són característiques de les *lies* que estaran, probablement, molt relacionades amb els canvis morfològics de les cèl·lules i de les seves propietats fisicoquímiques. Per aquesta raó, tant pel que fa a la retenció de compostos volàtils com a la capacitat antioxidant, s'ha considerat la influència del temps de criaça.

Finalment, té una especial rellevància per a les propietats organolèptiques del cava la capacitat de floculació, ja que els compostos volàtils i altres components adsorbits a la paret seran eliminades juntament amb les *lies* durant el degollament. Aquest treball s'emmarca en els projectes AGL2005-03451/ALI i AGL2008-03392/ALI finançats per la Comissió Interministerial de Ciència i Tecnologia dels Aliments, els títols dels quals són,

respectivament: “Posibles indicadores de la crianza y de la conservación del cava que determinan su calidad” i “Análisis prospectivo del potencial aromático y antioxidante de lías recuperadas en la elaboración de vinos espumosos”. En el desenvolupament dels projectes esmentats ha participat molt activament l’empresa Freixenet S.A., preparant i subministrant totes les mostres de cava comercial i en rima així com proporcionant assessorament científic i tècnic.

L’experiència del grup investigador en temes de qualitat de vins es remunta a l’any 1988. De manera seqüencial, després d’una sèrie de projectes d’investigació dedicats als factors condicionants de la qualitat organolèpica dels vins base per a l’elaboració de cava, es van realitzar diversos projectes dedicats a l’estudi de les característiques organolèptiques que desenvolupen els caves durant la cria: escuma, color i aroma; aquests resultats van permetre sospitar que el contacte del vi amb les *lies* podria ésser uns dels factors determinants de la qualitat.

CAPÍTOL 3

Antecedents bibliogràfics

3.1 Canvis ultraestructurals

3.1.1 Citologia de la paret i la membrana de *Saccharomyces cerevisiae*

La paret cel·lular

La paret del llevat comprèn entre el 20 i el 30 % de la matèria seca de la cèl·lula [1]. Es tracta d'un embolcall rígid la funció del qual és, entre d'altres, la de protegir el llevat dels canvis a la pressió osmòtica del medi [58]. Tanmateix, la paret mostra certa flexibilitat de manera que es pot reduir el volum de la cèl·lula fins al 50% sense que es trenqui. Ben al contrari del que es podria pensar, té la capacitat de modificar la seva estructura i composició per respondre a les necessitats de l'organisme i a factors de tipus ambiental. A part de la funció protectora, la paret cel·lular presenta, entre d'altres, les funcions següents [48, 54, 58]:

- Mantenir la forma de la cèl·lula.
- Permetre interaccions de tipus molecular tals com la unió sexual, la floculació o el factor killer.
- Afavorir interaccions amb enzims hidrolítics de l'exterior de la cèl·lula o de l'espai periplasmàtic.

Els seus components principals són mannoproteïnes i β -glucans (80 – 90 %). La part interna de la paret de la cèl·lula està composta per glucans on s'entrecreuen les

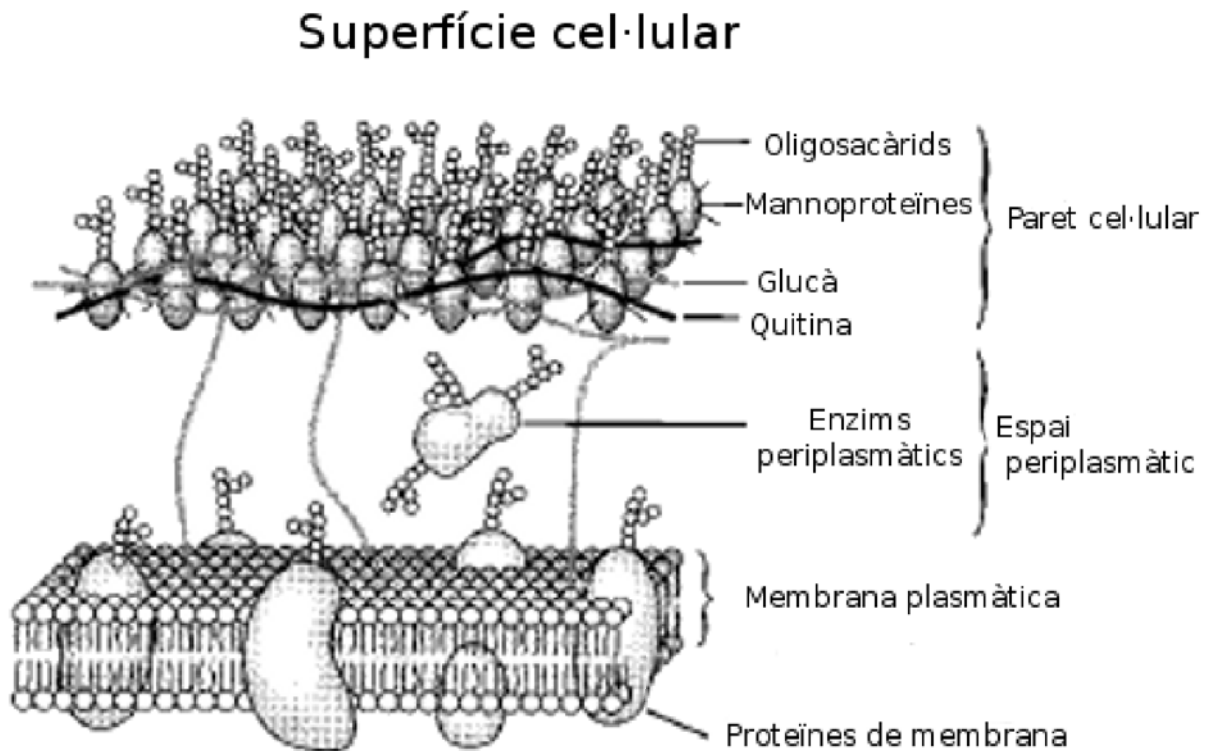


Figura 3.1: Representació esquemàtica de la superfície cel·lular (adaptada de Pretorius [54])

mannoproteïnes formant la capa més externa [24] Fig. 3.1. La quitina, que representa una part minoritària percentualment, quedaria entre les fibres de glucà.

Pel que fa al glucà, representa un 60 % del pes sec de la paret i al seu torn, es pot dividir en tres categories atenent a la composició i estructura [58]:

1. Glucà β -1,3 de tipus fibrós, que és altament insoluble en aigua, àcid acètic i medi bàsic. Es troba poc ramificat i, quan presenta ramificacions, els enllaços són de tipus β -1,6. Al microscopi electrònic s'observa com una estructura altament fibrosa. A més, presenta connexions amb la quitina que hom pensa són les responsables de la seva estabilitat. Aquesta estructura assegura la rigidesa de la paret i ajuda a mantenir la seva forma.
2. Glucà β -1,3 de tipus amorf, també insoluble en aigua però que es pot solubilitzar en medi alcalí. Al igual que el fibrós, està molt poc ramificat i al microscopi té aspecte

amorf. Entre les seves funcions estarien servir de reserva extraprotoplasmàtica, donar elasticitat a la cèl·lula i servir d'ancoratge de mannoproteïnes. Ambdós tipus de glucà són molècules llargues d'unes 1500 unitats de glucosa.

3. Glucà β -1,6 d'aspecte amorf és soluble en aigua, densament ramificat (β -1,3) i és molt més petit que els anteriors (unes 150 unitats de glucosa). S'obté a partir del glucà insoluble en àlcali, per extracció amb àcid acètic.

Les mannoproteïnes constitueixen entre el 25 – 50 % del pes sec de la paret cel·lular. Es tracta de proteïnes de diverses mides (pesos moleculars entre 20 – 450 kDa) amb un variat grau de glicosilació. La mannososa es troba en forma de cadenes de mida diversa, ramificades o no. Per al seu aïllament, calen tècniques enzimàtiques que preservin la seva estructura i que digereixin el glucà mitjançant el trencament dels enllaços β -1,3 entre glucoses.

Pel que fa a les cadenes curtes de mannososa, s'uneixen a la proteïna mitjançant enllaç O-glicosídic. D'altra banda, l'enllaç de tipus N-glicosídic uneix cadenes complexes i ramificades de mannososa a les proteïnes mitjançant un dímer de N-acetil glucosamina. S'han descrit també unions directes entre les proteïnes i cadenes de glucomannòsid de longitud variable. Finalment, pot existir glicosilació mitjançant l'ancoratge de glicosilfosfatidil-inositol on la part carboxiterminal de la mannoproteïna s'uneix a un fosfolípid. Això, li permet també la unió amb la membrana cel·lular un cop la proteïna ha travessat la paret.

El darrer component majoritari és la quitina (polímers de N-acetilglucosamina units per enllaç β -1,4), que comprèn 1 – 2 % de la paret cel·lular, concentrada principalment en les cicatrius de gemmació. La quitina no només està situada a la paret, sinó que també ha estat localitzada a l'espai periplasmàtic.

La membrana plasmàtica

Es tracta d'un orgànul altament selectiu, format principalment per lípids i proteïnes (40 i 50 % respectivament) Fig. 3.1. Pel que fa als lípids, es tracta fonamentalment

de fosfolípids i esterols en proporció variable. Entre els fosfolípids destaquen la fosfatidilcolina, el fosfatidil inositol i la fosfatidil etanolamina, que representen entre el 70 i el 85 % dels fosfolípids a la membrana. Els àcids grassos són de composició variada, entre 14 i 24 àtoms de carboni destacant els C_{16} i C_{18} que poden ésser insaturats o bé presentar una o dues saturacions. L'estructura es genera per afinitat sense que hi intervinguin enllaços de tipus covalent. Pel que fa als esterols, destaca l'ergosterol i, en menor mesura, el dehidroergosterol i el zimosterol.

Les proteïnes són molt variades i modifiquen la composició relativa en resposta a les necessitats de la cèl·lula. Tot plegat s'ha interpretat com un mosaic fluid on els lípids determinen dominis de polaritat i les proteïnes se situen segons la seva afinitat.

Entre les funcions de la membrana destaca, en primer lloc, el control dels intercanvis entre medi intern i medi extern. La síntesi dels glucans i la quitina de la paret es duu a terme en la membrana on trobem enzims com la quitina sintasa o la β -1,3 glucanasa. Finalment, hi ha proteïnes a la membrana que actuen com a receptors, participant de la comunicació de la cèl·lula amb el seu entorn.

3.1.2 Canvis morfològics al llarg de l'envelliment

L'estudi dels canvis morfològics a les *lies* de llevat al llarg de la cria dels vins escumosos s'ha dut terme desde dues aproximacions:

- Mitjançant l'inducció de l'autòlisi dels llevats fent servir medis artificials i condicions acceleradores.
- Mitjançant l'observació directa de les *lies* desenvolupades en vins en condicions enològiques.

Inducció de l'autòlisi dels llevats fent servir medis artificials i condicions acceleradores

Hernawan i Fleet [25] van observar als microscopis electrònics de transmissió i de rastreig els canvis que s'esdevenien en les cèl·lules de llevat durant deu dies en condicions d'autòlisi (tampó fosfat 0,1 M a pH 4,5, 45 °C i agitació). Les micrografies no mostraven canvis ni a la mida ni a la forma de la cèl·lula entre el cinquè i el desè dia. Les parets conservaven la seva integritat i hom podia constatar la presència de les cicatrius de gemmació. Malgrat això, s'havia produït una reducció de l'espessor de la paret d'aproximadament un 20%. Pel que feia a la membrana, s'observava una contracció que anava acompanyada d'una pèrdua de contingut citoplasmàtic. Aquests experiments es van realitzar amb llevats de tres espècies diferents (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata* i *Candida stellata*) i estaven d'acord amb els obtinguts per Babayan *et al.* [4]. Tanmateix, en ambdós casos, les condicions culturals distaven de les condicions particulars de l'elaboració de vins escumosos. Les característiques particulars de l'envelliment de les cèl·lules feien necessari que es correlacionessin els períodes d'incubació en medi artificial amb el temps de maduració en rima.

L'ús de "vins model" amb etanol i sals minerals, imitant la composició de vins reals, s'ha fet servir també per estudis de microscòpia de rastreig i criofractura, per observar simultàniament l'ultraestructura de l'interior cel·lular i de la superfície del llevat [40]. Així, durant l'autòlisi, hom pot observar solcs i arrugues a la superfície així com una pèrdua de contingut citoplasmàtic.

Observació directa de les *lies* desenvolupades en vins en condicions enològiques

En el treball de Martínez-Rodríguez *et al.* [40] es va constatar la dificultat de correlar el coneixement extret dels estudis en medis artificials amb l'obtingut d'observacions reals de cèl·lules envellides en vi. En aquest cas en particular, es va realitzar un estudi de mostres de *lies* amb 12 mesos d'envelliment en condicions reals per constatar que els medis

sintètics difícilment poden igualar el ritme d'autòlisi real, que s'esdevé a una velocitat molt baixa.

La informació més detallada que hom té sobre la ultraestructura dels llevats durant l'envelliment *sur lie* dels escumosos de *Champagne* prové de l'estudi de Piton *et al.* [51]. Els autors publiquen un treball molt detallat sobre els canvis observats mitjançant microscòpia de transmissió de les *lies* de *champagnes* al llarg de l'envelliment (fins a 15 anys).

Just després de la inoculació dels llevats, les cèl·lules mostren un nucli gran sense nuclèol aparent i els mitocondris presenten poca densitat de crestes, tal com s'espera del desenvolupament en anaerobiosi [51]. Pel que fa al reticle endoplasmàtic, està altament desenvolupat, amb grànuls identificables com polisacàrids a l'interior. Finalment, hom observa un heterogeni conjunt de vesícules al citoplasma.

Un cop es pot considerar que no queden cèl·lules viables (després de sis setmanes des de la inoculació), les vesícules amb polisacàrids estan fusionades formant unes àrees molt àmplies al citoplasma, els orgànuls endomenbranosos (reticle endoplasmàtic) s'han reduït i no s'observen mitocondris. Segons això, sembla que la cèl·lula, en els darrers moments de l'estat estacionari, comença un procés de degradació de continguts glucídics per compensar la manca total de nutrients.

A partir del tercer mes, la membrana es troba clarament separada de la paret. Respecte als orgànuls, sembla que únicament es distingeix clarament la membrana cel·lular i la que envolta les grans vesícules citoplasmàtiques. L'estudi de la paret mostrà que en pocs mesos l'estrat més intern sembla desaparèixer; a més, aquesta degradació continua molt lentament fins als quinze anys on encara es manté l'estructura però altament degradada. En conclusió, les cèl·lules no viables de llevat mantenen la seva forma al llarg de períodes molt dilatats mercès a una paret cel·lular rígida que es modifica lentament. Nogensmenys, el citoplasma perd l'estructura ràpidament un cop finalitza la fermentació i comença la mort cel·lular; això podria ésser degut a que no existeix control de les funcions cel·lulars.

3.2 Autòlisi dels llevats

El desenvolupament de les cèl·lules de llevat durant la fermentació consta de quatre fases principalment [58]:

- Fase de latència (*lag time*): Les cèl·lules adapten la seva maquinària enzimàtica a les condicions del medi de cultiu¹.
- Fase de creixement exponencial: Els llevats incrementen el seu nombre molt ràpidament, consumint els recursos energètics del medi i produint productes secundaris de la fermentació. Per exemple, la concentració de sucre és un paràmetre molt útil a l'hora de monitoritzar la fermentació, atès que la seva concentració és inversament proporcional al número de microorganismes. D'altra banda, la concentració d'alcohol està estretament relacionada amb el creixement de microorganismes.
- Fase estacionària: La manca de recursos i l'increment de productes del metabolisme fa que s'aturi el creixement cel·lular tot i que els microorganismes mantenen la seva viabilitat. La supervivència implica una sèrie de canvis al metabolisme, destinats a sobreviure en condicions desfavorables. Malgrat això, si les cèl·lules retornen a un medi amb recursos poden desenvolupar-se de nou després d'un temps de latència.
- Fase de mort: Les cèl·lules perden la seva viabilitat un cop esgotades totes les reserves.

Per autòlisi hom entén el trencament de constituents cel·lulars per l'acció dels enzims endògens [1, 25]. Se situa temporalment al final de la fase estacionària, associat amb la mort cel·lular [4], i es pot estendre durant llargs períodes de temps [40]. Segons Babayan

¹En el cas del cava, el desenvolupament en medi alcohòlic dificulta especialment l'adaptació i fa necessari que es donin diversos cicles fermentatius durant cadascun dels quals s'incrementa progressivament el volum de vi a fermentar [13].

et al. [4], la successió d'esdeveniments durant l'autòlisi comença amb una degradació de les estructures internes de la cèl·lula, amb el consegüent alliberament de proteases intracel·lulars al citoplasma. Després d'això, s'activen les proteases degut a la degradació dels agents inhibidors al llarg del temps. Aquest fenomen va seguir d'una hidròlisi d'estructures polimèriques que s'acumulen a l'espai intern de la paret. Finalment, la progressiva reducció de la mida de les molècules acabarà permetent el seu alliberament al medi.

3.2.1 La proteòlisi

La proteasa A (Saccharopepsin P07267) és el principal responsable de la autòlisi en medis artificials; entre un 60 i un 80 % de l'activitat proteolítica en aquestes condicions es deguda a aquest enzim [2]. Tanmateix, la resta de l'activitat pot ésser deguda a altres proteases àcides que no es vegin inhibides per les condicions d'elaboració dels vins (pH 3 – 5, 15 °C, 12 % vol.).

Alexandre *et al.* [2] van estudiar els canvis a l'activitat proteolítica de les *lies* a un vi sintètic en condicions molt properes a les enològiques. En aquest treball, van concloure que l'activitat proteasa A s'incrementava fins a 6 vegades un cop s'havia esgotat el sucre de la fermentació i que decreixia abans de que totes les cèl·lules del cultiu deixessin d'ésser viables. Afirmava, a més, que la mesura d'aquesta activitat no era un bon marcador de l'autòlisi ja que es reduïa al llarg de l'envelliment amb les *lies*. En canvi, als vins escumosos l'activitat proteolítica és baixa durant la fermentació i en els mesos següents, mentre que, un cop superat aquest període (uns 9 mesos), l'activitat s'incrementa dràsticament amb variacions depenent de la soca de llevat [21, 36]. Segons aquestes dades, les conseqüències de l'autòlisi en la membrana i la paret cel·lular no s'esdevindrien fins aproximadament els 9 mesos de cria.

Una altra aproximació per estudiar l'envelliment passa per la caracterització dels compostos que s'alliberen al medi al llarg del temps. Martínez-Rodríguez i Polo [39] han fet servir un vi sintètic i condicions òptimes d'autòlisi (30 °C) per caracteritzar quins

compostos nitrogenats es podrien trobar al vi durant l'autòlisi. Mitjançant ultrafiltració i anàlisi electroforètic de les mostres, conclouen que amb el temps s'alliberen aminoàcids i polipèptids de mida diversa (entre 700 i 10000 Da). Aquests serviran de substrat a les proteases per continuar la degradació de proteïnes a l'espai extracel·lular i esdevenen pèptids de mida menor. Aquests compostos poden tenir efecte sobre la composició en aromes i les propietats surfactants dels productes resultants. Cal dir també que existeixen diferències en el comportament dels llevats segons si es realitza o no una adaptació prèvia al creixement en medi alcohòlic [49]. Sembla que l'adequació produeix un increment en la quantitat de derivats nitrogenats (entre 1,2 i 1,8 vegades més) alliberats al medi durant l'autòlisi; fet que no es dona en soques no adaptades.

L'efecte de la soca de llevat no està emperò tan clar. Perrot *et al.* [49], no van observar diferències en l'excreció de compostos nitrogenats per dues soques de *lies* de segona fermentació mitjançant un assaig accelerat en medi artificial. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en mostres reals de vins escumosos per Hidalgo *et al.* [26], on es constata que els canvis més destacables eren deguts al temps i al transcurs de la segona fermentació i no a la soca. Tanmateix, Nunez *et al.* [46] troben diferències en la quantitat d'aminoàcids i compostos nitrogenats a vins escumosos sotmesos a envelliment *sur lie* depenent de la soca utilitzada per a la segona fermentació. Caldria tenir en compte que aquestes soques van ser obtingudes mitjançant mutagènesi per UV.

3.2.2 La degradació de polisacàrids

S'ha observat que les glucanases podrien tenir un paper important en la degradació de la paret cel·lular [45]. Les β -glucanases s'encarreguen de la degradació del enllaç β -O-glicosídic de les cadenes de β -glucà. Això produeix alliberament de glucosa, oligosacàrids i mannoproteïnes ancorades a la paret. La presència de polisacàrids s'ha relacionat amb la qualitat de l'escuma en els vins de segona fermentació [45]. Tot i que no es coneix la cinètica d'aquests enzims al llarg de l'envelliment, s'han estudiat els canvis en la fracció de polisacàrids durant aquest període en vins escumosos [45, 46]. Durant la fermentació, la

quantitat de polisacàrids al vi augmenta fins als tres mesos aproximadament [46], moment en el qual disminueix, segurament a causa de l'acció de glucanases que hidrolitzen les cadenes de polisacàrids. Després d'això, aproximadament als 18 mesos, s'observa un increment progressiu de la seva concentració que podria ésser degut a la degradació dels mannans i glucomannans de la paret dels llevats [45]. Atès que les proteïnes es troben incloses a la xarxa de glucans, existeix una relació entre ambdues, de manera que els canvis als polisacàrids de la paret del llevat afectaran molt directament a la concentració de proteïnes del cava.

Els canvis bioquímics que s'esdevenen a la cèl·lula durant l'envelliment i que concerneixen proteïnes i polisacàrids es poden resumir a grans trets:

- Els glucans es degraden per les glucanases i alliberen proteïnes que estan entrelaçades o bé unides covalentment amb els glucans.
- S'alliberen els glucans per acció o bé de les glucanases intracel·lulars o per aquelles que han estat alliberades al medi.
- Les proteïnes es degraden durant el fenomen de la proteòlisi.

3.2.3 Degradació de l'àcid nucleic

L'àcid nucleic representa més del 10 % del pes sec de la cèl·lula de llevat. El 95 % de l'àcid nucleic està compost per *ARN* [25]. El resultat de la seva hidròlisi són els mononucleòtids fosfat, que tenen un reconegut efecte organolèptic als aliments. Hom pot esperar, doncs, que la seva degradació tingui un paper rellevant a l'envelliment dels vins. Fins al moment, els estudis sobre degradació de l'àcid nucleic s'han fet en medi de cultiu [14, 76, 77] i s'ha constatat que existeix un increment en nucleòtids lliures i petits oligòmers amb l'autòlisi. No es tenen dades, però, del què passa en els vins. Tot i això, es pot afirmar que les condicions de la segona fermentació i la cria dels vins escumosos són subòptimes per a la degradació de l'àcid nucleic; les baixes temperatures, el pH àcid, l'etanol i la pressió de CO_2 poden afectar el funcionament dels enzims. S'espera, doncs, que l'alliberament

sigui molt gradual i s'extengui al llarg del temps.

3.2.4 Degradació dels lípids

Finalment, els lípids influeixen en les característiques organolèptiques dels vins i, en el cas dels escumosos, actuen sobre les característiques de l'escuma. En condicions enològiques es va observar un increment dels lípids als vins al llarg del temps i modificacions compositionals fruit de reaccions bioquímiques [72]. D'igual manera, en vi sintètic els estudis evidenciaven que esterols, àcids grassos lliures, mono-, di- i triacilglicerols incrementaven la seva concentració als autolisats després de dos dies i llavors es reduïen per acció enzimàtica [55]. A més, és destacable que no s'hagi descrit la presència de fosfolípids als autolisats i això permet considerar que no es degraden, mantenint la integritat de la membrana.

Com a conclusió hom pot dir que l'envelliment produeix els següents canvis en la bioquímica cel·lular: en un començament, hi ha una excreció passiva d'aminoàcids. Després de tres mesos encara hi ha un enriquiment en aminoàcids per la hidròlisi de pèptids i proteïnes acompanyada de l'increment dels polisacàrids fruit de la degradació de la paret. Dels nous als dotze mesos, la concentració d'aminoàcids decreix. Encara, però, hi ha alliberament de pèptids i proteïnes. Paral·lelament continua el lent increment de polisacàrids, lípids i nucleòtids.

A més, altres factors que podrien afectar a l'autòlisi són el pH, la temperatura, la presència d'etanol i la naturalesa de les soques de llevat.

3.3 Compostos volàtils

Les cèl·lules de llevat han mostrat la capacitat de retenir volàtils a la paret [38], així com una gran diversitat de compostos entre els que trobem micotoxines, pesticides, additius, amines biògenes i fenols [56].

Lubbers *et al.* [38] van avaluar la capacitat de la paret dels llevats per a la retenció de compostos volàtils d'interès en enologia. Les parets aïllades de les *lies* es van posar en contacte amb una solució model amb propietats similars al vi, que contenia concentracions conegudes d'aromes. Després de 12 hores a 30°C es va determinar el repartiment dels compostos. L'estudi va concloure que les parets de llevat eren capaces d'adsorbir volàtils de diversa natura, però que ho feien de manera diferencial depenent de la polaritat de les molècules, existint predilecció per les molècules més polars. D'altra banda, estudiant l'efecte de les parets associades a lípids de membrana, van observar que s'incrementava encara més la capacitat de retenció de volàtils. Aquests estudis fan pensar que les cèl·lules de llevat podrien adsorbir aromes al llarg de la fermentació i la cria dels vins escumosos. La capacitat dels llevats per eliminar alguns compostos amb efectes sensorials negatius, tals com els fenols volàtils (4-etilguaiacol i 4-etilfenol), en vins i medi artificial, va ser estudiada per Chassagne *et al.* [15]. L'aproximació analítica implicava la determinació del romanent de la substància d'interès després d'un període de contacte amb les cèl·lules. Els llevats eren capaços d'eliminar part d'aquests compostos no desitjats en un període curt de temps (aprox. 3h) i de manera eficaç (més del 25%). A més, hom va observar que la capacitat de retenir compostos depenia directament de l'estat autolític de les cèl·lules i inversament del pH, de la temperatura i del contingut d'etanol del medi, ja que valors més alts implicaven una menor retenció de volàtils. Per altra banda, s'ha observat que existeix dependència entre la soca, el medi on es fan créixer les cèl·lules i el procés de conservació de la biomassa i la capacitat per retenir fenols [52, 53].

Els mecanismes de retenció per part del llevats encara no han estat elucidats. Tanmateix, s'ha proposat que les mannoproteïnes són les que tenen un paper primordial i, entre aquestes, sembla que poden existir grups amb més especificitat [52].

En un estudi realitzat sobre un vi elaborat amb varietats de raïm blanc, es va comparar el mateix producte sotmès o no a cria en contacte amb les *lies* [5]. Aquestes eren les pròpies del procés fermentatiu, *lies* comercials o una mixtura d'ambdues. Així, hom va mostrar canvis en el perfil aromàtic i en les característiques organolèptiques dels vins

degut al contacte amb les cèl·lules de llevat durant 2 i 7 mesos. S'avaluava, de manera indirecta, la capacitat de les *lies* per a l'adsorció de volàtils. Al contrari del que cabria esperar, el contacte amb les mares no només no redueix la concentració de volàtils, sinó que implica un increment. Això podria ésser degut a l'efecte dels compostos alliberats durant l'autòlisi i a l'activitat dels diferents enzims de les cèl·lules. Una altra teoria, en consonància amb els resultats exposats al present treball, explicaria l'increment pel progressiu alliberament dels volàtils retinguts a la cèl·lula fruit de la degradació de la paret i el consegüent canvi en les seves propietats superficials.

D'altra banda, Bueno *et al.* [12] van trobar dependència entre les varietats de vi i l'efecte de les *lies* sobre els volàtils; de manera que per la varietat Airen s'incrementava la concentració de la majoria d'aromes i, en canvi, la varietat Macabeo mostrava una disminució.

Des del punt de vista metodològic, cal tenir en compte que totes les aproximacions experimentals exposades anteriorment es basen en una anàlisi indirecta de la part no adsorbida de compostos per la lia. Només Kotseridis i Baumes [35] van realitzar una determinació d'odorants a llevats dessecats mitjançant extracció amb diclorometà, que és un dissolvent altament penetrant capaç d'extreure molts dels components sense respectar la integritat cel·lular. Per tot això, seria de gran utilitat disposar de mètodes específics per a l'anàlisi de compostos aromàtics a la superfície de les *lies* que preservessin la seva estructura.

3.4 Compostos antioxidants

3.4.1 Activitat de les *lies* contra l'enfosquiment dels vins

Ibern *et al.* [27] van estudiar els canvis en el color dels vins i en seu perfil de polifenols, deguts a l'efecte del contacte amb les *lies*. El treball proposava una doble acció de les *lies*: d'una banda, en els primers mesos d'envelliment, les cèl·lules adsorbrien els polifenols reduint la seva concentració i la coloració que se'n deriva; això s'esdevindria un cop pas-

sats 12 mesos i fins als 18. D'altra banda, els autors consideren que els enzims alliberats per la cèl·lula s'encarregarien de modificar el perfil de fenols del vi incrementant-ne la concentració.

Molt recentment, al treball dut a terme per Bosch-Fusté *et al.* [10], s'avaluen les modificacions sobre el color i el perfil de polifenols que es donen als vins escumosos durant un test accelerat i l'efecte protector de les *lies*. Els caves es van incubar a 37 °C al llarg de 13 setmanes, paral·lelament amb *lies* i sense. Una altra variable que es va tenir en compte va ser la composició de l'espai de cap a les ampelles, assajant-se el CO_2 i l' O_2 com a gasos per a testejar.

Posteriorment, es va analitzar el perfil en polifenols i les absorbàncies a 280, 320 i 420 nm. Hom va poder constatar que es reduïa la quantitat dels àcids hidroxicinàmics i que s'incrementava la quantitat de compostos acolorits al llarg del temps (absorbància a 420nm). A més, es va poder posar de manifest que en condicions oxidants les *lies* protegien de l'enfosquiment als vins. Aquest resultat eren molt similars als obtinguts per Razmkhab *et al.* [57] i Lopez-Toledano *et al.* [37] en condicions reals o accelerades sobre vins blancs. En particular, Razmkhab *et al.* [57] van observar que la cèl·lula completa era més eficaç que no pas la paret aïllada en el procés d'adsorció de les substàncies amb color. Com a explicació hom va aduir que les parets aïllades podrien formar estructures que amaguessin punts d'unió als polifenols.

En conclusió, sembla que, tot i que els vins augmenten la seva coloració al llarg del temps, la presència de cèl·lules de llevat pot reduir la velocitat del procés significativament.

3.4.2 Les *lies* com a agent antioxidant

Les *lies* poden exercir el seu efecte antioxidant mitjançant tres mecanismes principals:

- Acció d'enzims i de biomolècules alliberats durant l'autòlisi
- Acció de lípids de membrana

- Acció d'elements constitucionals o adsorbents de la paret del llevat

Enzims i biomolècules amb potencial efecte antioxidant

Santiago *et al.* [62] van estudiar el potencial antioxidant de la fracció enzimàtica i no enzimàtica dels llevats de panificació (*S. cerevisiae*). De llur treball s'extreu que els enzims relacionats amb la capacitat reductora són: la superòxid dismutasa, la catalasa, la peroxidasa i existeix participació del glutatió; més tard, Demasi *et al.* [18] inclouen la tioredoxina peroxidasa I citosòlica amb efecte similar.

En relació amb això, Pinheiro *et al.* [50] van estudiar els canvis sobre l'expressió d'enzims en el llevat *Kluyveromyces marxianus* en exposar-lo a condicions altament estressants derivades del contacte amb tòxics o alta pressió de gasos. La superòxid dismutasa i la glutatión reductasa, ambdós relacionats amb l'eliminació d'elements oxidants, veuen augmentada la seva activitat a causa de les condicions d'estrès.

Dels experiments anteriors es pot deduir que les *lies*, un cop deixen de ser viables, podrien contenir enzims capaços d'exercir funcions antioxidants si la part intracel·lular entra en contacte amb la part extracel·lular. Així, part del paper protector dels llevats de segona fermentació al llarg de la rima el podríem atribuir a aquests enzims. En contra d'això, hom ha de tenir en compte que durant l'elaboració d'escumosos les condicions són més aviat reductores i l'expressió dels gens anteriors podria estar, doncs, inhibida. A més, la paret dels llevats roman més o menys íntegra durant llargs períodes de temps [51] i podria limitar la sortida d'aquestes proteïnes. En conclusió, pel que fa al paper de la maquinària enzimàtica en la protecció contra la oxidació, hom no pot garantir que la contribució potencial dels llevats es doni *de facto*.

Acció de lípids de membrana

Alguns tipus de vins se sotmeten a un envelliment en contacte amb les mares i restes vegetals [22]. Salmon *et al.* [60] es van proposar estudiar l'impacte de la membrana

plasmàtica dels llevats sobre la concentració d'oxigen al medi. El treball es basava en l'evidència que les *lies* són capaces de consumir importants quantitats d'oxigen dissolt al vi [22]. Les modificacions de la membrana derivades de la interacció amb l'oxigen es van avaluar mitjançant la determinació de les espècies reactives d'oxigen (ROS), i per anàlisis indirectes dels canvis a la composició de la doble capa lipídica de la membrana [60]. Sembla que els lípids de membrana i els constituents de les lipoproteïnes s'alteren prenent l'oxigen dissolt del vi.

L'efecte protector de la membrana contra l'oxidació té alguns punts que mereixen ésser tinguts en compte. En primer lloc, tot i existir una correlació entre l'aparició de ROS a la cèl·lula i la desaparició de l'oxigen dissolt al vi, no està clar que sigui aquest un mecanisme únic. Altres elements, com la paret cel·lular o molècules adsorbides a la superfície de les *lies*, podrien igualment tenir un paper rellevant en la protecció contra l'oxigen. Finalment, per bé que els lípids fan davallar la concentració d' O_2 del medi, un cop oxidats podrien contribuir a l'oxidació d'altres compostos (polifenols, altres lípids...) tenint un efecte perjudicial sobre els vins. Resulta aleshores difícil afirmar que la seva presència protegeixi els vins de l'oxidació.

Acció de elements constitucionals o adsorbits a la paret del llevat

Una primera aproximació al potencial antioxidant dels llevats es troba al treball de Santiago *et al.* [62]. Mitjançant filtració diferencial es va obtenir diverses fraccions a partir de cultius de *S. cerevisiae*. D'aquestes, tenen especial interès les fraccions no enzimàtiques, que van mostrar activitat antioxidant per diversos mètodes.

Molt relacionat amb l'exposat anteriorment, Jaehrig *et al.* [29] van dur a terme estudis on es fraccionaven molt sistemàticament les cèl·lules de llevat mitjançant la combinació de mètodes enzimàtics i fisicoquímics. De cadascuna de les fraccions s'avaluava la capacitat antioxidant, per posar de manifest quins eren els biocomponents amb més potencial antioxidant. El treball se centrava principalment en la paret cel·lular, però analitzava de

manera indirecta el citoplasma i la membrana. Pel que fa a la paret, separava l'efecte de glucans i proteïnes. D'aquest article es pot concloure que els diversos elements constitucionals de la cèl·lula tenen un paper reductor important, donant rellevància als glucans i de manera molt especial a les proteïnes. Finalment, cal tenir en compte que malgrat que els element cel·lulars puguin tenir una potencial capacitat protectora sobre el vi, cal que aquest entri en contacte amb les molècules antioxidants i, en cèl·lules senceres, podria no ésser sempre possible.

De tota manera, no s'han trobat treballs que abordin la problemàtica sobre cèl·lules crescudes en vi on participaria, d'una banda, l'acció antioxidant dels components del vi que puguin adherir-se al llevat i d'una altra, l'efecte de les diferències en la composició dels vins sobre el potencial antioxidant del llevat en ésser utilitzats com a medi de creixement. Respecte a això, es digne de menció el treball de Jaehrig *et al.* [30], on s'avaluen de manera molt específica el paper reductor dels glucans de la paret i les diferències degudes a la composició del medi en el que es desenvolupa el microorganisme. Encara que tots els medis de cultiu són artificials, hom demostra un clar efecte del substrat en l'activitat antioxidant dels fragments cel·lulars. En el camp de l'enologia, això permet especular sobre la possibilitat de diferències en llevats depenent del seu origen i de les condicions en les que es desenvolupin.

Un darrer fenomen que pot tenir efecte sobre el potencial antioxidant de les *lies* és la seva capacitat de retenir diferents compostos del medi on es desenvolupa, tal com s'ha observat per aromes [5, 12, 15, 38, 52, 53] o compostos acolorits [37, 57]. Entre aquests darrers hi ha els polifenols, que tenen una clara activitat antioxidant. Concretament, la capacitat de les *lies* per a retenir polifenols, ha estat àmpliament estudiada per Mazauric *et al.* [41, 42], tant pel que fa al perfil qualitatiu dels polifenols adsorbits, com als seus canvis quantitativs durant l'envelliment simulat. Per assajar les interrelacions que s'estableixen entre la lia i el vi, Mazauric *et al.* analitzen la davallada de polifenols en un vi enriquit, després de diferents temps de contacte amb les *lies*. L'adsorció sembla seguir una cinètica amb una primer fase d'adsorció ràpida i una segona més lenta fins a saturar tots els llocs

d'unió. A més, van observar que existia especificitat per a l'absorció d'antocianines i que aquesta es feia en determinats dominis de la paret del llevat. En un estudi posterior, Mazauric *et al.* [42] extreuen de la superfície cel·lular els polifenols i fan una determinació més detallada, tant de la força amb la que aquests s'uneixen a la paret com de la quantitat relativa de cada família.

Com a conclusió, es pot afirmar que el poder antioxidant de les *lies* és el resultat de la suma d'elements alliberats per la cèl·lula i del contacte directe entre la cèl·lula i el substrat. Tot i que existeixen moltes molècules candidates a tenir un paper fonamental en l'envelliment dels vins, la seva accessibilitat és un factor primordial per considerar-les elements actius en la preservació dels vins davant l'estrès oxidatiu.

3.5 Procés de floculació

Els llevats destinats al tiratge per a l'elaboració dels vins escumosos han de tenir característiques singulars: d'una banda, la fermentació té lloc dintre de l'ampolla, incrementant-se la pressió fins a les 5–6 atms; les cèl·lules, doncs, no només han de poder resistir la pressió de CO_2 , sinó que han de desenvolupar la seva activitat amb normalitat en aquestes condicions [13, 71]. D'altra banda, el llevat ha de presentar resistència a l'alcohol de bon començament puix que el medi de partida és vi amb un grau alcohòlic que pot arribar a 10°; a més, la concentració d'alcohol s'anirà incrementat durant el transcurs de la segona fermentació, creant-se condicions molt estressants per a la cèl·lula, sobretot al llarg de la fase estacionària. Finalment, les *lies* seran eliminades de l'ampolla un cop finalitzi la fase de rima mitjançant processos basats en la floculació. Per fer-ho, cal que les *lies* de cava, un cop finalitzada la criaça, es vagin dipositant de manera passiva al tap de l'ampolla (procés anomenat remogut) per ésser eliminades mitjançant el degollament; tot això amb la intenció d'obtenir un vi net [71].

A continuació, es repassarà el coneixement previ del diferents aspectes biològics i

tecnològics que afecten a la floculació, amb el benentès que la major part dels treballs s'han fet sobre llevats dedicats a la indústria cervesera. En el cas de la cervesa, el llevat és viable quan es retira del dipòsit per a ésser reinoculat. En canvi, pel que fa al cava i altres escumosos elaborats pel mètode *champenoise*, cal tenir molt present que les cèl·lules no són viables quan s'eliminen i han patit un procés de degradació que ha durat com a mínim 9 mesos [8].

Els factors que afecten a la floculació els podem dividir en tres grups:

- Origen genètic de les soques.
- Factors ambientals que modifiquin l'expressió de gens FLO i l'activació de floculines.
- Factors que afecten a les propietats fisicoquímiques.

3.5.1 Elements proteics que participen a la floculació

Les floculines són proteïnes de tipus lectina [33] situades a la superfície de les cèl·lules de llevats [9]. Estan relacionades principalment amb la floculació, tot i que s'ha observat que la floculina 1 també participa en la resposta a l'estrès cel·lular. Més concretament, les floculines generen interaccions intercel·lulars de tipus adhesiu reversibles i depenents de calci. La unió es fa mitjançant associacions selectives amb residus de mannanosa de la paret de les cèl·lules adjacents [9, 33, 67, 66, 74]. L'agregació de milers de cèl·lules s'esdevé en l'anomenat floc que precipita incrementant la netedat del medi. Una característica interessant d'aquest fenomen és que pot ésser inhibit per la presència de mannanosa al medi. El sucre satura els receptors i impedeix la interacció entre cèl·lules. Altres sucres com la glucosa, la maltosa i la sucrosa poden reduir la floculació ja que actuen sobre la floculina FLO10; tanmateix, altres membres de la família, com les floculines FLO1 o FLO5, només veuen afectada la seva activitat per la presència de mannanosa [74].

Pel que fa a l'elaboració d'escumosos, hom cerca la formació de l'agregat un cop ha finalitzat la fermentació i s'ha produït l'envelliment en rima. En aquestes condicions, la paret del llevat ha començat un procés de degradació que implica, entre d'altres

fenomens, l'alliberament de glúcids al medi [45, 46]. Això podria afectar la floculació de dues maneres: d'una banda, la mannososa lliure podria unir-se a les floculines impedit la seva activitat i, d'una altra banda, la degradació de glucans de la paret podria implicar la pèrdua de punts d'unió intercel·lulars.

Un altre aspecte interessant és l'anàlisi dels canvis que es podrien esdevenir a les proteïnes de la superfície degut a proteòlisi durant la rima [2]. La pèrdua de proteïnes de superfície, o bé la seva desnaturalització al llarg dels mesos implicaria alteracions sobre la capacitat de les *lies* de generar els floc.

Malgrat l'exposat anteriorment, fins al present treball no s'ha avaluat la importància de les modificacions de la cèl·lula sobre aspectes tecnològics, un cop deixa de ser viable.

3.5.2 Efecte del nutrients, compostos del medi i factors de creixement

La floculació de les cèl·lules de llevat no es dona fins a la fase estacionària. Està àmpliament reconegut que va lligada a situacions de manca de nutrients o altres tipus d'estrès [59]. Àdhuc, s'han observat cèl·lules de llevat floculants que perden aquesta capacitat un cop es passen a medi fresc i canvien a fase de latència [61]. De moment, no s'ha descrit el fenomen durant la fase exponencial.

Carboni i Nitrogen

Per entendre la relació entre la floculació i la presència de glúcids, és interessant fixar-se en el sistema de regulació del gen FLO1. S'ha demostrat que el gen està sota la influència del complex repressor Tup1-Ssn6 [64]. Aquestes proteïnes han estat identificades en diversos estudis relacionats amb la regulació genètica dels llevats que es reproduïen per gemmació. La deleció d'aquests gens no és deletèria però genera fenotips relacionats amb la velocitat de creixement o el control de la floculació. Aquests gens actuen com a repressors regulats per glucosa i aquest glúcid s'ha mostrat capaç d'actuar inhibint la floculació [61]. Un altre element de regulació als llevats és la caixa GCN4 on s'uneixen

repressors en resposta a concentracions de nitrogen [63].

Així, és comprensible que durant les fases de latència i exponencial, en les que existeix abundància de nutrients, els llevats inhibeixen la producció de floculines. A la fase estacionària, que es caracteritza per l'exhauriment dels recursos, s'activaran tots aquests gens inhibits pel complex Tup1-Ssn6, entre els que trobem les floculines.

Si ens centrem en la segona fermentació d'escumosos pel mètode tradicional, hom pot observar que es tracta d'un sistema tancat. Al començament, s'afegeix el cultiu iniciador i una font de carboni (xarop de glucosa) [58]; el vi fermenta, la viabilitat del cultiu va reduint-se fins a ésser pràcticament nul·la en 1-3 mesos [46]. És esperable que la producció de floculines a les cèl·lules de llevat de cava sigui molt alta si bé no s'ha estudiat encara.

Oxigen i Etanol

L'efecte de l'oxigen en la floculació va ser estudiat per Straver *et al.* [65] en llevats de la indústria cervesera. En el seu estudi, es va relacionar l'efecte de la concentració d'oxigen amb la capacitat de floculació de cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae*; a més, es va relacionar aquest factor amb la hidrofobicitat de les cèl·lules. Sembla que per a l'elaboració de cervesa, la falta d'airejament a l'inòcul inicial dificulta el desenvolupament de cèl·lules i la seva floculació. Un fenomen molt similar succeeix en els escumosos, on es recomana que l'ampliació de l'inòcul inicial es faci en un medi amb prou airejament (aproximadament 2 – 3 g/L d' O_2) [13]. A més, tot i que la fermentació s'esdevingui sense possibilitat de renovació d'oxigen, cal que el vi base estigui correctament oxigenat per garantir una fermentació en condicions adequades [13]. Tantmateix, el treball de Straver *et al.* [65] va més enllà, ja que mitjançant la suplementació del most de cervesa amb àcids grassos, el cultiu va recuperar l'efecte degut a l'oxigenació. Els autors plantegen, doncs, la hipòtesi que l'efecte del oxigen seria indirecte i a causa del seu paper en la síntesi d'àcids grassos i esterols.

Claro *et al.* [17] van avaluar l'efecte de l'etanol 1%, 3% or 5% (v/v) sobre la capacitat per a la floculació, i van concloure que en concentracions moderades l'etanol actuava de

manera positiva. Aquests resultats estaven en consonància amb treballs previs [31, 61]. Tanmateix, en incrementar la concentració d'etanol sembla que les cèl·lules perden la viabilitat i l'estabilitat de la paret. En el cas dels llevats per a l'elaboració de vins escumosos, l'efecte de l'etanol té sentit en acabar la segona fermentació estimulando la producció de floculines, que romandran durant l'envelliment dels escumosos un cop les cèl·lules deixin d'ésser viables. A més, les soques de segona fermentació han estat especialment seleccionades per la seva resistència a l'etanol i han passat per diversos passos d'adequació al creixement en aquestes condicions.

Ions

Smit *et al.* [63] van estudiar l'efecte de diferents tractaments sobre una soca de llevat per a la preparació de cervesa. Per exemple, l'ús de quelants iònics com l'EDTA inhibia clarament la floculació. D'altra banda, el fenomen es veia àmpliament promocionat afegint Ca^{+2} al medi. Nogensmenys, mitjançant l'addició de $CaCl_2$ no es promocionava la floculació de manera espontània si no s'havia arribat a la fase estacionària. Els ions de calci, tot i que participen de la floculació, requereixen de les modificacions estructurals que es donen a la superfície de la cèl·lula a l'inici de la fase estacionària.

3.5.3 Efecte de paràmetres físics

La dinàmica de floculació dels llevats en cultiu i la correlació amb propietats fisicoquímiques de la superfície cel·lular, com són la hidrofobicitat i la motilitat electroforètica, van ésser abordats per Smit *et al.* [63]. Primerament, l'observació microscòpica de l'agregació cel·lular en una emulsió de dissolvent orgànic en aigua, va permetre concloure que les cèl·lules de llevat són altament apolars i s'associen fàcilment a les gotes de dissolvent. Van observar, a més, un ràpid increment de la hidrofobicitat cel·lular un cop acabava la fase exponencial que coincidia amb el canvi de comportament de no floculant a floculant. L'estreta relació entre la capacitat per flocular i la hidrofobicitat

es va confirmar mitjançant tractaments amb polications (quitosan i polilisina). Aquests provocaven un increment de la hidrofobicitat correlacionat amb canvis a la capacitat per flocular. Finalment, es va avaluar l'efecte de l'ús de proteases sobre els paràmetres físics, i hom va poder concloure que les proteïnes de la superfície eren, al menys en part, responsables dels valors d'hidrofobicitat i del fenomen de la floculació. Pel que fa a la motilitat electroforètica, no va mostrar valors significatius en relació amb la floculació. L'efecte de la hidrofobicitat sobre la capacitat de flocular dels llevats va ser confirmada pel treball d'Straver *et al.* [68]. Tanmateix, en el seu estudi, proposen que el metabolisme d'àcid grassos insaturats i esterols pot tenir un paper molt rellevant per començar la floculació, puix que la pèrdua de capacitat per flocular de cèl·lules crescudes en medis poc airejats pot veure's compensada per l'addició de Tween80 i ergosterol. Malgrat que podria existir un paper específic d'aquests lípids, el fenomen sembla àmpliament relacionat amb la presència de floculines [9, 33, 67, 66, 74]. Molt relacionat amb la hidrofobicitat, Mercier-Bonin *et al.* [43] van fer un estudi sobre les propietats fisicoquímiques de les cèl·lules de *S. cerevisiae* relacionades amb la seva capacitat d'adherir-se a superfícies utilitzant un sistema model. En aquest estudi, es posa de manifest l'existència d'una relació molt estreta entre la hidrofobicitat de les cèl·lules i el seu comportament àcid-base. Més concretament, les cèl·lules més apolars semblen presentar comportament base de Lewis (aquest comportament es mesura pel seu caràcter electró-donador). La mateixa tendència fou observada per llevats desenvolupats en condicions enològiques [52, 53]. Altres espècies de llevat com *Yarrowia lipolytica* han mostrat també aquesta relació entre propietats tals com àcid-base i hidrofobicitat [3]. En aquest cas, les propietats superficials dels llevats s'atribueixen a la seva composició en proteïnes ja que el tractament amb proteases les modifica.

Recentment, Pradelles *et al.* [52] han estudiat l'efecte de les proteïnes sobre les propietats superficials dels llevats mitjançant l'ús de soques mutants, que tenien afectada la síntesi de la paret per manca d'elements constitucionals, o bé per problemes als processos de la seva biosíntesi. En aquest estudi, van concloure que els canvis a les mannopteïnes de la

paret impliquen canvis a la hidrofobicitat, al potencial electró-donador i al potencial ζ . S'espera que els canvis a aquestes característiques fisicoquímiques de la superfície de les cèl·lules afectin a la capacitat d'agregació dels microorganismes.

En conclusió, sembla que les proteïnes tindrien un doble paper; d'una banda, les floculines establirien ponts entre cèl·lules adjacents mitjançant interaccions proteïna - mannosà. I, d'una altra part, la composició proteica de la superfície cel·lular generaria un entorn hidrofòbic que afavoriria l'agregació.

CAPÍTOL 4

Metodologia i pla de treball

4.1 Mostreig

Hom ha fet servir caves en rima amb temps d'envelliment que s'allargaven fins als 40 mesos, a fi d'establir la possible influència dels canvis a les *lies* al llarg del temps sobre el vi escumós resultant.

Les mostres de *lies* s'han obtingut d'escumosos durant la rima procedents de diferents cupatges de vins i amb diferents períodes de cria. Per cadascun dels cupatges, es van aïllar les *lies* en diferents moments de l'envelliment. Els punts de mostreig es corresponen amb períodes representatius de les diferents categories de caves: “Cava” (≥ 9 mesos), “Reserva” (≥ 18 mesos) i “Gran Reserva” (≥ 30 mesos); també s'han analitzat *lies* de vins escumosos joves (< 9 mesos). Tots els productes s'han elaborat a escala industrial a la Bodega Freixenet.

Les *lies* han estat separades dels caves mitjançant centrifugació (7500 rpm, 10 min a 4 °C) i s'han analitzat en fresc per cadascun dels punts de mostreig. D'altra banda, els caves s'han conservat congelats per al seu posterior anàlisi.

Per tal de donar resposta als dos objectius específics de la tesi, el treball s'ha organitzat en dues parts:

PRIMERA PART. S'ha provat de fer una descripció detallada de la ultraestructura de les cèl·lules de llevat de segona fermentació i dels canvis esdevinguts al llarg de la rima. Per fer-ho, s'ha utilitzat microscòpia electrònica de transmissió. Les micrografies han estat obtingudes després de la criofixació i la criosubstitució de les

mostres de manera que hom pot garantir la màxima preservació de l'estructura.

SEGONA PART. Per estudiar els canvis fisicoquímics a les *lies* al llarg de la rima, aquesta part s'ha dividit en tres subapartats:

1. Disseny d'un mètode analític basat en microextracció en fase sòlida a l'espai de cap (HS/SPME) per a la determinació dels compostos adsorbits a les *lies* de segona fermentació.
2. Adaptació de mètodes analítics per a la determinació de l'activitat antioxidant a les *lies* a fi de quantificar el potencial reductor de les *lies* i establir els canvis que s'esdevenen al llarg del temps.
3. Anàlisi de les propietats superficials de les cèl·lules de llevat al llarg de temps i correlació amb canvis a la composició de la superfície de les *lies* analitzada mitjançant *time of flight, secondary ion mass spectrometry* (TOF-SIMS).

4.2 Primera part: Estudi ultraestructural dels canvis a les *lies* de segona fermentació al llarg de la rima

Per entendre com la cria afecta a les *lies* de segona fermentació i com aquests canvis poden tenir repercussions en els vins, es va realitzar un estudi dels canvis ultraestructurals que s'esdevenen a les cèl·lules de llevat al llarg de la rima mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (TEM); les mostres es van fixar mitjançant congelació a alta pressió (HPF) i es va aplicar criosubstitució (FS) com a fase de deshidratació [47].

La mateixa soca de *Saccharomyces cerevisiae* es va fer servir com a peu de cuba per a l'elaboració de tres caves provinents de tres cupatges de vi diferents. D'aquesta manera, es va avaluar si existien diferències perceptibles a l'estructura de la cèl·lula pel fet d'haver-se desenvolupat en vins diferents. Els escumosos resultants es van mostrejar als 9, 17 i 30 mesos en rima. La ultraestructura es va comparar amb la de la cèl·lula viable per establir com el temps afectava als diferents compartiments cel·lulars.

El procés de fixació de les *lies* per a la seva observació en TEM cerca mantenir, tant com sigui possible, l'estructura nadiua de la mostra. La HPF fa servir congelació amb nitrogen líquid a molt altes pressions (aprox. 2000 bar), de forma que es vitrifica l'aigua de la mostra i s'immobilitza el contingut cel·lular de manera molt ràpida i eficient. Posteriorment, durant la criosubstitució, el gel vitrificat de la mostra se substitueix per un dissolvent orgànic; tot el procés es porta a terme a baixes temperatures ($-90\text{ }^{\circ}\text{C}$) [11]. Per aquest estudi hom ha seleccionat la fixació mitjançant HPF puix que presenta diversos avantatges tals com: la major velocitat de fixació i la fixació a molt baixa temperatura, evitant-se així el malmetement de la mostra a causa del temps de processat i la formació de cristalls de gel. Aquests darrers alterarien enormement la ultraestructura de la mostra, ja que la congelació lenta produeix una segregació entre l'aigua i els soluts; i els cristalls que es generen tenen uns efectes desastrosos sobre la integritat cel·lular. En el pitjor dels casos, es trenquen les membranes i es destrueixen els orgànuls. Tanmateix, en les condicions de treball de la HPF, el gel no cristal·litza sinó que es manté en un estat amorf i garanteix l'estabilitat del material sense necessitat de crioprotectors; és l'anomenat estat vitri de l'aigua [70].

Un altre avantatge de la immobilització ultraràpida està en el fet que garanteix que l'efecte dels canvis en l'estat energètic del sistema afecten molt poc a l'estat natural de les molècules; per això, el resultat és molt semblant a l'estructura originària [69]. D'altra banda, l'aplicació de pressió durant el procés actua incrementant la viscositat de l'aigua fent més efectiu el procés de fixació en profunditat.

Finalment, cal remarcar que tot el procés de fixació es fa mitjançant temperatura sense participació directa de dissolvents orgànics. Aquests presenten especificitat per determinades biomolècules, de manera que n'hi ha altres (normalment, les de pes molecular més baix) que queden excloses de la fixació i es poden perdre durant el tractament de la mostra [69].

4.2.1 Soques de llevat

S'han fet servir llevats de segona fermentació, pertanyents a la mateixa soca de l'espècie *Saccharomyces cerevisiae*, proveïts per les bodegues Freixenet. Els cultius de reserva s'han mantingut en estries en tubs amb agar inclinat en medi YPD (Pronadisa Lab. Conda, Madrid, Spain).

4.2.2 Vins escumosos

Els vins escumosos van ésser elaborats pel mètode tradicional a escala industrial i envellits en celler en contacte amb les *lies* de segona fermentació (14 – 15°C). Els vins d'aquest estudi provenen de tres cupatges diferents (A, B i C). Per cadascun dels cupatges, es van aïllar les *lies* en diferents moments de l'envelliment. Els punts de mostreig es corresponen amb períodes representatius de les diferents categories de caves: “Cava” (≥ 9 mesos), “Reserva” (≥ 18 mesos) i “Gran Reserva” (≥ 30 mesos).

4.2.3 Obtenció del pèl·let de *lies*

El contingut de com a mínim 3 ampolles es va centrifugar durant 15 min a 4500 rpm i a 4 °C (Rotina 48CR); el pèl·let es va rentar tres cops amb 30 mL de NaCl 0,9% (Panreac, Barcelona, Spain). Finalment, les *lies* es van conservar en fred fins al seu processat (menys de 2 hores) i els sobrenedants es van congelar (40°C per a posteriors estudis).

4.2.4 Tractament de les mostres per a l'observació amb TEM

Crioifixació Els pèl·lets de llevat es van transferir a plaques de 1,5 mm de diàmetre i 200 μm de profunditat i van ésser immobilitzats immediatament amb crioifixació d'alta pressió mitjançant l'ús d'un equip *Leica EMPact* (Leica, Viena, Austria). Després, hom els va mantenir emmagatzemats en nitrogen líquid (−90 °C) fins a ésser utilitzats.

Criosubstitució La criosubstitució de l'aigua es va realitzar incubant les *lies*, en primer lloc, en acetona anhidra amb OsO_4 al 2 % i acetat d'uranil 0,1% durant 3 dies a -90 °C. Finalment, hom va pujar la temperatura de les mostres fins a temperatura ambient a un ritme de 5°C per hora.

Preparació de blocs, tall i observació La infiltració en resina Epon es va fer després de diversos rentats amb acetona. Les mostres es van posar en contacte amb la resina durant 2 dies, i després es va procedir a la polimerització a 60 °C durant 48 hores.

Les seccions ultrafines es van obtenir mitjançant un ultramicròtom Leica Ultracut UCT (Leica, Viena, Austria) i es van muntar sobre reixetes de coure cobertes de resina *Formvar*. L'observació de les mostres es va fer en un microscopi electrònic de transmissió JEM-1010 (Jeol, Japan), als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

4.3 Segona part: Estudi de les modificacions a les característiques fisicoquímiques dels llevats durant la cria

4.3.1 Estudi de les modificacions de les propietats superficials de les *lies* al llarg de la rima i el seu efecte sobre la floculació

La capacitat de les *lies* per generar un flocul compacte i fàcilment eliminable durant el degollament és una característica essencial de les cèl·lules de llevat. Per comprendre com el temps afecta a la capacitat de floculació dels llevats, és molt important establir de quina manera es modifiquen les propietats superficials de les cèl·lules durant la rima. D'igual manera, cal conèixer quins elements estructurals poden ésser responsables d'aquesta variació.

L'ús de espectrometria de masses d'ions secundaris amb detecció de temps de vol (TOF-SIMS), ha permès la caracterització de la composició de la superfície de les *lies* de llevat

i el seguiment de molècules d'interès al llarg de la cria, per entendre quins elements de la paret dels llevats podrien tenir un paper rellevant en el canvi a les propietats fisicoquímiques de les *lies*.

En l'anàlisi de TOF-SIMS, la superfície d'estudi és bombardejada amb un feix de ions d'or, i els ions secundaris que es generen fruit de la col·lisió són analitzats mitjançant un detector TOF. Atès que es pot focalitzar el feix primari de ions, és possible caracteritzar superfícies amb molt alta resolució (aprox. $0,1\mu\text{m}$).

Atenent a l'esmentat anteriorment, en aquesta part del treball:

1. S'han analitzat mostres amb períodes de cria equivalents a les categories de vins escumosos: *Cava*, *Reserva*, *Gran Reserva* i vins al començament de l'autòlisi.
2. S'ha analitzat el caràcter electró-donador i electró-acceptor de les *lies*, així com la seva hidrofobicitat mitjançant l'adhesió a dissolvents orgànics determinada per mètodes espectrofotomètrics.
3. S'ha determinat el potencial ζ de les *lies* mitjançant el càlcul de la motilitat electroforètica.
4. S'han determinat les modificacions a la mida de les *lies* per mitjà de mesures d'impedància de les cèl·lules en suspensió.
5. S'han analitzat les modificacions a la composició química de la superfície de les *lies* mitjançant l'anàlisi TOF-SIMS.

4.3.2 Efecte del contacte de les *lies* amb la fracció volàtil dels vins escumosos

A efecte d'establir quines són les aromes característiques retingudes a les *lies*, s'ha posat a punt un mètode basat en microextracció en fase sòlida a l'espai de cap (HS/SPME) per optimitzar l'extracció de compostos volàtils. Aquests s'han separat mitjançant cromatografia de gasos i s'han identificat per espectrometria de masses, per mitjà de

la interpretació dels espectres de masses i per comparació amb estàndards.

El HS/SPME és una tècnica de preparació de mostra per a l'anàlisi de volàtils, senzilla, ecològica i econòmicament rendible ja que no requereix de l'ús de dissolvents orgànics. En aquesta tècnica, la mostra s'introdueix en un recipient on es deixa un espai buit (l'espai de cap); en aquest espai s'exposa una fibra, que pot ésser de diferents recobriments depenent de l'analit a extreure, de manera que s'estableixen equilibris de repartiment entre la mostra i l'espai de cap i entre l'espai de cap i la fibra. La quantitat d'analit a la mostra és proporcional a la quantitat d'analit adsorbit a la fibra; així, mitjançant l'acoblament de la fibra a un cromatògraf de gasos, és senzill separar els compostos extrets. Els resultats milloren encara més si la detecció es fa mitjançant un espectròmetre de masses, ja que s'obté informació sobre patrons de fragmentació essencial per a la posterior identificació dels compostos.

El temps necessari per establir els diferents equilibris varia segons les característiques del compost, la fibra i la temperatura d'extracció. Globalment, es tracta d'una tècnica senzilla i ràpida, i molt escaient en l'anàlisi de volàtils. Tanmateix, la seva repetibilitat i sensibilitat depenen d'escollir les condicions òptimes per a l'extracció i mantenir-les constants.

En la posada a punt del mètode, s'han estudiat les condicions més òptimes per a l'extracció dels volàtils adsorbits a la superfície de les *lies*:

1. S'ha realitzat un Disseny Experimental Factorial a Multinivell en el qual s'ha tingut en compte el volum i el pH de la suspensió de llevats així com la temperatura d'extracció.
2. S'ha establert el pes de mostra òptim per maximitzar el senyal dels compostos volàtils sense arribar a saturar la fibra, de manera que fos possible observar les diferències entre mostres.

4.3.3 Propietats antioxidants de les parets dels llevats

La capacitat de protegir de l'enfosquiment i de l'aparició d'olors relacionades amb l'oxidació són uns altres dels aspectes importants pel que fa a la relació de la lla amb els seus vins. El mètode d'activitat reductora del ferro en plasma (FRAP) [6] i el del 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) [44] són tècniques espectrofotomètriques rutinàries en l'anàlisi del potencial antioxidant d'aliments i additius. El mètode de FRAP detecta exclusivament l'efecte d'antioxidants que funcionin per transferència d'electrons; en canvi, el de DPPH inclou les molècules que actuen per transferència d'electrons i/o de protons. La combinació d'ambdós permet especular sobre l'origen de les molècules antioxidants a la superfície de les *lies*.

En aquesta part de la tesi:

1. S'han adaptat els mètodes de DPPH i FRAP per al seu ús amb *lies* de cava i s'han aplicat sobre mostres en rima amb períodes de cria equivalents a les categories: *Cava*, *Reserva*, *Gran Reserva* i vins escumosos després de la segona fermentació.
2. S'han analitzat els tiols pel mètode d'Egwim i Gruber [20], i els polifenols pel mètode de Folin-Ciocalteu (FCR) després d'una extracció metanòlica.
3. S'ha determinat el potencial antioxidant dels extractes metanòlics per conèixer el percentatge d'activitat derivada de la capacitat de les *lies* per adsorbir polifenols.
4. S'ha aplicat anàlisi estadístic sobre les mostres per determinar les diferències del potencial antioxidant de les *lies* als diferents períodes d'envelliment.

CAPÍTOL 5

Resultats i discussió

5.1 Canvis ultraestructurals al llarg de la rima

L'objectiu d'aquest estudi és conèixer els canvis a la ultraestructura de les cèl·lules de llevat durant la criança del cava, mitjançant l'ús d'imatges de TEM després de la criomobilització de les mostres de *lies* amb HPF seguida de la substitució en fred.

5.1.1 Ultraestructura general del llevat viable del peu de cuba

La ultraestructura de la soca de *Saccharomyces cerevisiae* utilitzada en aquest estudi és molt similar a la reportada per altres autors en treballs sobre diferents espècies de llevat [48, 47, 75] (Fig. 5.1). La membrana cel·lular (MC) embolcalla el citoplasma (Fig. 5.1A) i per sota es troben altres estructures citoplasmàtiques tals com: ribosomes (R) (Fig. 5.1A), un gran vacúol (V) amb agregats de polifosfats (P) i el nucli (N) amb el nuclèol (Nu) (Fig. 5.1B). Específicament al nucli (Fig. 5.1C), es distingeixen els porus nuclears (PN), el cos polar del fus (*spindle pole body* (SPB)) i la doble envolta nuclear (EN). Finalment, destaquen els mitocondris (M)(Fig. 5.1D) amb un nombre limitat de crestes tal i com s'espera de cèl·lules desenvolupades en anaerobiosi [51].

La micrografia de la paret del llevat (Fig. 5.1A) revela l'existència, d'una banda, d'una capa externa més densa als electrons (PCE), perpendicular a la membrana citoplasmàtica i formada per material microfibril·lar; i, de l'altra, d'una capa interna transparent als electrons (PCI) [47]. Durant la criosubstitució, les *lies* es tracten amb OsO_4 i acetat d'uranil (apartat 4.2.4). Aquestes substàncies proporcionen un contrast positiu a la major part de les estructures cel·lulars, entre les quals destaquen: l'ADN, els mitocondris, les

proteïnes i els fosfolípids [11]; i queda exclòs, entre d'altres, el glucà de la paret cel·lular del llevat. La PCE, més contrastada, es correspondrà amb la zona on es concentren les manoproteïnes i la PCI, més clara, estarà relacionada amb la part rica en glucà (Fig. 5.1A).

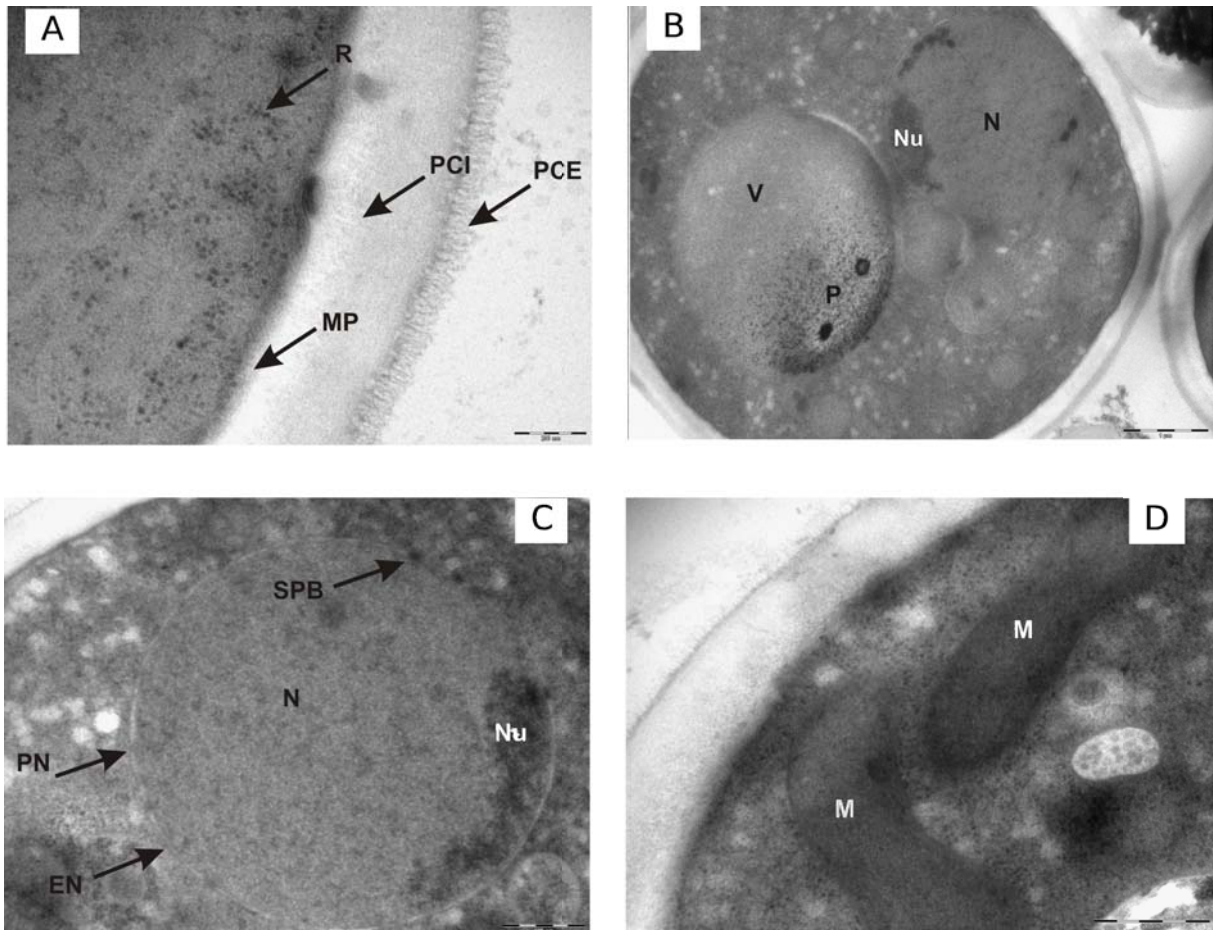


Figura 5.1: Micrografies obtingudes mitjançant TEM mostrant la ultraestructura dels llevats viables en el moment d'ésser inoculats a l'ampolla de cava. Escala = 200 nm (A), 1 μ m (B), 500 nm (C, D).

5.1.2 Evolució de la ultraestructura durant la cria

Per a l'estudi ultraestructural de les *lies* de cava, cal tenir molt present que s'observa molta heterogeneïtat entre les cèl·lules de les preparacions independentment de període d'estudi (Fig. 5.2A, C, E). Això pot ésser degut a que, d'una banda, no totes les cèl·lules moren alhora i, per tant, per un mateix temps de mostreig hi haurà cèl·lules en diferents

estats del procés d'autolisi; i, d'una altra banda, les mostres es tallen en seccions ultrafines per a la seva observació al microscopi electrònic i per aquesta raó, apareixeran diferents seccions cel·lulars. Només a partir de l'anàlisi de moltes preparacions ha estat possible plantejar una proposta dels canvis que es poden estar esdevenint a les *lies* durant la rima.

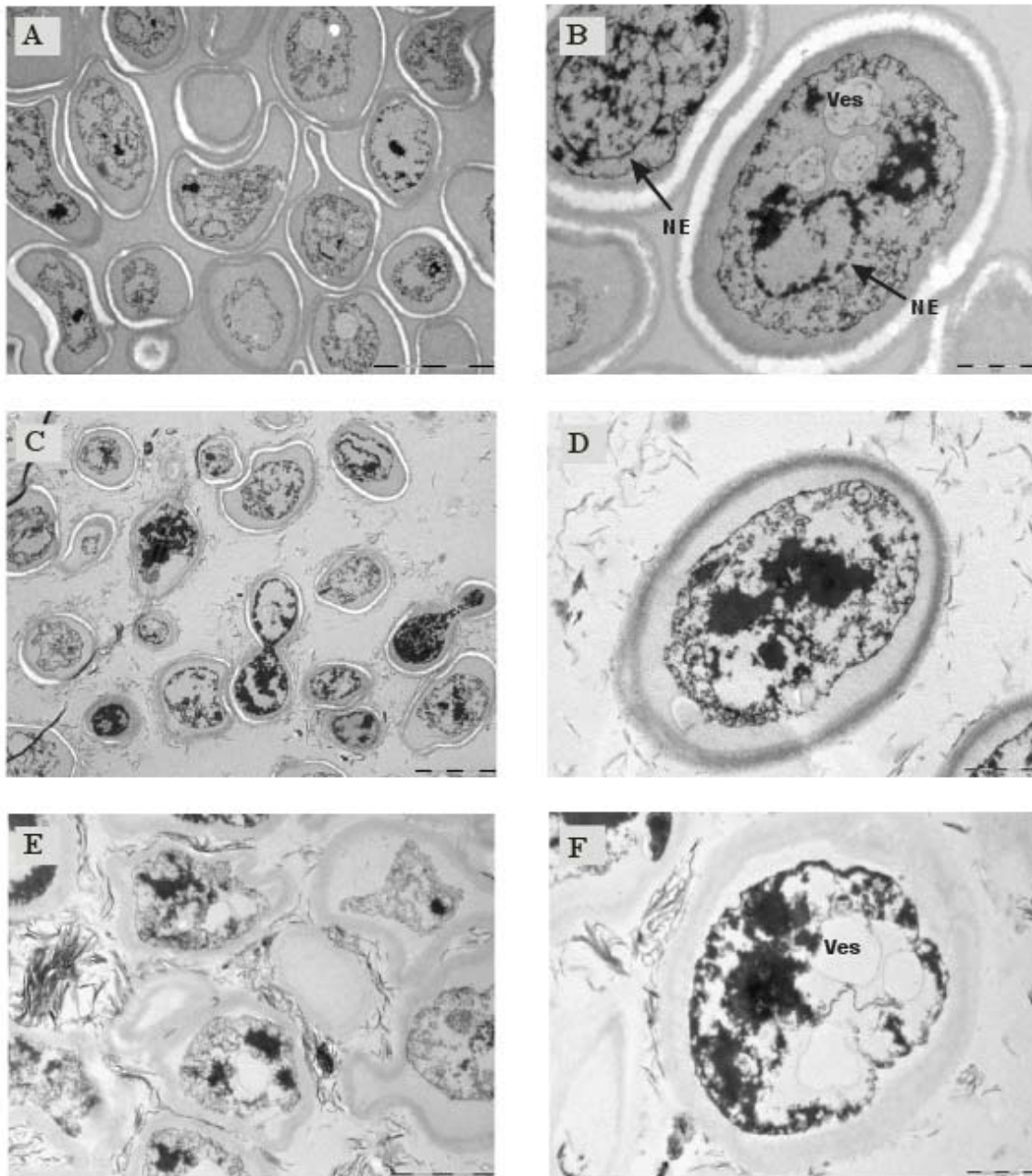


Figura 5.2: Imatges de TEM mostrant l'evolució ultraestructural dels llevats durant la cria. *lies* de llevat de segona fermentació un cop transcorreguts 9 (A, B), 17 (C,D) i 30 (E,F) mesos de cria. Escala = 5 μm (A, C), 2 μm (E), 1 μm (B, D, F).

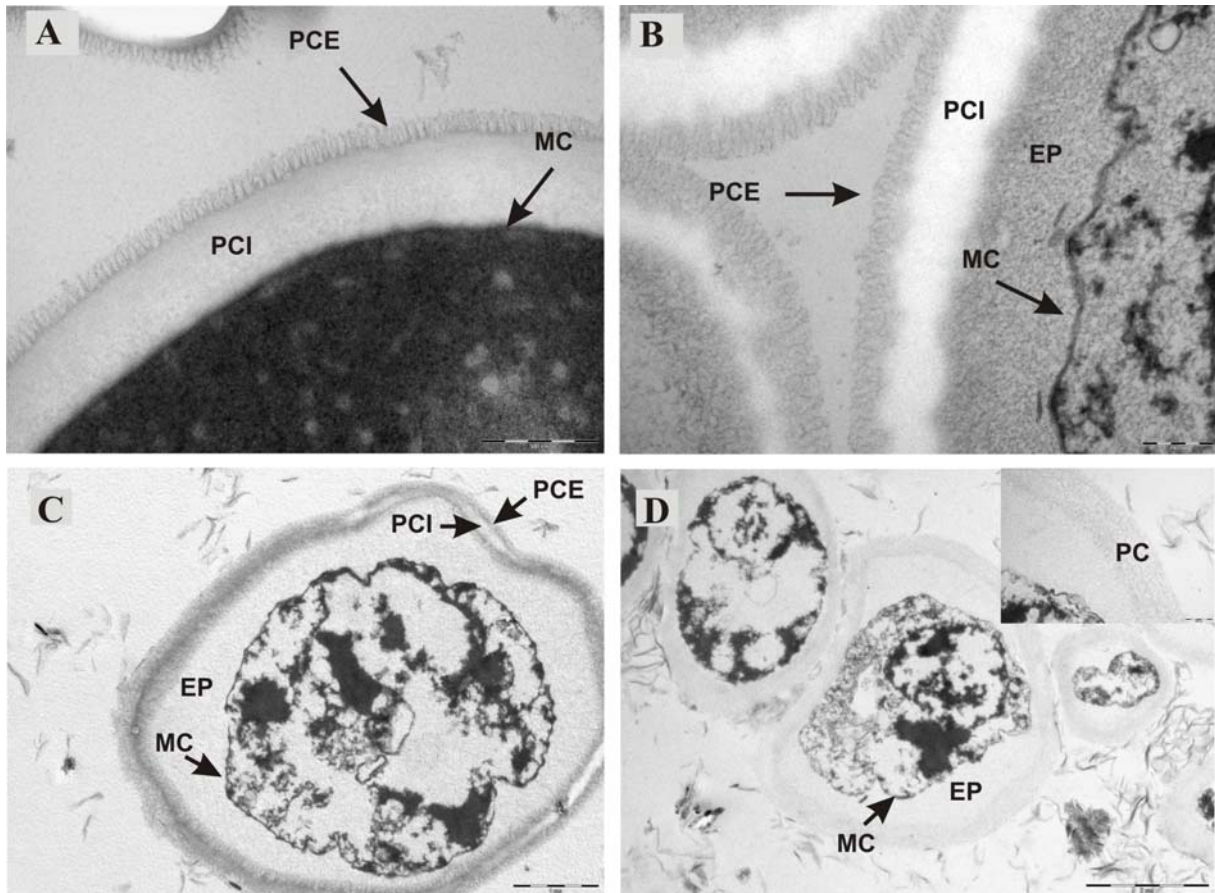


Figura 5.3: Imatges TEM mostrant l'evolució de la paret cel·lular. Cèl·lula viable (A). *lies* de llevat de segona fermentació un cop transcorreguts 9 (B), 17 (C) i 30 (D) mesos de cria. Paret cel·lular (PC). Escala = 500 nm (A), 200 nm (B), 1 μ m (C), 2 μ m (D)

Les diferències morfològiques són evidents per tots els orgànuls, tal com s'observa en la Fig. 5.2. El citoplasma de la major part de les cèl·lules es troba plasmolitzat i amb una gran vacuolització. El contingut està altament desorganitzat i la major part del material citoplasmàtic es troba formant agregats (Fig. 5.2B, D, F). Conclusions molt semblants van ésser extretes per Piton *et al.* [51] d'observacions de mostres de *champagne*.

La Fig. 5.2B mostra detalls de *S. cerevisiae* després de 9 mesos d'envelliment. Les vesícules (Ves) i l'envolcall nuclear encara són visibles (fetxes, NE). Un cop transcorreguts 17 mesos, l'envolcall nuclear deixa d'ésser aparent en la major part dels llevats (Fig. 5.2C, D). Als 30 mesos, el citoplasma es troba profundament vacuolitzat i solubilitzat (Fig. 5.2E, F).

El canvi morfològic més profund s'observa en la paret cel·lular. Als 9 mesos d'envelliment

la PCI es troba estructurada en dues capes: una capa interna microfibril·lar, molt rica en mannoproteïnes i per tant més contrastada per la barreja OsO_4 i l'acetat d'uranil (Figs.5.3B i Fig. 5.4-CF), i una capa més externa, on es concentra tot el material glucídic i per tant molt poc contrastada (Fig. 5.3B i Fig. 5.4-CA). Cid *et al.* [16] ja havien observat fibril·les, tot i que l'ús de HPF sense la participació de dissolvents químics, ha permès millorar la qualitat de la preparació de manera que es pot observar clarament com la capa fibril·lar (Fig. 5.4-CF) està formada per una estructura homogènia de microfibril·les molt juntes, molt densa que fa pensar en un origen proteic. L'espai periplasmàtic (EP) augmenta atès que la membrana citoplasmàtica (MC) s'ha separat de la paret (Fig. 5.3B) i Fig. 5.5). Les invaginacions que es poden observar a la membrana citoplasmàtica podrien estar relacionades amb el procés d'endocitosi [28] (Fig. 5.5).

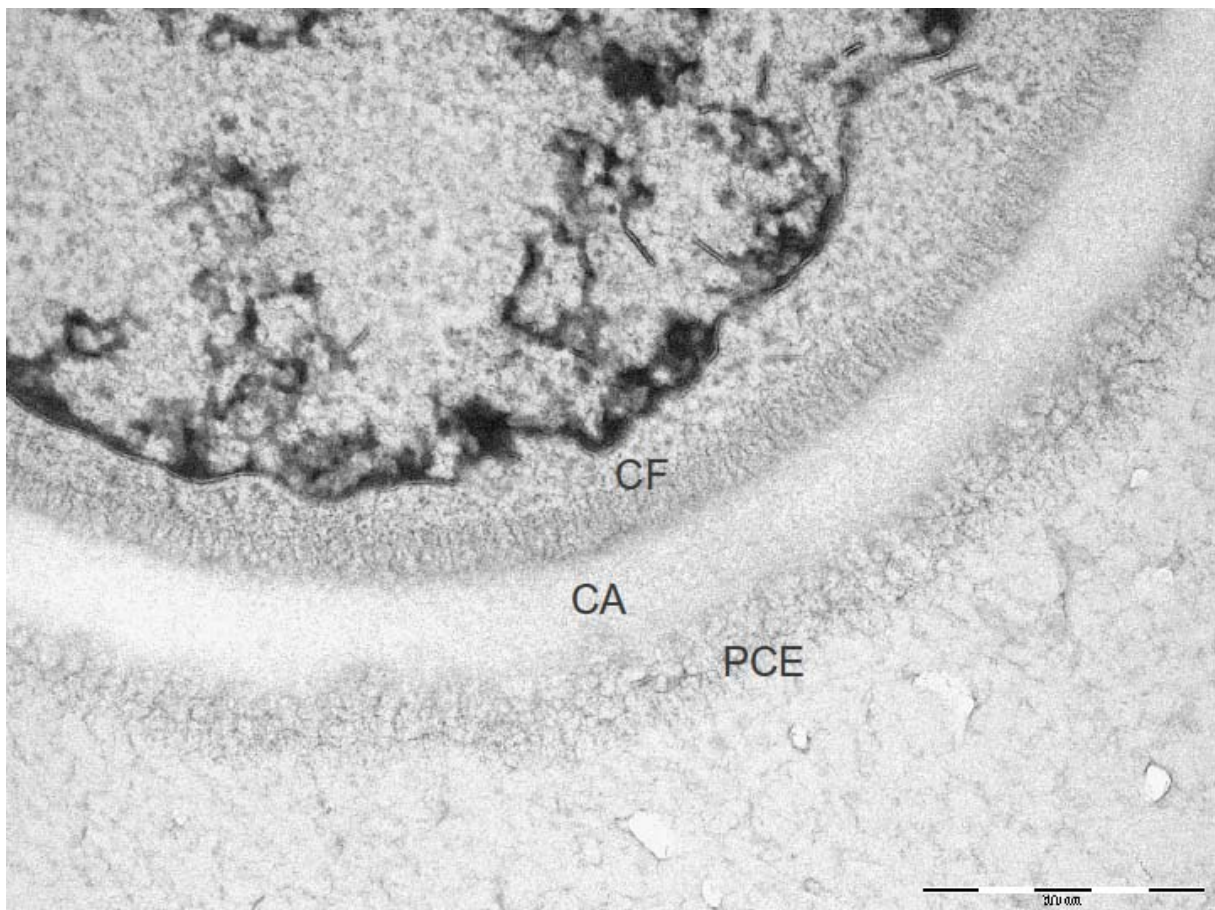


Figura 5.4: Imatges TEM mostrant detalls de la paret cel·lular als nou mesos d'envelliment. Paret cel·lular externa (PCE), capa fibril·lar de la paret interna (CF), capa amorfa de la paret interna (CA). Escala = 500 nm

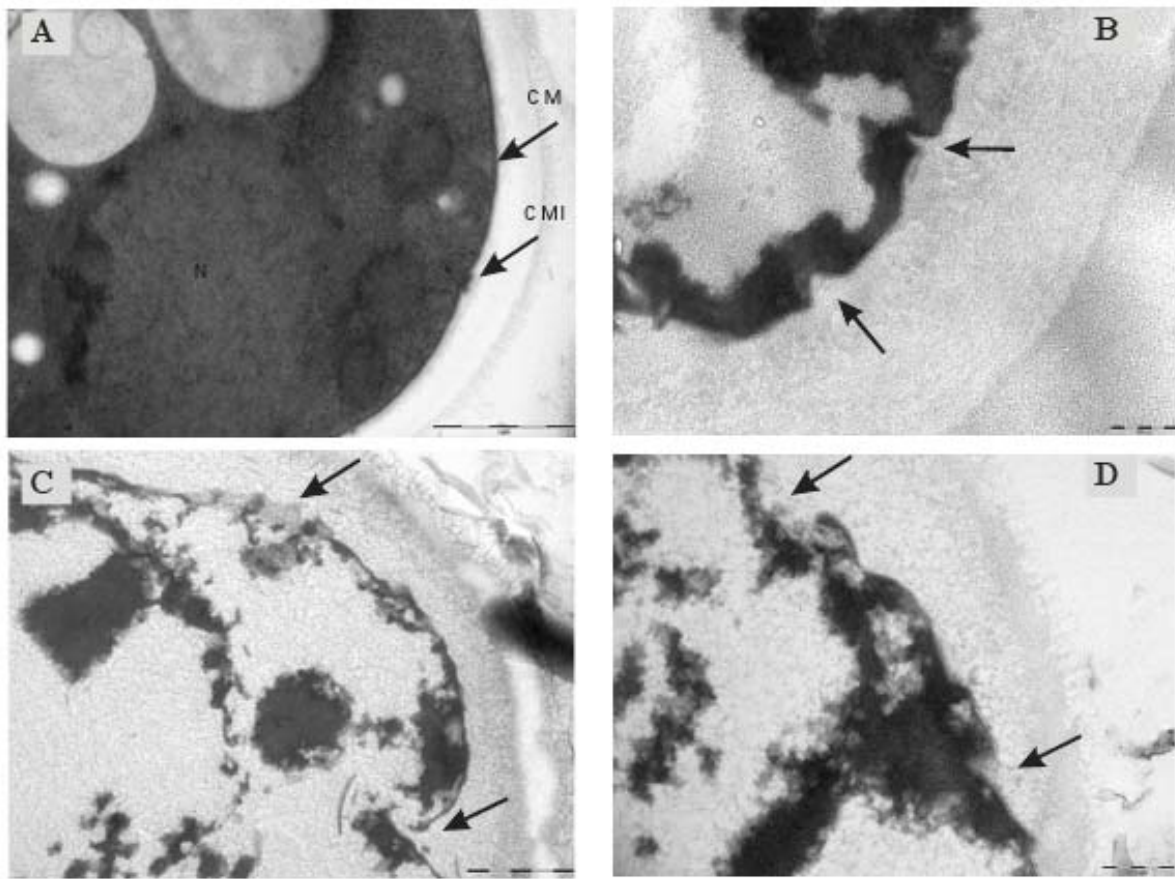


Figura 5.5: Imatges de TEM mostrant l'evolució de la membrana cel·lular. (A) Cèl·lula viable. *Lies* de llevat de segona fermentació un cop transcorreguts 9 (B), 17 (C) i 30 (D) mesos de criança. Escala = 500 nm (A,C), 200 nm (B,D).

Als 17 mesos la capa amorfa de la paret interna (CA) desapareix, fenomen que es podria relacionar amb les observacions de Kopecká *et al.* [34] (Fig. 5.3C). Aquests autors van demostrar la presència de la capa microfibril·lar interna i la progressiva eliminació de la capa amorfa en tractar parets cel·lulars de llevats amb $\beta(1-3)$ glucanases i/o $\beta(1-6)$ glucanases. L'activitat glucanasa podria, doncs, tenir un paper important en la degradació de la paret durant la fase d'envelliment. Malgrat la degradació observada d'aquesta part de la paret, la cèl·lula manté la forma i la rigidesa, confirmant l'observacions d'altres autors [32] (Fig. 5.3C). La capa més externa és irregular i està composta per material microfibril·lar distribuït de manera esparsa. Pel que fa a la membrana plasmàtica, s'observen trencs al llarg de la seva superfície (Fig. 5.5D, fletxes).

Finalment, un cop han passat 30 mesos en rima, la paret de les *lies* perd l'estructura

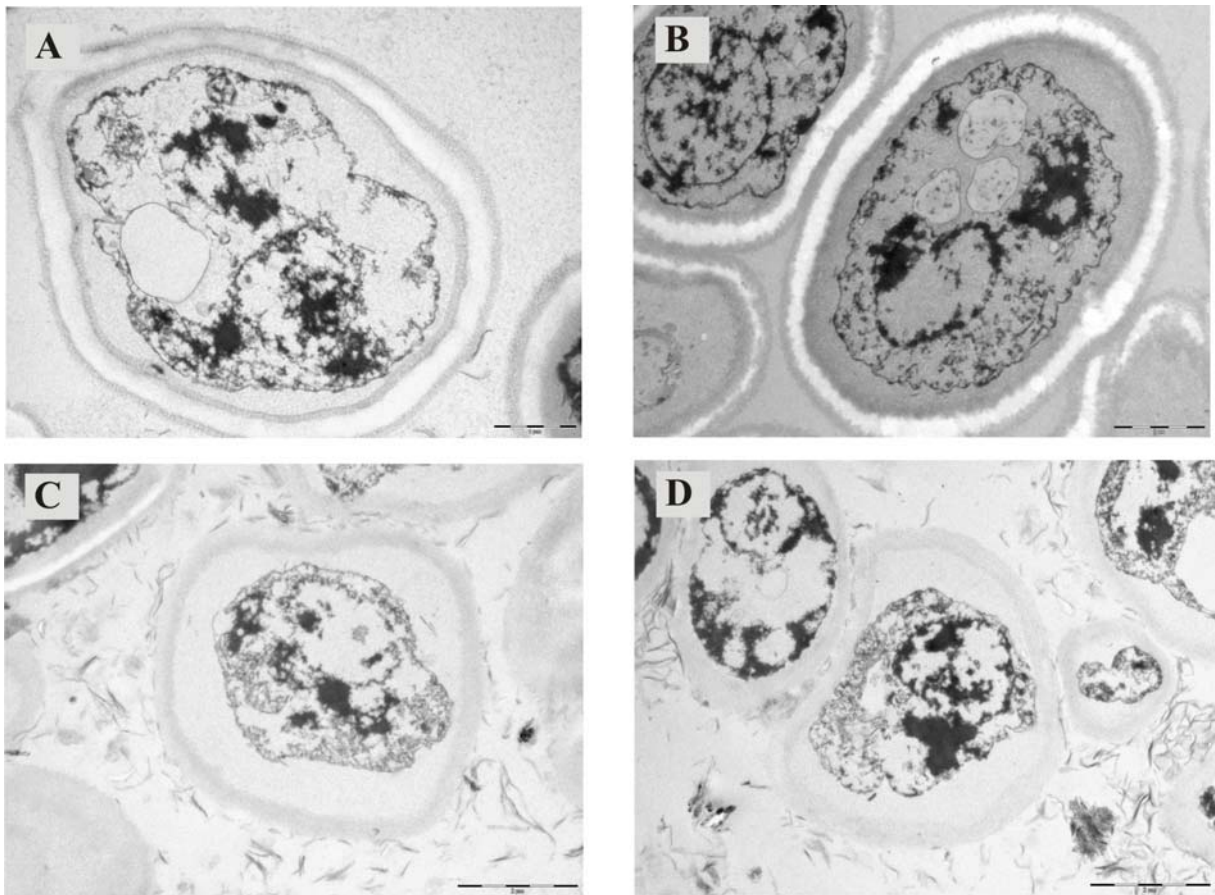


Figura 5.6: Micrografia on s'observen llevats obtinguts de dos caves diferents després de 9 (A, B) i 30 mesos en rima (C,D). Escala = 1 μm (A, B), 2 μm (C, D)

fibril·lar i no es poden distingir les dues capes (PCE i PCI) (Fig. 5.3D); malgrat tot, la cèl·lula manté la seva forma. En aquesta etapa, la membrana ja es troba profundament fragmentada (Fig. 5.5D).

Els canvis estructurals observats semblen no veure's afectats pel vi utilitzat per a segona fermentació. La figura 5.6 mostra la morfologia de *S. cerevisiae* desenvolupada en dos vins diferents (A i B). Malgrat els estudis que afirmen que el medi on es desenvolupen les cèl·lules afecta a les seves característiques fisicoquímiques [30, 52, 53], el vi on es duu a terme la segona fermentació sembla no influir diferencialment en la morfologia del llevat. Tal com es pot observar a la figura 5.6, la morfologia de les cèl·lules de llevat després de 9 i 30 mesos en rima no depèn del vi on s'ha dut a terme la fermentació. El temps sembla, doncs, ser el factor més important pel que fa als canvis estructurals.

En conclusió, la cèl·lula al llarg de la rima pateix profunds canvis a la seva ultraestructura,

que podrien derivar en canvis a la composició dels seus vins. El temps sembla ser el paràmetre més important que condiciona les modificacions estructurals de la cèl·lula en condicions enològiques. Durant la rima es desestructura el citoplasma i desapareixen els orgànuls. La membrana plasmàtica es degrada, principalment en períodes llargs de cria, i la paret veu afectada profundament la seva estructura en doble capa. Malgrat tots aquests canvis, la cèl·lula manté la seva forma.

L'ús d'HPF ha permès confirmar i ampliar les observacions fetes per altres autors mitjançant altres tècniques de microscòpia electrònica [51, 40]. A destacar especialment la resolució de les micrografies que mostren la capa microfibril·lar de la paret interna de la cèl·lula.

En la segona part de la memòria, s'explora l'efecte que poden tenir aquests canvis a la morfologia de la cèl·lula sobre modificacions de les diferents propietats fisicoquímiques de les *lies* al llarg de la rima.

5.2 Modificació de les propietats fisicoquímiques

5.2.1 Modificació de les propietats superficials de les *lies* al llarg de la rima

Publicació

Stefania Vichi, Joan Josep Gallardo Chacón, Rémi Pradelles, David Chassagne, Elvira López-Tamames, Susana Buxaderas (el primer i segon autors han contribuït de la mateixa manera al treball). Surface properties of *Saccharomyces cerevisiae* lees during sparkling wine ageing and their effect on flocculation. *Int J Food Microbiol* 140, 125-130, 2010.

Resum

L'objectiu d'aquest treball és conèixer com es modifiquen les propietats superficials de la cèl·lula de llevat de segona fermentació al llarg del temps de cria, així com determinar la variació dels components estructurals de la paret durant el període de rima, ja que aquests poden estar estretament relacionats amb les propietats fisicoquímiques. Finalment, hom vol establir les relacions entre la capacitat de floculació de les cèl·lules i les modificacions fisicoquímiques de la paret.

Per assolir aquests objectius, es van dur a terme sobre *lies* de vins escumosos amb temps d'envelliment en rima corresponents a les categories de vi escumós, "Cava", "Reserva" i "Gran Reserva", mesures de:

- Hidrofobicitat, capacitat electró-donador i electró-receptor (mitjançant canvis a l'afinitat per dissolvents orgànics)
- Potencial ζ de les cèl·lules (mitjançant mesures de motilitat electroforètica)
- Composició en biomolècules (mitjançant la determinació en superfície de ions característics per TOF-SIMS)

- Mida de les cèl·lules (mitjançant mesures d'impedància)
- Capacitat de floculació (pel mètode de Helm's)

En primer lloc, s'observa una davallada de la hidrofobicitat de les cèl·lules que està correlacionada amb un increment del potencial ζ i el caràcter electró-receptor. D'altra banda, s'observa que les *lies* presenten un caràcter de base de Lewis (electró-donador) que a més, està correlat amb la hidrofobicitat. Aquestes modificacions podrien tenir com a conseqüència variacions entre les *lies* i els diferents compostos del vi.

Pel que fa als canvis a la composició de la superfície cel·lular al llarg del temps, semblen ésser deguts, en gran part, a canvis a les proteïnes de superfície ja que estan relacionats amb les modificacions dels ions amb contingut en fòsfor i nitrogen. A més, la pèrdua de la capacitat de floculació al llarg del temps sembla associada a una pèrdua d'elements proteics a la superfície del llevat durant l'autòlisi que afectaria a la seva hidrofobicitat. Finalment, només les cèl·lules de vins amb temps de cria més llargs tenen una reducció de la mida significativa que no sembla que afecti a la seva capacitat de floculació .



Surface properties of *Saccharomyces cerevisiae* lees during sparkling wine ageing and their effect on flocculation

Stefania Vichi ^{a,*}, Joan J. Gallardo-Chacón ^{a,b,1}, Rémi Pradelles ^c, David Chassagne ^c,
Elvira López-Tamames ^a, Susana Buxaderas ^a

^a Departament de Nutrició i Bromatologia, Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments (XaRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda Joan XXIII, s/n, 08028, Barcelona, Spain

^b CIBER-BBN, Networking Centre on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, Automatic Control Department (ESAI), Universitat Politècnica de Catalunya, c/ Pau Gargallo 5, 08028 Barcelona, Spain

^c Institut Universitaire de la Vigne et du Vin "Jules Guyot", EA 581 EMMA, Université de Bourgogne, 21078 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2009

Received in revised form 24 March 2010

Accepted 5 April 2010

Keywords:

Yeast lees

Ageing on lees

Surface properties

Cell wall

Sparkling wine

Flocculation

TOF-SIMS

ABSTRACT

Cell surface properties were determined for the first time for lees of *Saccharomyces cerevisiae*, and they proved to be significantly dependent on the time of sparkling wine ageing on lees. Cell surface hydrophobicity decreased from approximately 44% to 11% of affinity to hexadecane. Electron acceptor capacity (calculated as % affinity to ethyl acetate – % affinity to decane) increased from approximately –27% to 10% and zeta potential from approximately –4 to 6 mV. Mannoproteins are released from the external cell wall layer during the autolytic process, as confirmed by TOF-SIMS analysis of the cell wall chemical composition. This could explain the modifications of lees cell surface properties observed during ageing. Lees flocculation capacity, calculated by the Helm's method, decreased during the period of ageing from approximately 88% to 40%. Stepwise multiple regression analysis indicated that lees surface hydrophobicity was the main determinant of lees flocculation capacity, explaining 70.3% of the variability ($p < 0.01$), followed by far by the absolute values of zeta potential, accounting for 9.9% of the variability ($p < 0.05$).

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ageing on lees after second fermentation is a fundamental stage in the production of some high quality sparkling wines by the traditional method, and it results in an increase in product richness and roundness (Fornairon-Bonnefond et al., 2002; Caridi, 2006). During this ageing, the wine and lees interact and undergo important modifications to their structure, due to the self-degradation process known as autolysis (Leroy et al., 1990). Flocculation capacity is especially important in the production of sparkling wine by the *méthode champenoise*, in which the yeast cells can only be removed from the bottle by being settled. Yeast flocculation is thought to be due to cell wall interactions mediated by specific lectins (Miki et al., 1982), but nonspecific interactions governed by cell surface properties such as hydrophobicity (Kamada and Murata, 1984; Amory et al., 1988; Smit et al., 1992; Wilcocks and Smart, 1995; Straver and Kijne, 1996) and charge (Kamada and Murata, 1984; Amory et al., 1988;) are believed to be major determinants of cell flocculation. Although these physicochemical surface properties have been extensively studied in

viable *Saccharomyces cerevisiae* cells, to our knowledge no data on the modifications in the lees surface have been reported. The changes in lees wall structure during autolysis could induce relevant modifications in the cell surface physicochemical properties that govern the interactions between the lees and wine.

Yeast cell wall makes up between 10 and 25% of cell volume (Klis et al., 2006) and it is structured in an inner three-dimensional network of ramified glucans and outer layer of mannoproteins, which are the most exposed cell wall molecules (Gemmill and Trimble, 1999; Klis et al., 2006). Cell wall biochemical components confer physicochemical surface properties to cells. These are considered to be major conditioners of microbial interactions and thus to influence several yeast and lees properties. Although yeast cells maintain their integrity and shape during the time of ageing of wines, a depletion of cell wall thickness has been observed in simulated and real conditions (Piton et al., 1988; Hernawan and Fleet, 1995). Cell wall structure undergoes different changes such as modifications in mannoprotein and glucan concentration and stability (Piton et al., 1988; Martínez-Rodríguez et al., 2001; Guilloux-Benatier and Chassagne, 2003; Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006), which could modify cell surface physicochemical properties. The initial effects of autolysis include the hydrolysis of bonds connecting β -1–3 glucans associated with mannoproteins on the outer layer of the cell. Following this, β -glucanases further hydrolyze the β -1–3 glucans that make up the

* Corresponding author. Tel.: +34 93 4024508; fax: +34 93 4035931.

E-mail address: stefaniavichi@ub.edu (S. Vichi).

¹ These authors contributed equally to this work.

cell wall (Fornairon-Bonnefond et al., 2002). The release of mannoproteins during the ageing on lees by enzymatic action (Babayan and Bezrukov, 1985; Leroy et al., 1990; Caridi, 2006), that is reported as a progressive and linear phenomenon (Doco et al., 2003) should entail a progressive depletion of these biomolecules from the lees cell surface. Nevertheless, no data on lees wall compositional changes at a molecular level during autolysis are available. Cell wall molecular composition has been studied in viable *S. cerevisiae* by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) (van der Mei et al., 2000) and recently by time-of-flight secondary ions mass spectrometry (TOF-SIMS) (Jungnickel et al., 2005), which is a potentially useful tool for the study of cell surface chemical composition.

In the present study, the surface properties and cell wall chemical composition were determined for the first time for lees of *S. cerevisiae*. Modifications were assessed at different times during the ageing on lees period, carried out in industrial sparkling wines produced by the *méthode champenoise*. TOF-SIMS analysis of the lees surface was assayed to clarify the lees cell wall chemical composition. Finally, the possible effects of compositional and physicochemical cell surface modifications on lees flocculation capacity were evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Hexadecane, decane, chloroform and ethyl acetate were from Fluka (Steinheim, Germany). Sodium acetate trihydrate, acetic acid glacial, hydrochloric acid, NaCl and CaCl₂ were from Panreac (Barcelona, Spain). Reagents were prepared using Milli Q deionized water.

2.2. Samples

Lees of the same strain of *S. cerevisiae* from the private collection of a winery (Freixenet S.A.) were obtained from industrial sparkling wines using two distinct *coupages* of base wines (A and B) produced from distinct crop years. Lees were collected from wines after 2, 10, 18 and 40 months of ageing on lees. Lees from two different bottles were analyzed for each sample (total 8 × 2 bottles), for a total of 16 independent samples analyzed in triplicate.

Lees were prepared as follows: the content of 1 bottle of sparkling wine over lees was centrifuged for 15 min at 1410 g and 4 °C (Rotina 48CR, Tuttlingen, Germany); the pellet was washed three times with 10 mL of sodium acetate buffer (pH 3.6, 0.3 M) and resuspended in 5 mL of the same buffer. The lees were maintained refrigerated and under a nitrogen atmosphere until analysis.

2.3. Cell surface characteristics

2.3.1. Hydrophobicity and electron donor/acceptor properties

The microbial adhesion to solvent technique (MATS), based on cell surface affinities for a monopolar and a non-polar solvent (Bellon-Fontaine et al., 1996), was used to determine the electron donor or acceptor properties of lees suspended in acetate buffer (pH 3.5, 0.3 M). The electron donor/Lewis base character (EDC) was calculated as the difference between the % affinity of lees to chloroform and hexadecane, and the electron acceptor/Lewis acid character (EAC) was calculated as the difference between the % affinity of lees to ethylacetate and decane.

The percentage of cells adhered to hexadecane was used as a measure of cell surface hydrophobicity (CSH).

2.3.2. Zeta potential

Lees surface charge was quantified by measurement of the electrophoretic mobility of cells on laser Zetacompact equipment (CAD Instrumentation, Limours, France). This allowed the zeta potential (mV) to be calculated using the Smoluckowsky's equation (Hunter, 1981). After equilibration of the suspensions by magnetic

stirring for 15 min, an electric field of 8 V/cm was applied to a lees suspension of 10⁶ cells/mL. Results were calculated as mean values of six repetitions.

2.3.3. Cell number and size measurements

The number of cells in each sample and the corresponding cell diameter were determined by using a Coulter counter (Multisizer II, Luton Beds, UK, with a 70 µm aperture tube), to which 1.0 mL of cell suspension in 49.0 mL of NaCl 0.9% solution was added. In order to avoid the formation of flock, the stock solution was agitated during the measurements. A narrow and sharp Gaussian-type distribution curve of cell size was obtained, indicating a satisfactory cell separation in the stock solution. The number of cells/mL was calculated by dividing the number of events by the volume of the loop (500 µl). For each suspension the measurement was performed in triplicate.

2.4. Yeast lees surface analysis by time-of-flight secondary ion mass spectrometry

Yeast lees were treated as follows: 10 µL of lees suspension in sodium acetate buffer (pH 3.6, 0.3 M) was placed on a cleaned glass slide to form a thin layer. The samples were dried in a vacuum desiccator at 4 °C. Changes in the amount of cell wall biomolecules were assessed by the analysis of typical mass-to-charge ratios (*m/z*) in the range *m/z* 1–800. The fragment spectrum area results were normalized by the sum of the total spectrum area.

The TOF-SIMS analyses were performed using a TOF-SIMS IV (ION-TOF, Münster, Germany) operated at a pressure of 5 × 10⁻⁹ mbar. Samples were bombarded from a pulsed bismuth liquid metal ion source (Bi₃⁺), at an energy of 25 keV. The gun was operated with a 20 ns pulse width, 0.3 pA pulsed ion current for a dosage lower than 5 × 10¹¹ ions/cm², well below the threshold level of 1 × 10¹³ ions/cm² generally accepted for static SIMS conditions. Secondary ions were detected with a reflector time-of-flight analyzer, a multichannel plate (MCP), and a time-to-digital converter (TDC). Measurements were performed with a typical acquisition time of 20 s, at a TDC time resolution of 200 ps, and a 128 × 128-pixel image size. Charge neutralization was achieved with a low-energy (20 eV) electron flood gun. Secondary ion spectra were acquired from randomly rastered surface areas of 50 µm × 50 µm within the sample's surface. Negative and positive secondary ions were extracted at 2 kV and postaccelerated to 10 keV kinetic energy just before hitting the detector. Mass spectral acquisition and image analysis were performed within the ION-TOF Ion Spec and Ion Image software (versions 4.1 and 3.1). Each ion image was normalized to the intensity of the brightest pixel. This intensity value is assigned to the color value of 256. Zero intensity is assigned to the color value 0. All other intensities are assigned using a linear relationship.

2.5. Flocculation assay

The flocculence of the yeast cells was determined on the basis of Helm's test. Briefly, CaCl₂ was added to the lees suspension in acetate buffer (pH 3.5, 0.3 M) to give a final concentration of 0.1%. The degree of flocculation of the different lees was determined in terms of the ratio between the initial absorbance at 620 nm of the lees suspension (Abs₀) and that obtained after 10 min at rest (Abs₁₀). The Abs₀ of lees suspensions was around 1.5. The flocculation capacity of the lees was expressed as (1–Abs₁₀/Abs₀) × 100.

2.6. Statistical analysis

Statistical data were obtained using R-software: a language and environment for statistical computing (R Development Core Team (2008); R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Data were subjected to factorial analysis of variance, linear regression analysis, and stepwise forward multiple regression analysis. The

percent of variance explained by each factor and interaction was calculated from partial eta-squared values. Fisher's LSD (least significant differences) method was applied to assess significant differences in each surface characteristic between lees samples with distinct ageing periods. For all the statistical analyses performed, differences were considered significant at $p \leq 0.05$. The degree and significance of the correlations were expressed by the regression coefficient (r) and p values, respectively. Principal components analysis (PCA) was applied for visualization of TOF-SIMS data and cell surface properties data.

3. Results and discussion

3.1. Influence of ageing time on physicochemical properties and chemical composition of lees surface

3.1.1. Physicochemical properties

The surface properties and the cell wall chemical composition, which have previously been widely studied in viable cells of *S. cerevisiae*, were determined for the first time in non-viable *S. cerevisiae* cells during autolytic degradation, after different periods of ageing on lees. In order to assess how ageing on lees affects cell surface physicochemical properties, and to correlate these properties to lees wall molecular composition, changes in these characteristics were evaluated according to the time of ageing in enological conditions. The MATS and zeta potential results obtained for *S. cerevisiae* lees after different periods of sparkling wine ageing on lees are given in Table 1. The CSH of yeast lees, calculated by the solvent partition assay and expressed as percent of affinity to hexadecane, was observed to be inversely related to the time of sparkling wine ageing (correlation coefficient, $r = -0.69$, $p < 0.05$). Independently of the wine *coupage*, after short ageing periods yeast lees were hydrophobic, showing an affinity to the non-polar solvent hexadecane of around 40–50%. After 10 and 18 months of ageing, lees presented CSH values of around 20–30%, which then dropped to approximately 10% after 40 months, when lees acquired a hydrophilic character, according to Li and McLandsborough (1999).

Moreover, during the entire period of ageing tested the yeast lees showed higher tendency to donate electrons from their surface than to accept electrons, (Table 1), indicating a Lewis basic character of the lees cell wall. This agrees with previously reported observations of

viable cells of *S. cerevisiae* (Mercier-Bonin, et al., 2004). The EDC of the cell surface did not show a clear tendency during the biological ageing (Table 1). Conversely, the weak EAC increased progressively for lees collected after increasing ageing periods ($r = 0.89$, $p < 0.05$). The zeta potential of lees became positive in the course of the biological ageing ($r = 0.98$, $p < 0.05$), going from slightly negative values in lees after 2 and 10 months of ageing, to clearly positive values after 40 months of biological ageing (Table 1). Under the same analytical conditions, viable cells of different strains of *S. cerevisiae* grown in synthetic must were reported to show zeta potential values of between approximately -6 and -15 mV, and EDC values of between approximately 8% and 48%, (Pradelles et al., 2008).

A clear influence of the time of ageing on lees cell surface properties could be postulated for all the properties. Although compositional characteristics of yeast surfaces depend on the medium in which they are grown (Klis et al., 2002; Caridi, 2006), the effect of the type of wine on cell surface physicochemical characteristics was only observed for lees EAC. The interaction between the type of wine and the time of ageing was not significant (Table 1).

Moreover, some of the surface properties are inter-correlated (Table 2). CSH is inversely correlated to EAC ($r = -0.71$, $p < 0.05$) and in particular to EDC ($r = -0.78$, $p < 0.05$). These results agree with previous findings for viable *S. cerevisiae* cells, which describe a hydrophilic behavior for cells with a Lewis basic character (Mercier-Bonin et al., 2004). This was also in agreement with results reported for other yeast genera (Amaral et al., 2006). The zeta potential was correlated to lees EAC ($r = 0.87$, $p < 0.05$), and thus inversely correlated to CSH ($r = -0.67$, $p < 0.05$).

3.1.2. Chemical composition of lees surface

The differences in cell surface properties determined in lees during ageing could be reasonably ascribed to the cell wall degradation due to yeast autolysis. The presence of some characteristic fragments analyzed by TOF-SIMS in lees biomass surface is shown in Fig. 1. Cell surface composition indicated a decrease of ions related to possible protein fragments (Fig. 2), such as CN^- (m/z 26) and CON^- (m/z 42) (Baldwin et al., 1997), and $PO_4H_2^-$ (m/z 97), expressed as ratios with respect to carbon ion C_2^- (m/z 24). This carbon dimer was chosen to compare the changes in proteins with respect to the rest of biomolecules. All of them showed a negative correlation with the time of ageing with correlation coefficient, r , between -0.45 and -0.62 ($p < 0.05$). These results seem to reflect a decrease in cell surface protein, which could be associated with the release of yeast wall mannoproteins that occurs during cell wall degradation due to yeast autolysis (Leroy et al., 1990; Fornairon-Bonnefond et al., 2002). However, in yeast surface spectra no signal was observed for different fragments related to fatty acids: m/z 184⁺

Table 1

Cell surface properties and cell size of lees from different sparkling wine *coupages* after different periods of ageing, and results of factorial analysis of variance. The percent of variance explained by each factor is also reported. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Month	EDC ^a	EAC ^b	CSH ^c	Z ^d	Cell diameter (μm)
2	47.9 ± 7.4 a	-27.5 ± 8.2 a	44.0 ± 6.8 a	-4.1 ± 0.5 a	4.7 ± 0.1 a
10	69.0 ± 6.1 b	-17.8 ± 9.9 b	19.9 ± 2.4 b	-3.2 ± 0.7 a	4.6 ± 0.2 a
18	58.3 ± 7.1 a	-15.1 ± 8.4 b	24.7 ± 10.5 b	-0.3 ± 1. b	4.5 ± 0.1 a
40	70.1 ± 5.7 b	10.1 ± 3.4 c	11.2 ± 3.7 c	6.2 ± 0.4 c	3.8 ± 0.0 b
MANOVA results					
Month	<0.05 (41%) ^e	<0.05 (73%)	<0.05 (75%)	<0.05 (97%)	<0.05 (82%)
Wine	ns	<0.05 (18%)	ns	ns	ns
<i>coupage</i>	ns	ns	ns	ns	ns
Interaction	ns	ns	ns	ns	ns

^a EDC, electron donor character calculated as % affinity to chloroform – % affinity to hexadecane.

^b EAC, electron acceptor character calculated as % affinity to ethyl acetate – % affinity to decane.

^c CSH, cell surface hydrophobicity calculated as % of affinity to hexadecane.

^d Z potential (mV); ns: not significant.

^e Percent of variance explained by each factor.

Table 2

Flocculation capacities of lees from different sparkling wine *coupages* after different periods of ageing, and results of factorial analysis of variance. The percent of variance explained by each factor is also reported. Different numbers indicate significant differences ($p < 0.05$).

Month	Flocculation ^a
	Acetate buffer (pH 3.5, 0.3 M) 0.1 % CaCl ₂
2	88.1 ± 4.1 a
10	62.5 ± 9.3 b
18	71.9 ± 2.4 c
40	40.6 ± 10.4 d
MANOVA results	
Month	<0.05 (82%) ^b
Wine <i>coupage</i>	<0.05 (17%)
Interaction	ns

^a Flocculation capacity calculated as $(1 - Abs_{10}/Abs_0) \times 100$, where Abs_{10} = absorbance of lees suspension after 10 min, Abs_0 = initial absorbance of lees suspension; Different letters in columns indicate significant differences ($p < 0.05$) between lees of different ageing.

^b Percent of variance explained by each factor.

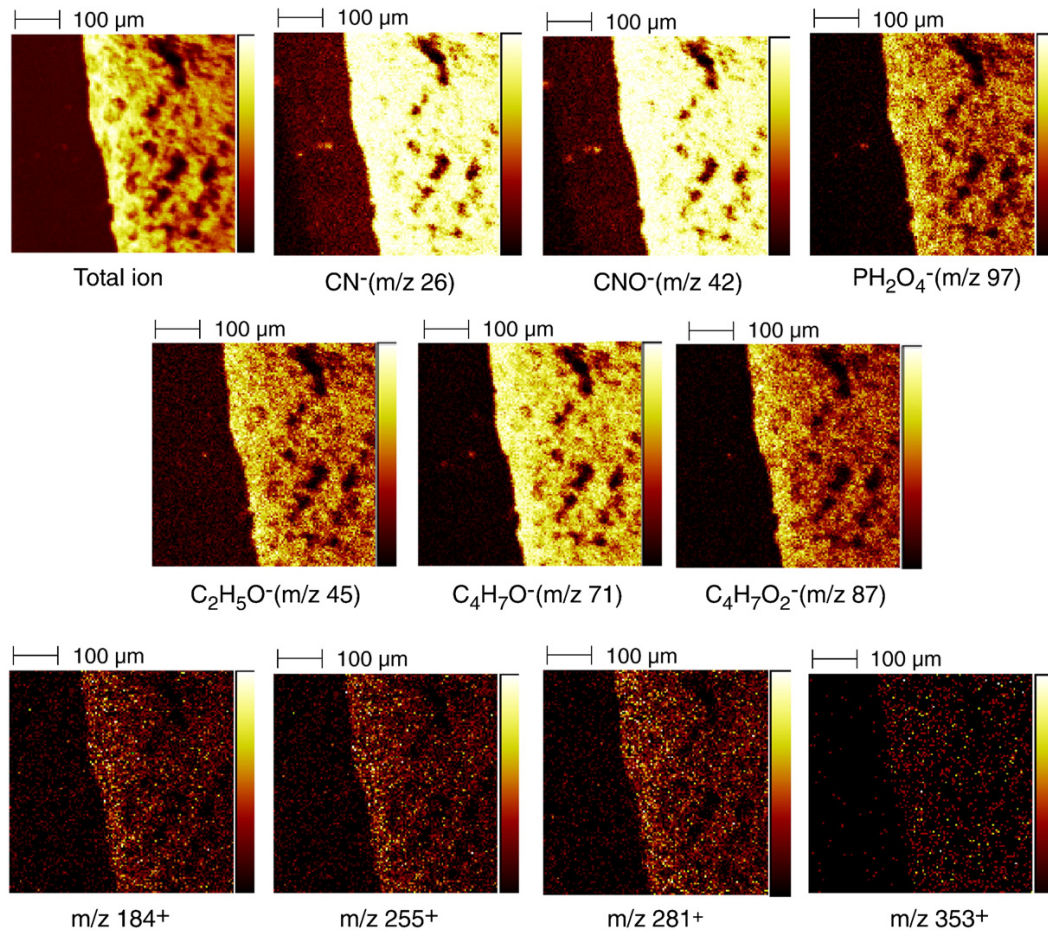


Fig. 1. Secondary ion images of total ion and characteristic molecules ions containing *S. cerevisiae* biomass (lees at 2 months of ageing).

(Lockyer and Vickerman, 2004), m/z 255⁻ (Baldwin et al., 1997), m/z 281⁻, 353⁻, 396⁺, indicating that the primary ion beam does not penetrate the inner-most layer of the yeast wall (Fig. 1). On this basis, the phosphate ion could be considered as only resulting from phosphomannan residues of cell wall glycoproteins (Gemmill and Trimble, 1999).

Moreover, typical hydrocarbon fragments $C_2H_5O^-$ (m/z 45), $C_4H_7O^-$ (m/z 71) and $C_4H_7O_2^-$ (m/z 87) (Baldwin et al., 1997) were monitored and observed to decrease during ageing (r between -0.47 and -0.61 ; $p < 0.05$). Hydrocarbon fragments detected in cell wall structure may be derived from the glycosidic part of external mannoproteins as well as from the inner β -glucan. PCA analysis was performed in order to confirm the common origin of each group of fragments related to cell wall biomolecules (proteins and carbohydrates), and to ascertain the relation of covariance between surface properties and cell wall composition. The PCA analysis showed a correlation between $PO_4H_2^-$ and nitrogen fragments, as well as among $C_2H_5O^-$, $C_4H_7O^-$ and $C_4H_7O_2^-$ ions, corroborating the common origin for fragments of the same group (Fig. 3). CSH and the protein-related fragments show the same direction in the PCA analysis (Fig. 3), confirming the existence of a covariance between CSH and the presence of proteins in the cell wall, as previously described for viable cells of *S. cerevisiae* (Kamada and Murata, 1984; Amory et al., 1988; Smit et al., 1992; Suzzi et al., 1994). The loss of hydrophobic mannoprotein residues during ageing could thus be considered a major determinant in decrease in lees CSH.

S. cerevisiae is thought to exhibit negatively charged surfaces due to the presence of phosphate groups in the outer cell wall mannoprotein layers (Amory et al., 1988; Mestdagh et al., 1990; Caridi, 2006), which have been reported to be linearly related to cell surface zeta potential (Amory et al., 1988). In the case of *S. cerevisiae* lees, the decrease of cell surface negative charge during ageing (Table 1) agrees with the number of phosphate groups on the cell surface detected by TOF-SIMS analysis. Fig. 3 shows both EAC and zeta potential in opposition to the ratio $PO_4H_2^-/C_2^-$, thus suggesting that zeta potential and EAC of lees surface during ageing mainly reflect a decrease in phosphate groups. The progressive decrease in the amount of mannoprotein in cell surface and the consequent reduction in the phosphate groups seems to produce the increase of zeta potential to positive values.

The EAC of *S. cerevisiae* cells has been related to the cell wall content of β -glucan (Mercier-Bonin et al., 2004). In the case of cells undergoing autolysis, the release of mannoproteins from the cell surface could favor the exposition of the glucan layer and thereby influence the Lewis basic/acid character of the cell surface. The TOF-SIMS analysis of polysaccharide related fragments (ions $C_2H_5O^-$, $C_4H_7O^-$ and $C_4H_7O_2^-$) in yeast surfaces did not show any clear correlation with the physicochemical properties studied. Nonetheless, TOF-SIMS determined the composition of the cell wall but not the accessibility to the active groups of inner layers, which should be related to the activity of β -glucan (Jaehrig et al., 2007). This is not

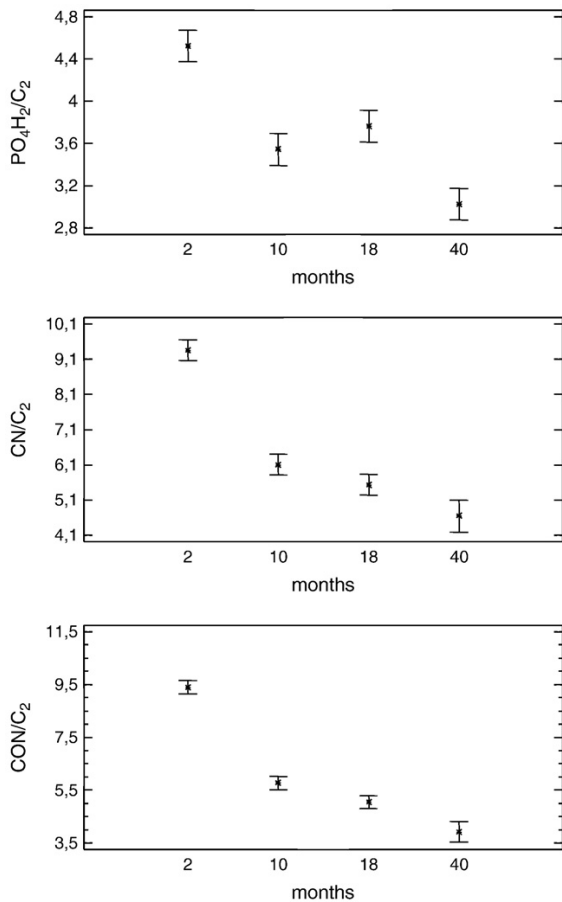


Fig. 2. Means and confidence intervals (95%) of the protein-related ions on lees cell surface, expressed as ratios with respect to carbon ion C_2 , after different periods of ageing.

suitable to clarify the role of β -glucan in determining lees surface properties. Further studies are necessary to establish their role during ageing.

3.2. Effect of surface characteristics on flocculation

As cell wall properties are thought to be a major determinant in flocculation capacity (Smit et al., 1992; Jin and Speers, 1998), the changes in lees wall structure caused by the autolytic process during sparkling wine ageing on lees can induce relevant modifications in this property.

Yeast lees flocculation capacity tended to decrease during the ageing of the lees samples (Table 2), being significantly dependant on both the ageing period and the wine *coupage*. The percent of variance explained by each factor reported in Table 2 indicates that lees flocculation capacity was mainly influenced by the ageing period, while wine characteristics determined significant but minor differences in flocculation capacity.

Apart from cell surface properties, cell size is expected to influence the sedimentation of particles with a diameter $>0.2 \mu m$ (Mortensen et al., 2005). Possible modifications of the lees cell size during ageing could thus influence flocculation capacity, due to the effects of gravity. The cell diameter was significantly smaller only for lees collected after 40 months of ageing, independently of the wine *coupage* (Table 1).

With the aim of assessing the relationships between the flocculation capacity and cell parameters such as cell size and surface properties, multivariate data analysis was performed in the form of stepwise forward multiple regression. This method is preferable to classical multiple regression when correlation between factors is suspected.

The prediction model obtained through multiple linear regressions from the data shown in Tables 1 and 2 showed that the flocculation capacity of sparkling wine lees after different ageing periods was primarily correlated to hydrophobicity, which explained 70.3% of the variability ($p < 0.01$). The same model shown that the surface zeta potential, electron donor/acceptor capacities and cell diameter have non-significant effects on the flocculation capacity ($p > 0.05$). Although *S. cerevisiae* flocculation is reportedly mediated by different mechanisms (Suzzi et al., 1994), these results are in agreement with earlier studies that indicate the major role played by cell wall hydrophobicity in yeast cell flocculation (Wilcocks and Smart, 1995; Smit et al., 1992; Straver and Kijne, 1996). Furthermore, cell to cell contact should become progressively easier as surface charge is lowered, resulting in an increase in the extent and rate of flocculation (Stratford and Keenan, 1988). Lees zeta potential ranged from negative to positive values during the ageing, so the relation between total charge and flocculation capacity was calculated for the absolute

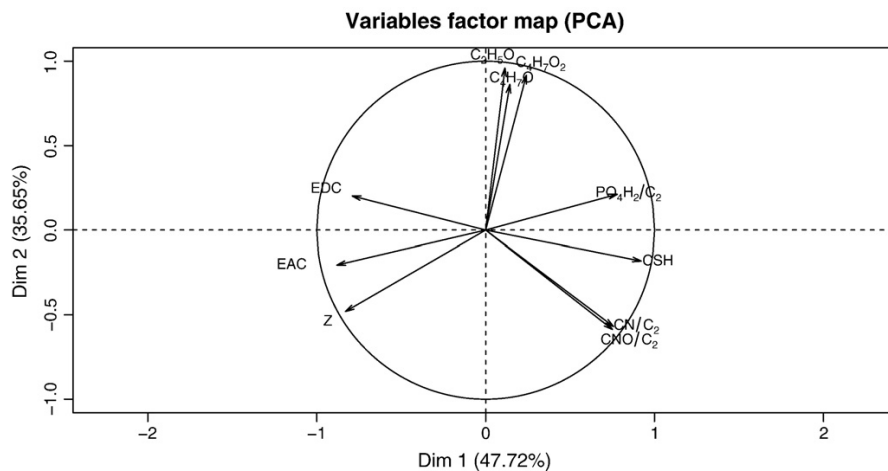


Fig. 3. Principal component analysis (PCA) for lees samples after different periods of ageing. The projection in the PCA space of the selected ions and physicochemical properties is shown. The percent of variability explained by each component (Dim 1, Dim 2) is also shown.

values of zeta potential ($|Z|$). The net cell surface charge negatively affected lees flocculation capacity, accounting for 9.9% of the variability ($p=0.024$).

In conclusion, yeast lees surface properties are shown to be significantly dependant on the time of sparkling wine ageing on lees. The release of mannoproteins from the cell wall external layer that occurs during the autolytic process could explain the observed decrease of CSH and increase of zeta potential and EAC, as the ageing period increases. Most of the lees surface properties are inter-correlated, but stepwise multiple regression analysis indicated that lees surface hydrophobicity was the main determinant in lees flocculation capacity, which showed a decreasing trend during the period of ageing on lees. This was followed by the far less important absolute values of zeta potential, which ranged from negative to positive values during ageing.

Acknowledgments

This study was supported by the Spanish *Ministerio de Ciencia y Tecnología*, project AGL2008-03392/ALI, by the *Generalitat de Catalunya* (BE-2007 and 2009-SGR606), by the Spanish *Ministerio de Educación y Ciencia* through the Juan de la Cierva program and by the Networking Centre on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN) through a contract to the PhD student Joan J. Gallardo-Chacón. The authors would like to thank Pilar Urpí (Freixenet S.A. wineries) for assistance with this research, Dr. Raul Pérez (Nanotechnology Platform), and Jaume Comas and his team (Unity of Flow Cytometry), from the Barcelona Science Park, for the TOF-SIMS and Multisizer measurements.

References

- Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., 2006. Yeast autolysis in sparkling wine – a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 119–127.
- Amaral, P.F.F., Lehoky, M., Barros-Timmons, M.V., Rocha-Leão, M.H.M., Coelho, M.A.Z., 2006. Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. *Yeast* 23, 867–877.
- Amory, D.E., Rouxhet, P.G., Dufour, J.P., 1988. Flocculation of brewery yeast and their surface properties: chemical composition, electrostatic charge and hydrophobicity. *Journal of the Institute of Brewing* 84, 79–84.
- Babayan, T.L., Bezrukov, M.G., 1985. Autolysis in yeasts. *Acta Biotechnologica* 2, 129–136.
- Baldwin, P.M., Melia, C.D., Davies, M.C., 1997. The surface chemistry of starch granules studied by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Journal of Cereal Science* 26, 329–346.
- Bellon-Fontaine, M.N., Raoult, J., van Oss, C.J., 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7, 47–53.
- Caridi, A., 2006. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek* 89, 417–422.
- Doco, T., Vuchot, P., Cheynier, V., Moutounet, M., 2003. Structural modification of arabinogalactan-proteins during aging of red wines on lees. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 150–157.
- Fornairon-Bonnefond, C., Camarasa, C., Moutonet, M., Salmon, J.M., 2002. New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: a bibliographic review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 36, 49–69.
- Gemmill, T.R., Trimble, R.B., 1999. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426, 227–237.
- Guilloux-Benatier, M., Chassagne, D., 2003. Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 746–751.
- Hernawan, T., Fleet, G.H., 1995. Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 440–450.
- Hunter, R.J., 1981. *Zeta Potential in Colloid Science*. Academic Press, New York.
- Jaehrig, S.C., Rohn, S., Kroh, L.W., Fleischer, L.-G., Kurz, T., 2007. In vitro potential antioxidant activity of (1->3), (1->6)-beta-D-glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4710–4716.
- Jin, Y.L., Speers, A., 1998. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International* 31, 421–440.
- Jungnickel, H., Jones, E.A., Lockyer, N.P., Oliver, S.G., Stephens, G.M., Vickerman, J.C., 2005. Application of TOF-SIMS with chemometrics to discriminate between four different yeast strains from the species *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Chemistry* 77, 1740–1745.
- Kamada, K., Murata, M., 1984. On the mechanism of brewer's yeast flocculation. *Agricultural Biology and Chemistry* 48, 2423–2433.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S., 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 239–256.
- Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W.J., 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185–202.
- Leroy, M.J., Charpentier, M., Duteurtre, B., Feuillat, M., Charpentier, C., 1990. Yeast autolysis during champagne aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 21–28.
- Li, J., McLandsborough, L.A., 1999. The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. *International Journal of Food Microbiology* 53, 185–193.
- Lockyer, N.P., Vickerman, J.C., 2004. Progress in cellular analysis using ToF-SIMS. *Applied Surface Science* 231–232, 377–384.
- Martínez-Rodríguez, A.J., Polo, M.C., Carrascosa, A.V., 2001. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *International Journal of Food Microbiology* 71, 45–51.
- Mercier-Bonin, M., Ouazzani, K., Schmitz, P., Lorthois, S., 2004. Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system. *Journal of Colloid and Interface Science* 271, 342–350.
- Mestdagh, M., Rouxhet, P., Doufur, J., 1990. Surface chemistry and flocculation of brewing yeasts. *Fermentation* 3, 31–37.
- Miki, B.L.A., Poon, N.H., James, A.P., Seligy, V.L., 1982. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 150, 878–889.
- Mortensen, H.D., Gori, K., Jespersen, L., Arneborg, N., 2005. *Debaryomyces hansenii* strains with different cell sizes and surface physicochemical properties adhere differently to a solid agarose. *FEMS Microbiology Letters* 249, 165–170.
- Piton, R., Charpentier, M., Troton, D., 1988. Cell wall and lipid changes in *Saccharomyces cerevisiae* during ageing of champagne wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 221–226.
- Pradelles, R., Alexandre, H., Ortiz-Julien, A., Chassagne, D., 2008. Effects of cell-wall characteristics on 4-ethylphenol sorption capacity in model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 11854–11861.
- Smit, G., Straver, M., Lugtenberg, B.J.J., Kijne, J.W., 1992. Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3709–3714.
- Stratford, M., Keenan, M.M.J., 1988. Yeast flocculation: quantification. *Yeast* 4, 107–115.
- Straver, M.H., Kijne, J.W., 1996. A rapid and selective assay for measuring cell surface hydrophobicity of brewer's yeast cells. *Yeast* 12, 207–213.
- Suzzi, G., Romano, P., Vannini, L., 1994. Cell surface hydrophobicity and flocculence in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2, 505–510.
- van der Mei, H.C., de Vries, J., Busscher, H.J., 2000. X-ray photoelectron spectroscopy for the study of microbial cell surfaces. *Surface Science Reports* 39, 1–24.
- Wilcocks, K.L., Smart, K.A., 1995. The importance of surface charge and hydrophobicity for the flocculation of chain-forming brewing yeast strains and resistance of these parameters to acid washing. *FEMS Microbiology Letters* 134, 293–297.

5.2.2 Anàlisi dels volàtils de la superfície de les *lies* de vins escumosos mitjançant l'optimització de la microextracció a l'espai de cap

Publicació

Joan Josep Gallardo Chacón, Stefania Vichi, Elvira Lopez-Tamames, Susana Buxaderas. Analysis of Sparkling Wine Lees Surface Volatiles by Optimized Headspace Solid-Phase Microextraction. *J Agric Food Chem* 57, 3279–3285, 2009.

Resum

L'objectiu del treball ha estat descriure quins compostos aromàtics es troben adherits a la superfície de les *lies* de cava en rima. Amb aquesta intenció, s'ha optimitzat un mètode basat en la microextracció en fase sòlida que ha estat assajat amb caves de cupatges diferents i amb diferents temps d'envelliment en rima. Per a la posada a punt del mètode, d'una banda, s'han realitzat assaigs previs per establir el tractament de la mostra, el temps d'extracció i el pes de mostra; i de l'altra, un disseny experimental de factors a diferents nivells per establir les condicions idònies de pH del medi, temperatura i volum de suspensió. Mitjançant assaigs previs, hom va optar per l'ús de *lies* en suspensió per incrementar la resposta cromatogràfica, el temps d'extracció es va establir en 40 min i el pes de mostra en 25 mg. A més, els resultats més adients van ser obtinguts amb pH 4, volum 1 mL i temperatura 50°C.

Un cop es disposava d'un mètode adequat a la matriu, es va assajar amb caves de les categories *Cava*, *Reserva* i *Gran Reserva* per establir quins volàtils poden ésser retinguts a la superfície de les *lies*. S'han identificat cinquanta-set compostos al perfil cromatogràfic de les *lies*. La major part dels volàtils són ésters, aldehids, norisoprenoides i terpens que han estat reportats també en caves. Entre els norisoprenoides destaca el 1-(2,4,6-trimetilfenil)buta-1,3-diè (TPB), descrit per primer cop en caves. Malgrat que els alcohols i àcids són majoritaris en el perfil de volàtils de tots els vins, apareixen només de manera

testimonial a la superfície de les *lies*. En el primer cas, hom ha proposat que el caràcter hidrofòbic de les *lies* no afavoreix la retenció d'aquest tipus de compostos. I en el cas dels àcids, el pH neutre que es fa servir a l'anàlisi provoca la seva protonació i podria dificultar llur extracció. Finalment, és digne de destacar que s'han descrit diversos compostos, relacionats estructuralment amb norisoprenoides, que no havien estat observats mai en caves. La importància d'aquests compostos serà tema d'estudis futurs.

Analysis of Sparkling Wine Lees Surface Volatiles by Optimized Headspace Solid-Phase Microextraction

JOAN GALLARDO-CHACÓN, STEFANIA VICHI,* ELVIRA LÓPEZ-TAMAMES, AND SUSANA BUXADERAS

Departament de Nutrició i Bromatologia, Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda Joan XXIII, s/n, E-08028, Barcelona, Spain

During sparkling wine aging, a narrow interaction is established between wine and lees of second fermentation, which remain in contact during long periods. In order to contribute to the knowledge on this interaction, volatile compounds retained by lees were described in this study. With this aim, solid phase microextraction (SPME) conditions were optimized in order to increase the sensibility for the analysis of volatiles sorbed by lees. This allowed proving the capacity of sparkling wine lees of second fermentation to retain several volatile compounds related with wine aroma: esters, aldehydes, norisoprenoids and terpenes known for their positive flavor impact were found in lees headspace. Most of them were previously described in “Cava” sparkling wine, while some compounds, such as the tentatively identified trimethyl tetrahydronaphthalenes, were not previously identified in yeasts or wine.

KEYWORDS: Lees; sparkling wine; aroma; sorption; solid phase microextraction

INTRODUCTION

Cava sparkling wines are elaborated using the traditional practice of “sur lie” aging that includes a long time of contact between lees and wine (minimum nine months). During this period, different compounds such as lipids, carbohydrates, amino acids, peptides and volatiles could be released in a process known as autolysis (1). This process has a very important role in sparkling wines’ “bouquet” conformation (2). Finally, when the over-lees is finished, the lees are removed from the bottle becoming a residue.

Lees are composed mainly by yeast cells (3), and it is the outer part of yeasts, which is in constant contact with wine. This cell wall makes up between 25 and 50% of cell volume (4), and it is structured in an inner network of ramified glucans and outer layer of mannoproteins (5). These compounds confer to cells physicochemical properties that enable yeasts and lees to interact with other compounds. Yeast cells have shown differences in their wall composition depending on the species and strains. Therefore, this diversity in molecules could affect the interaction with wine (6). The sorption capacity of yeasts and lees surface toward several organic substances has been proved, such as in the case of wine polyphenols (7). In most cases the interactions between yeast and organic compounds were exploited for the natural removal of undesirable compounds from wine, such as toxins, pesticides, antifoaming and volatile compounds (8). The study of yeasts’ sorption potential for the removal of undesirable volatiles in wine was principally focused on volatile phenols (9–11). Moreover, the sorptive properties

of this biological material were proved by adding yeast cell walls to a model wine containing esters, higher alcohols and β -ionone and obtaining the increase of their retention in solution (12). In particular, proteins were the cell wall component claimed to bind volatile compounds (9–11).

During sparkling wine aging, a narrow interaction is established between wine and lees of second fermentation, which remain in contact during long periods. The exchanges of volatile compounds between wine and lees are thought to be a main aspect in the development of cava sparkling wine *bouquet* during aging (1). A decrease of volatile compounds after lees contact was reported in white wines, demonstrating the importance of lees sorption phenomena on wine aroma (13). Moreover, the capacity of lees to retain aromatic substances could be of great interest for the aroma industry, for the possible use of this byproduct once the biological aging of wine has finished. At present, wine lees are already used for the recovery of tartaric acid (14).

The ability of yeast lees to modify the volatile composition of wines has been indirectly evaluated by analyzing the volatiles of wines after the exposure to lees (15–17). To our knowledge, the study of the volatiles directly retained by the lees surface has never been performed. Only a few studies detecting volatile compounds in commercial yeast extracts or pastes are available in literature (18, 19), but in these cases, the volatile compounds are mainly attributed to thermal generation due to industrial production processes. As well, Kotseridis et al. (20) reported the volatiles of some commercial dried yeast before fermentation.

The aim of the present work was to describe the volatiles retained by lees during second fermentation of sparkling wines. With this purpose, an optimized headspace solid phase mi-

* Corresponding author. Phone: +34 93 4024508. Fax: +34 93 4035931. E-mail: stefaniavichi@ub.edu.

croextraction method coupled to gas chromatography and mass spectrometric detection (SPME–GC/MS) was developed and applied to a heterogeneous group of sparkling wines lees in order to obtain a wide qualitative profile of lees' surface volatiles.

MATERIAL AND METHODS

Sample Preparation. The experimental design for the optimization of the analytical method was carried out with lees of the same batch of sparkling wine bottles.

Once the extraction conditions were established, the lees of six sparkling wines pertaining to the categories Cava, Cava Reserva and Cava Gran Reserva were analyzed. Two different bottles were analyzed for each type of cava (total 6×2 , 750 mL bottles).

Prior to the SPME analysis, the lees were prepared as follows: the content of 1 bottle was centrifuged for 15 min at 1410g and 4 °C (Rotina 48CR); the pellet was resuspended in 10 mL of the same wine, then filtered through 0.45 μm pore size cellulose filter (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) and finally washed with 2 mL of NaCl 0.9% (Panreac, Barcelona, Spain). Between 300 and 500 mg of lees were obtained after this process.

SPME Conditions. The SPME fiber used was divinylbenzene/Carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 50/30 μm , 2 cm long, from Supelco (Bellefonte, PA).

For the analysis, 25 mg of lees was placed into a 10 mL vial and suspended in different volumes of NaCl solution. The vial was then fitted with a silicone septum, and the lees were maintained in suspension by means of magnetic stirring (700 rpm). After 10 min of sample conditioning, the fiber was exposed to the sample headspace during 40 min.

Multilevel Factorial Experimental Design. The variables tested were as follows: sample dilution with NaCl solution 0.9% (1 or 4 mL), extraction temperature (40 or 50 °C) and pH of NaCl solution (pH 4 or pH 7). The solution at pH 4 was achieved by adjusting the NaCl solution 0.9% with HCl 0.1 N (Panreac, Barcelona, Spain) before suspending the lees, while a 10 mM phosphate buffer in NaCl 0.9% was used to suspend the lees at pH 7. The pH of each suspension was checked after the extraction and confirmed to maintain at values of 4 and 7, according to the solution used.

The optimized experimental design involved 16 experiments. The best extraction conditions were as follows: volume of suspension 1 mL at pH 7, and extraction temperature 50 °C.

GC–MS Analysis. Identification of compounds was performed by gas chromatography coupled to quadrupole mass selective spectrometry using an Agilent 5973 Network detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Analytes were separated on a Supelcowax-10 (Supelco) 30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness and on a Equity DB-1 Fused Silica Column (Supelco) 60m \times 0.25 mm i.d. 0.25 μm film thickness. Column temperature was held at 60 °C for 3 min, increased to 75 at 4 °C/min, then to 260 at 8 °C/min, holding 5 min. The injector temperature was 260 °C and the time of desorption of the fiber into the injection port was fixed at 5 min. Helium was the carrier gas, at a linear velocity of 38 cm/s. The temperature of the ion source was 175 °C and the transfer line, 280 °C. Electron impact mass spectra were recorded at 70 eV ionization energy, 2 scan/s. GC–MS analysis in the complete scanning mode (SCAN), in the 40–300 u mass range, was performed to allow the identification of compounds in lees samples.

Determination of the Linear Dynamic Range. In order to establish an interval of sample weight allowing the detection of the maximum number of compounds, but avoiding the saturation of the fiber, different amounts of lees were analyzed at the optimized extraction conditions.

Characterization of Volatiles in Lees. Compounds were identified by comparison of their mass spectra and retention times with those of standard compounds, or by comparison of the mass spectrum with those of the mass spectra library Wiley sixth. Reference compounds used for the identification of lees volatiles were purchased by Sigma-Aldrich (S. Louis, MO). Kovats' retention indices were determined with reference to a homologous series of linear alkanes and compared with those available in the literature for two capillary columns with different polarity.

Statistical Analysis. The statistical data were obtained using Statgraphics Plus 5.1. The significance of the factors studied in the experimental design and the optimum values for each factor were established by means of ANOVA and regression model analyses, respectively. Simple linear regression was used to evaluate the dependence between lees weight and chromatographic response. Results were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Extraction Conditions. Preliminary Assays. DVB/CAR/PDMS was the fiber selected for the study in view of its capacity to extract a broad variety of analytes. Furthermore, the suitability of this fiber for wine volatile profile analysis, compared with other commercial coatings, has been previously reported (21–23).

A preliminary comparison of the SPME uptakes achieved by analyzing filtered lees and lees in suspension was performed. The chromatographic response of 25 mg of lees after filtration was compared with that obtained analyzing 25 mg of the same lees resuspended in 4 mL of NaCl 0.9%, and maintained under magnetic stirring (700 rpm). An increase of 54% in the total chromatographic area was observed by analyzing lees in suspension (data not shown). The higher effectiveness of this extraction mode could be due to higher volatility of compounds in aqueous solution, and justified by a higher exposition of the lees surface compared to direct extraction of wet lees, which tend to agglomerate. For the same reason, this extraction mode should improve the repeatability of the extraction.

A suitable extraction time was also previously established by analyzing 25 mg of lees suspended in 1 mL of NaCl 0.9%, at 50 °C and under magnetic stirring, during 30, 40 and 60 min. An enhancement of 19% in the total chromatographic area was observed by increasing the extraction time from 30 to 40 min, while a further increase of the extraction time to 60 min only resulted in a 1% of increase of the response (data not shown). On this basis, the extraction time was fixed in 40 min.

Experimental Design Evaluation. The influence of each variable on the chromatographic response of major compounds was evaluated by multifactor ANOVA analysis of the experimental design's results. Moreover, the optimal extraction conditions were statistically established on the basis of final regression models from the factorial design results (Table 1). The factors studied were extraction temperature (T), sample volume (Vol) and pH of the aqueous phase. Extreme conditions of pH, temperature or ionic strength were avoided in order to preserve the structure of the yeast cells.

The number and state of cells were microscopically analyzed before and after the extraction. Neither significative reduction in cell number nor important changes in cell morphology were observed, leading us to suppose that in all the cases the integrity of lees was preserved. Moreover, quantitative rather than qualitative differences were found between the volatile profiles obtained in the distinct conditions assayed, suggesting that none of these conditions induced the generation of specific artifacts.

For most of the compounds evaluated, the best results were obtained at the extraction temperature of 50 °C and by diluting lees in 1 mL of NaCl solution (Table 1), likely because a smaller solvent volume involved a higher concentration of volatiles in solution (24) and a higher temperature enhanced their volatilization. Finally, the compounds whose uptakes were significantly influenced by pH showed better extraction results when SPME extraction was carried out at pH 7, excepting decanoic acid, β -farnesene, diethyl succinate and geranyl acetone. Furthermore, at this pH value a positive significant interaction with temperature and volume was observed for many compounds, which

Table 1. Results of the Factorial Experimental Design for the Extraction of Volatiles in Sparkling Wine Lees^a

compound	factor			significant interaction ^e		
	T (A) ^b	Vol (B) ^c	pH (C) ^d	AB	AC	BC
hexanal	50	1				*
heptanal	50	1		*		
limonene	50	4		*	*	*
ethyl hexanoate	50					
octanal	50	1			*	*
6-methyl-5-hepten 2-one	50					*
1,1,6-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene	50	1				
methyl octanoate						
nonanal	50	1	7	*		
ethyl octanoate	50					
isoamyl hexanoate	50	1			*	
2-ethylhexanol		1				
decanal	50					
propyl octanoate	50	1			*	
vitispirane isomer	50	1				
vitispirane isomer	50	1				
ethyl nonanoate	50	1	7		*	
methyl propyl octanoate	50	1				
trimethyl tetrahydronaphthalene isomer	50	1	7	*		*
methyl decanoate	50	1	7			
ethyl decanoate	50	1	7			
isoamyl octanoate	50	1	7		*	
trans- β -farnesene	50	1	4	*		*
diethyl succinate	50	1	4		*	*
ethyl-9-decenoate	50	1	7			
propyl decanoate	50	1	7			
α -muurolene	50	1			*	
6-(1,1-dimethylethyl)-1,2,3,4, tetrahydronaphthalene		1				*
1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN)	50	1				
decanol	50	1				
cis- α -bisabolene	50	1				
hexyl octanoate	50	1				
α -farnesene	50	1			*	
1-(2,4,6-trimethylphenyl)buta-1,3 diene (TPB)	50	1	7	*		
ethyl laurate	50	1				
geranyl acetone	50		4			*
isoamyl decanoate	50	1				
ethyl-9-hexadecenoate	50	1	7	*	*	*
sesquiterpene	50	1				
nerolidol	50	1	7		*	*
ethyl myristate		1				
6-methoxy-1-acetonaphthone	50	1				
α -bisabolol	50	1	7			*
sesquiterpene						
decanoic acid			4			

^a The significance of each factor and interaction was tested by ANOVA. The optimal values, established by final regression models from the factorial design results, are reported only for significant factors. ^b Temperature. ^c Volume. ^d pH. ^e $p < 0.05$. *Significant interaction ($p < 0.05$) between two factors.

determined an enhancement of their extraction. The effect of pH on the extraction of volatile compounds could be due to the modification of the charge of macromolecules like mannoproteins, which were proposed to be mainly responsible for the sorption of some compounds in yeast's cell wall (10).

On the basis of the above-mentioned results, the following conditions were considered as the most suitable for the analysis of volatiles retained on lees surface: volume of suspension 1 mL, extraction temperature 50 °C and pH 7 (10 mM phosphate buffer in NaCl 0.9%).

Effect of Sample Size on SPME Analysis. The SPME coating possesses a limited number of sorption sites, and an excess of analytes could cause the saturation of the fiber (24). This effect would make difficult the appreciation of quantitative differences in the volatile profiles of distinct samples. To ensure performing the analysis below the saturation of the fiber and to establish an amount of sample sufficient to detect minor volatiles, different weights of lees were analyzed at the optimized extraction conditions and the responses given were evaluated. **Figure 1** illustrates the chromatographic response of four

representative compounds belonging to different chemical families, as a function of sample weight. For all the volatiles a significant ($p < 0.05$) linear correlation was observed in the range of 4–37 mg of lees between the sample weight and the chromatographic response ($r > 0.90$). The amount of lees used in the experiments was 25 mg, which was situated within the linear section and allowed the detection of some minority compounds.

Volatiles Detected in Sparkling Wine Lees. Major Compounds. Fifty-seven compounds were identified or tentatively identified by applying the optimized SPME–GC/MS method for the analysis of lees from twelve samples of sparkling wines pertaining to six distinct commercial categories. Major compounds of samples' headspace are reported in **Table 2**, together with their identification parameters. Although the quantification of volatiles in lees samples was not considered in the present study, the relative abundance of volatiles (expresses as area counts) was reported in order to assess their relative proportions in the volatile profile of lees. Several esters, aldehydes, norisoprenoids, and terpenes constituted the major compounds

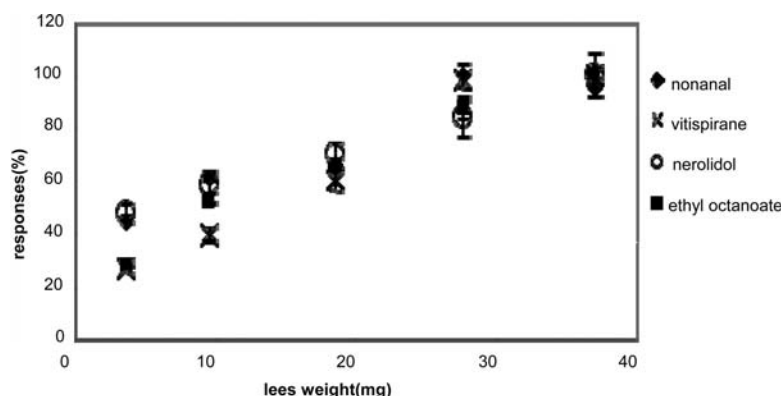


Figure 1. Normalized response of nonanal, ethyl octanoate, vitispirane, and nerolidol obtained from different weights of lees. The results are expressed as percent of normalized chromatographic areas.

Table 2. Major Volatile Compounds in the Headspace of Lees from Sparkling Wine Samples ($n = 12$) of Different Commercial Categories

code	compound	ions ^a	Carbowax		DB-1		abundance ^d		ID ^e
			KI ^b	KI lit. ^c	KI	KI lit.	min	max	
1	hexanal	44, 56, 100	1064	1084 (25)			nd ^f	7.6E06	S, ^g MS, ^h RI ⁱ
3	limonene	68, 93, 136	1176	1178 (25)	1030	1025 (26)	nd	3.0E06	S, MS, RI
4	ethyl hexanoate	88, 99, 142	1219	1220 (25)	983	980 (26)	2.5E06	6.5E07	S, MS, RI
5	octanal	41, 57, 128	1276	1280 (25)			nd	2.4E06	S, MS, RI
6	6-methyl-5-hepten 2-one	55, 69, 108, 126	1324		968	969 (26)	nd	1.4E06	S, MS, RI
9	methyl octanoate	74, 87, 158	1374	138 3(25)			nd	3.8E06	S, MS, RI
10	nonanal	57, 70, 142	1379	1385 (27)	1087	1103 (26)	2.5E06	1.1E07	S, MS, RI
11	ethyl octanoate	88, 101, 172	1427	1436 (25)	1185	1173 (26)	1.2E09	4.6E09	S, MS, RI
12	isoamyl hexanoate	70, 99, 186	1443	1451 (27)	1232	1233 (27)	nd	3.0E07	MS, RI
14	2-ethylhexanol	57, 43, 127	1469				nd	2.6E06	MS
15	decanal	57, 70, 128	1482	1484 (28)	1193	1184 (26)	2.3E06	1.1E07	S, MS, RI
16	propyl octanoate	141, 27, 186	1499	1508 (28)	1268	1270 (26)	3.1E06	1.3E07	MS, RI
17	vitispirane isomer	93, 121, 192	1510	1508 (27)	1280	1270 (27)	1.0E07	8.0E07	MS, RI
18	vitispirane isomer	93, 121, 192	1513	1511 (27)			1.6E07	7.7E07	MS, RI
19	ethyl nonanoate	88, 101, 186	1516	1528 (28)	1271	1279 (26)	3.6E06	8.8E06	S, MS, RI
21	methyl propyl octanoate	127, 157, 200	1534				3.4E06	1.4E07	MS
23	methyldecanoate	74, 87, 186	1576	1590 (25)			nd	3.8E06	S, MS, RI
24	2-undecanone	58, 43, 170	1580	1606 (25)			2.5E06	1.1E07	S, MS, RI
26	ethyl decanoate	88, 101, 200	1629	1636 (25)	1307	1308 (26)	2.8E09	5.3E09	S, MS, RI
27	isoamyl octanoate	70, 43, 199	1645	1647 (25)	1385	1377 (26)	1.0E08	2.2E08	S, MS, RI
29	diethyl succinate	101, 129, 174	1656	1690 (29)			nd	2.2E07	S, MS, RI
30	ethyl-9-decenoate	88, 55, 198	1675	1691 (27)			1.9E08	1.0E09	MS, RI
31	ethyl <i>cis</i> -4-decenoate	88, 55, 198	1684				nd	9.4E06	MS
33	propyldecanoate	173, 155, 214	1702		1472	1473 (26)	nd	8.0E06	MS, RI
36	1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN)	157, 142, 172	1731	1731 (27)	1358	1336 (27)	1.0E08	5.6E08	MS, RI
37	decanol	55, 70, 112	1737	1763 (28)			nd	3.6E06	S, MS, RI
39	hexyl octanoate	145, 84, 228	1788	1796 (28)			2.5E06	5.0E06	S, MS, RI
40	<i>trans</i> - β -damascenone	69, 121, 207	1800	1820 (20)			5.9E05	3.6E06	MS, RI
42	1-(2,4,6-trimethylphenyl)buta-1,3-diene (TPB)	157, 142, 172	1811	1826 (28)			1.8E06	9.8E06	MS, RI
43	ethyl laurate	88, 101, 228	1822	1851 (29)			1.2E08	3.7E08	S, MS, RI
44	geranylacetone	43, 69, 194	1833	1840 (25)			nd	1.9E06	S, MS, RI
45	isoamyldecanoate	70, 155, 242	1840				2.9E07	9.3E07	MS, RI
46	ethyl-9-hexadecenoate	55, 69, 282	1863	1853 (27)	1633	1633 (26)	2.7E06	1.5E07	MS, RI
51	ethylmyristate	88, 101, 256	2020				4.5E06	2.5E07	S, MS, RI
54	ethylpalmitate	88, 101, 284	2213	2229 (28)			9.7E06	5.7E07	S, MS, RI
55	ethyl-9-hexadecenoate	55, 69, 282	2227				3.1E07	1.9E08	MS
57	decanoic acid	73, 60, 172	2240	2307 (27)			6.9E06	1.0E08	S, MS, RI

^a Principal mass spectra fragments. ^b Kovats' retention index. ^c Kovats' retention index reported in literature. ^d Interval of abundance expressed as area counts, obtained analyzing lees samples from different sparkling wines. ^e Identification method. ^f nd: not detected. ^g S: Identified by comparison with standard compounds. ^h MS: Tentatively identified by mass spectra (comparison with NIST and Wiley libraries). ⁱ RI: Tentatively identified by retention index.

in the headspace of sparkling wine lees. As expected, most of the volatiles retained by the lees surface were previously reported in cava (22, 27). The long periods of contact between lees and wine during the biological aging promoted their interaction and permitted the establishment of partition equilibria.

Esters have a great importance in the chromatographic profile of both wines (27, 29, 30) and lees (Table 2). The

cell surface could retain these compounds once the fermentation has finished or adsorb them during wine aging. Vitispiranes, 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN), β -damascenone and 1-(2,4,6-trimethylphenyl)buta-1,3-diene (TPB) were the major norisoprenoids identified on lees surface (Table 2). Increasing TDN and vitispirane amounts were observed in Cava during the aging in contact with lees (22), while TPB is a potent odorant identified in crude glycosidic

Table 3. Minor Volatile Compounds in the Headspace of Lees from Sparkling Wine Samples ($n = 12$) of Different Commercial Categories, Determined by Analyzing Typical Mass Spectra Fragments

code	compound	ions ^a	Carbowax		DB-1		abundance ^d		ID ^e
			IK ^b	IK lit. ^c	IK	IK lit.	min	max	
2	heptanal	70, 44, 114	1169	1174 (25)			nd ^f	1.4E05	S, ^g MS, ^h RI ⁱ
7	1,1,6-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene	159, 144, 174	1350	1347 (46)			nd	3.0E05	MS, RI
8	trimethyl tetrahydronaphthalene isomer	159, 144, 174	1372				nd	3.0E05	MS
13	trimethyl tetrahydronaphthalene isomer	159, 144, 174	1458				nd	1.1E05	MS
20	linalool	71, 93, 121, 153	1524	1540 (27)			nd	7.4E05	S, MS, RI
22	trimethyl tetrahydronaphthalene isomer	159, 144, 174	1539				nd	1.7E06	MS
25	trimethyl tetrahydronaphthalene isomer	159, 129, 174	1607				nd	9.7E05	MS
28	<i>trans</i> - β -farnesene	69, 93, 204	1650	1648 (25)	1431	1430 (26)	nd	2.6E05	S, MS, RI
32	trimethyl dihydronaphthalene (TDN) isomer	157, 142, 172	1697				1.2E05	5.6E05	MS
34	α -muurolene	105, 161, 204	1709	1714 (25)			2.7E05	1.0E06	MS, RI
35	6-(1,1-dimethylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene	173, 155, 188	1714				5.8E05	3.3E06	MS
38	<i>cis</i> - α -bisabolene	93, 119, 204	1751	1778 (28)			1.3E05	3.8E05	MS, RI
41	α -farnesene	93, 69, 204	1793	1725 (28)			9.0E04	3.8E05	S, MS, RI
47	8-isopropyl-2,5-dimethyl tetrahydronaphthalene	187, 159, 202	1874				nd	1.5E05	MS
48	trimethyl dihydronaphthalene (TDN) isomer	157, 142, 172	1986				6.1E05	2.6E06	MS
49	sesquiterpene	121, 133, 204	1990				2.1E05	4.7E05	MS
50	nerolidol	69, 93, 204	2008	2009 (28)			2.6E06	1.5E07	MS, RI
52	6-methoxy-1-acetonaphthone	185, 157, 200	2042		1774	1778 (26)	3.7E05	9.4E05	MS, RI
53	α -bisabolol	109, 119, 204	2189	2021 (28)			nd	4.2E05	MS, RI
56	dehydroaromadendrene	159, 105, 202	2240	2287 (46)			4.23E04	1.7E05	MS, RI

^a Principal mass spectra fragments. ^b Kovats' retention index. ^c Kovats' retention index reported in literature. ^d Interval of abundance expressed as area counts, obtained analyzing lees samples from different sparkling wines. ^e Identification method. ^f nd: not detected. ^g S: identified by comparison with standard compounds; nd: not detected. ^h MS: Tentatively identified by mass spectra (comparison with NIST and Wiley libraries). ⁱ RI: Tentatively identified by retention index.

extract of grapes and in white wines (31, 32) which has not been described yet in cava sparkling wine.

Although higher alcohols, in particular isoamyl alcohol, represent an important part of the volatile profile of cava sparkling wines (22, 27), only small amounts of decanol and 2-ethylhexanol were found in the headspace of lees samples. In agreement with previous studies on yeast wall behavior in model wine (11) yeast lees seem to possess a scarce capacity to retain alcohols on their surface.

Organic volatile acids are another major group of compounds in wines' volatile profile that were almost absent in lees headspace. The analytical conditions used in the study are in this case a possible cause of the absence of acids in the samples' headspace because of their dissociation at pH 7.

Unexpectedly, sulfur compounds usually related to wine aging in contact with lees and responsible for empyreumatic notes such as "yeast", "bread", "toasted" or even for olfactory defects (33–37) were not detected among the volatiles present on lees' surface. Various hypotheses can be made to explain this fact. It could be due to their very low concentrations in wines, or to a scarce affinity of lees surface for these compounds, as already observed for alcohols. On the other hand, the capacity of lees to remove sulfurs from wine was demonstrated (34, 38, 39), thus indicating a high capacity of lees to retain these compounds. Nevertheless, the mechanism proposed to explain thiols' removal by lees involves their interaction with thiol groups of lees' mannoproteins, leading to the formation of disulfide bridges (34). This covalent binding of thiols to the lees surface would avoid their volatilization and their presence in the headspace.

These results seem to confirm that the nature of the volatiles has an important effect on their sorption by lees surface, as previously demonstrated for yeast walls (11). The higher hydrophobicity of esters could explain their larger retention by lees compared with the major wine alcohols, which remained almost undetected in the lees headspace. As well, very hydrophobic minor compounds such as norisoprenoids were retained by lees. In particular, TPB has not been detected in sparkling

wine but it was detected in lees, leading us to suppose that very low amounts of TPB could be present in sparkling wine and they are largely sorbed on lees surface.

Minor Compounds. In addition to the major compounds above-described, a number of minor compounds were identified or tentatively identified in the headspace of lees samples by means of analysis of characteristic ions (Table 3). Some aliphatic ketones such as geranyl acetone, which is related to the degradation of C13 carotenoids, and 6-methyl-5-hepten-2-one were detected. None of them has been described in Cava wines, but their presence was reported in other wines or in some grape variety (40–42). As well, six compounds with sesquiterpene structure were tentatively identified among minor compounds (Table 3). Sesquiterpenes were reported to be synthesized in grape berries (43) and were described in wines as important sensory contributors (44). Some compounds with sesquiterpene structure were already detected in sparkling wine samples (27, 42). As far as we know, the sesquiterpenoids tentatively identified as bisabolene, bisabolol and dehydroaromadendrene were not previously identified in wine or grape.

Finally, it is worth mentioning the presence on lees surface of a number of norisoprenoid related compounds, to which trimethyl tetrahydronaphthalene and trimethyl dihydronaphthalene structures were tentatively assigned on the basis of their mass fragmentation (Table 3). Compounds characterized by fragments m/z 157, 142 and 172 were tentatively identified as TDN isomers, while those characterized by the presence of mass fragments m/z 159, 144 and 174 were tentatively identified as trimethyl tetrahydronaphthalene isomers. It is possible to note that the principal fragments of the latter possess two mass units more than fragments of TDN related compounds.

Trimethyl tetrahydronaphthalenes were found in the volatile profile of tomato paste (45) and starfruit (46), but to the best of our knowledge, none of these compounds has been previously reported neither in yeast derivatives nor in wine. A high affinity of lees surface for these volatiles could explain the detection of these compounds not previously identified in sparkling wine.

Nevertheless, further studies are necessary to confirm their identification and their presence in sparkling wine. The characteristic norisoprenoid structure leads us to suppose that they could be substances with a high sensory impact.

In conclusion, the affinity of sparkling wine lees of second fermentation toward several volatile compounds related with wine aroma was demonstrated by an optimized SPME–GC/MS analysis of lees samples from wines of different commercial categories. Esters, aldehydes, norisoprenoids and terpenes known for their positive flavor impact were found in lees headspace. Most of them were previously described in cava sparkling wine, while some compounds, such as trimethyl tetrahydronaphthalenes, were not previously identified in yeasts or wine. These results corroborate the importance of the surface interaction between lees and wine in the development of sparkling wine characteristics during aging.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Freixenet S.A. wineries for providing samples.

LITERATURE CITED

- Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. Yeast autolysis in sparkling wine - a review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**, *12*, 119–127.
- Guilloux-Benatier, M.; Chassagne, D. Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 746–751.
- Fornairon-Bonnefond, C.; Camarasa, C.; Moutounet, M.; Salmon, J. M. New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: A bibliographic review. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2001**, *35*, 57–78.
- Lipke, P. N.; Ovalle, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 3735–3740.
- Osumi, M.; Konomi, M.; Sugawara, T.; Takagi, T.; Baba, M. High-pressure freezing is a powerful tool for visualization of *Schizosaccharomyces pombe* cells: ultra-low temperature and low-voltage scanning electron microscopy and immunoelectron microscopy. *J. Electron Microscop.* **2006**, *55*, 75–88.
- Palomero, F.; Morata, A.; Benito, S.; Calderón, F.; Suárez-Lepe, J. A. New genera of yeasts for over-lees aging of red wine. *Food Chem.* **2009**, *112*, 432–441.
- Mazauric, J. P.; Salmon, J. M. Interaction 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.* **2005**, *53*, 5647–5653.
- Perez-Serradilla, J. A.; de Castro, M. D. Role of lees in wine production: A review. *Food Chem.* **2008**, *111*, 447–456.
- Chassagne, D.; Guilloux-Benatier, M.; Alexandre, H.; Voilley, A. Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chem.* **2005**, *91*, 39–44.
- Pradelles, R.; Alexandre, H.; Ortiz-Julien, A.; Chassagne, D. Effects of cell-wall characteristics on 4-ethylphenol sorption capacity in model wine. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11854–11861.
- Pradelles, R.; Alexandre, H.; Ortiz-Julien, A.; Chassagne, D. Key protein of *Saccharomyces cerevisiae* wall involved in 4-ethylphenol sorption in a model wine. Wine Active Compounds—Proceedings of the WAC2008 International Conference, Beaune, 27–29th March 2008, pp 207–209.
- Lubbers, S.; Charpentier, C.; Feuillat, M.; Voilley, A. Influence of yeast walls on the behaviour of aroma compounds in a model wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, *45*, 29–33.
- Medina Carnicer, M.; Zea Calero, L.; Peinado Amores, R.; Moreno Vigara, J. J.; Moyano Cañete, L.; Bueno González Tejero, J. E. Efecto del período de contacto con las lías de fermentación sobre el contenido en aromas de los vinos blancos. *Vitic. Enol. Prof.* **2002**, *82*, 55–56.
- Braga, F. G.; Lencant Silva, F. A.; Alves, A. Recovery of winery by-products in the Douro demarcated region: production of calcium tartrate and grape pigments. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 41–45.
- Bautista, R.; Fernández, E.; Falqué, E. Effect of the contact with fermentation-lees or commercial-lees on the volatile composition of white wines. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224*, 405–413.
- Bueno, J. E.; Peinado, R. A.; Medina, M.; Moreno, J. Effect of a short contact time with lees on volatile composition of Airen and Macabeo wines. *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1007–1011.
- Jiménez-Moreno, N.; Ancín-Azpilicueta, C. Binding of oak volatile compounds by wine lees during simulation of wine ageing. *Lebensm.-Wiss. -Technol.* **2007**, *40*, 619–624.
- Comuzzo, P.; Tat, L.; Tonizzo, A.; Battistutta, F. Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. *Food Chem.* **2006**, *99*, 217–230.
- Mahadevan, K.; Farmer, L. Key Odor Impact Compounds in Three Yeast Extract Pastes. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7242–7250.
- Kotseridis, Y.; Baumes, R. Identification of Impact Odorants in Bordeaux Red Grape Juice, in the Commercial Yeast Used for Its Fermentation, and in the Produced Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 400–406.
- E. Marengo, E.; Aceto, M.; Maurino, V. Classification of Nebbiolo-based wines from Piedmont (Italy) by means of solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds. *J. Chromatogr. A* **2001**, *943*, 123–137.
- Riu-Aumatell, M.; Bosch-Fuste, J.; Lopez-Tamames, E.; Buxaderas, S. Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. *Food Chem.* **2006**, *95*, 237–242.
- Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Volatile compounds of red and white wines by headspace-solid-phase microextraction using different fibers. *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*, 110–116.
- Pawliszyn, J. In *Applications of Solid Phase Microextraction*; Pawliszyn, J., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., 1999; p 3.
- <http://www.nysaes.cornell.edu/flavornet/chem.html>
- <http://webbook.nist.gov/chemistry>.
- Bosch-Fuste, J.; Riu-Aumatell, M.; Guadayol, J. M.; Caixach, J.; Lopez-Tamames, E.; Buxaderas, S. Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* **2007**, *105*, 428–435.
- <http://www.pherobase.com>.
- Selli, S.; Cabaroglu, T.; Canbas, A.; Erten, H.; Nurgel, C.; Lepoutre, J. P.; Gunata, Z. Volatile composition of red wine from cv. Kalecik Karasi grown in central Anatolia. *Food Chem.* **2004**, *85*, 207–213.
- Hidalgo, P.; Pueyo, E.; Pozo-Bayón, M. A.; Martínez-Rodríguez, A. J.; Martín-Álvarez, P.; Polo, C. Sensory and analytical study of Rosé Sparkling Wines manufactured by second fermentation in bottle. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6640–6645.
- Silva Ferreira, A. C.; Guedes de Pinho, P. Nor-isoprenoids profile during port wine ageing-influence of some technological parameters. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 169–176.
- Janusz, A.; Capone, D. L.; Puglisi, C. J.; Perkins, M. V.; Elsey, G. M.; Sefton, M. A. (E)-1-(2,3,6-trimethylphenyl)buta-1,3-diene: a potent grape-derived odorant in wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7759–7763.
- Rapp, A.; Güntert, A.; Almy, J. Identification and significance of several sulphur-containing compounds in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, *3*, 219–221.
- Vasserot, Y.; Steinmetz, V.; Jeandet, P. Study of thiol consumption by yeast lees. *Antonie van Leeuwenhoek* **2003**, *83*, 202–207.
- De Mora, S. J.; Eschenbruch, R.; Knowles, S. L.; Spedding, D. J. The formation of dimethylsulfide during fermentation using a wine yeast. *Food Microbiol.* **1986**, *3*, 27–32.
- Jiranek, V.; Landridge, P.; Henschke, P. A. Regulation of hydrogen sulphide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 461–467.

- (37) Tamayo, C.; Ubeda, J.; Briones, A. Relationship between H₂S-producing strains of wine yeast and different fermentation conditions. *Can. J. Microbiol.* **1999**, *45*, 343–346.
- (38) Lavigne, V.; Dubourdieu, D. Demonstration and interpretation of the yeast lees ability to absorb certain volatile thiols contained in wine. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1996**, *30*, 201–206.
- (39) Palacios, S.; Varsserot, Y.; Maujean, A. Evidence for sulfur volatile products adsorption by yeast lees. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, *48*, 525–526.
- (40) Bonino, M.; Schellino, R.; Rizzi, C.; Aigotti, R.; Delfini, C.; Baiocchi, C. Aroma compounds of an Italian wine (Ruche) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS. *Food Chem.* **2003**, *80*, 125–133.
- (41) Coelho, E.; Rocha, S. M.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. 'aga' ripening. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 204–214.
- (42) Coelho, E.; Perestrelo, R.; Neng, N. R.; Câmara, J. S.; Coimbra, M. A.; Nogueira, J. M. F.; Rocha, S. M. Optimisation of stir bar sorptive extraction and liquid desorption combined with large volume injection-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry for the determination of volatile compounds in wines. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *624*, 79–89.
- (43) Lückner, J.; Bowen, P.; Bohlmann, J. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (–)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2649–2659.
- (44) Parker, M.; Pollnitz, A. P.; Cozzolino, D.; Francis, I. L.; Herderich, M. J. Identification and quantification of a marker compound for 'pepper' aroma and flavor in shiraz grape berries by combination of chemometrics and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5948–5955.
- (45) Buttery, R. G.; Teranishi, R.; Flath, R. A.; Ling, L. C. Identification of additional tomato paste volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 792–795.
- (46) MacLeod, G.; Ames, J. M. Volatile components of starfruit. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 165–172.

Received for review November 7, 2008. Revised manuscript received February 9, 2009. Accepted February 14, 2009. This study was made possible thanks to financial assistance from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Spain) AGL2005-03451, from the Generalitat de Catalunya (Spain), Project 2005SGR-00156, from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) through the Juan de la Cierva program and through a grant to the PhD student J.G.-C.

JF803493S

5.2.3 Activitat antioxidant de la superfície de les cèl·lules de les *lies* durant l'envelliment en rima dels vins escumosos

Publicació

Joan Josep Gallardo Chacón, Stefania Vichi, Pilar Urpí, Elvira Lopez-Tamames, Susana Buxaderas. Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine sur lie aging. *Int J Food Microbiol.* Sotmès.

Resum

L'objectiu de l'estudi és determinar la capacitat antioxidant de la superfície de les *lies* de vins escumosos en rima produïts a escala industrial. A més, hom ha intentat d'establir l'origen d'aquesta activitat. Per fer-ho, d'una banda, s'han adaptat a les *lies* de cava dos mètodes d'ús habitual en la determinació d'activitat antioxidant: el mètode del 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) i el mètode de la capacitat per reduir ferro del plasma (FRAP). I de l'altra, de la superfície de les *lies*, s'han determinat els tiols i s'han caracteritzat els extractes fenòlics. Un cop es disposava de les metodologies adequades, van ésser aplicades a mostres amb diferents temps de rima entre 2 i 40 mesos.

La superfície de les *lies* va mostrar valors de capacitat antioxidant superiors a algunes fruites i vegetals, essent els valors màxims: 24,5 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de cel·lules pel FRAP i 21,3 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de cèl·lules per FRAP (ambdós en pes fresc). A més, es va observar que la capacitat antioxidant de les *lies* era clarament inferior per les mostres amb períodes d'envelliment en rima més llargs; es pot, doncs, teoritzar que existeix una davallada en el poder reductor de les *lies* al llarg del temps.

Pel que fa a l'aproximació a les macromolècules responsables de l'activitat antioxidant, els polifenols representaven el $54 \pm 7\%$ de l'activitat antioxidant pel mètode de DPPH i $39 \pm 8\%$ pel mètode de FRAP. Finalment, els tiols representaven $25 \pm 11\%$ de l'activitat antioxidant determinada pel mètode DPPH (el FRAP no és capaç de detectar-los). La resta de l'activitat antioxidant pot ésser atribuïda als manans de la paret dels llevats.

Elsevier Editorial System(tm) for International Journal of Food Microbiology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine sur lie aging

Article Type: Full Length Article

Keywords: aging, sparkling wine, yeast lees, cell surface, antioxidant, DPPH, FRAP

Corresponding Author: dr Stefania Vichi,

Corresponding Author's Institution: Universitat de Barcelona

First Author: Joan J Gallardo-Chacón

Order of Authors: Joan J Gallardo-Chacón; Stefania Vichi; Pilar Urpí; Elvira López-Tamames; Susana Buxaderas

Suggested Reviewers: Cristina Reguant-Miranda
Bioquímica y Biotecnología, Universitat Rovira i Virgili
cristina.reguant@urv.cat
Experience in oxidative stress in enological microorganisms

David Chassagne
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Université de Bourgogne
david.chassagne@u-bourgogne.fr
Large experience in the study of yeast wall properties and physico chemical characteristics, as well as its use for enological purposes

Amparo Querol
Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alim, CSIC
aquerol@iata.csic.es
Long carrier in yeast research, including yeast oxidative stress and several aspects of enological fermentations

Rafael A Peinado
Department of Agricultural Chemistry, University of Cordoba
qe2peamr@uco.es
Experience in the effects of vinification in contact with lees

Cover Letter



International Journal of Food Microbiology
Editorial Office

Departament de Nutrició i Bromatologia

Facultat de Farmàcia
Av. Joan XXIII, s/n
08028 Barcelona
Tel. 34-93 402 45 08
Fax 34-93 402 18 96

Barcelona, March 1st, 2010

Dear Editor,

We would like to submit the manuscript entitled:

“Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine *sur lie* aging” by Joan J. Gallardo-Chacón, Stefania Vichi, Pilar Urpi, Elvira López-Tamames, Susana Buxaderas for its publication

All authors state that the paper has not been submitted for publication elsewhere.

Sincerely yours

Stefania Vichi

E-mail: stefaniavichi@ub.edu

All authors state that the paper has not been submitted for publication elsewhere and that the institutions where the authors work agree to the submission of this paper to the journal.

Sincerely,
Stefania Vichi

1 **Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine *sur lie* aging**

2 Joan J. Gallardo-Chacón^{a,b}, Stefania Vichi^{a*}, Pilar Urpí^c, Elvira López-Tamames^a, Susana
3 Buxaderas^a

4 ^a Departament de Nutrició i Bromatologia, Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments
5 (XaRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Avda Joan XXIII, s/n, E-08028,
6 Barcelona, Spain.

7 ^b CIBER-BBN, Networking Centre on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine,
8 Zaragoza, Spain, Centre de Recerca en Enginyeria Biomedica (CREB), Universitat Politècnica de
9 Catalunya, c/ Pau Gargallo 5, E-08028, Barcelona, Spain.

10 ^c Freixenet S.A. c/ Joan Sala, 2, E-08770, Sant Sadurní d' Anoya, Barcelona, Spain.

11

12 * Corresponding author

13 Phone: +34 93 4024508; Fax: +34 93 4035931; e-mail: stefaniavichi@ub.edu

14

15 **Abstract**

16 Given the importance of the interactions between wine and lees cell surface during sparkling
17 wine aging, and in view of recent results proving the antioxidant potential of yeast cell wall
18 biomolecules, the antioxidant capacity of lees cell surface was investigated to establish its
19 possible role in the antioxidative effect of lees. The surface antioxidant activity of lees from
20 wines with different aging periods was determined on the whole cell by two widely used
21 methods (DPPH and FRAP assays), obtaining maximum values of 24.5 $\mu\text{mol Trolox/g cells}$
22 (fresh weight) by the DPPH assay, and 21.3 $\mu\text{mol Trolox/g cells}$ (fresh weight) by the FRAP
23 assay. Lees surface antioxidant activity was influenced by base wine characteristics and
24 inversely related to *sur lie* aging period. Conversely, the percentage depletion of lees surface
25 antioxidant activity during aging was mainly determined by the length of aging, regardless of
26 wine characteristics. To examine the influence of cell wall thiol groups and adsorbed
27 polyphenols in lees' protective effect, their presence on cell surfaces was assessed. They
28 accounted for 25 \pm 11% and 54 \pm 7% of the antioxidant activity measured by DPPH, respectively,
29 and 0.3 \pm 0.1% and 39 \pm 8% measured by FRAP, respectively. Only a part of the remnant
30 antioxidant activity of lees surface measured by FRAP could be explained by the presence of
31 cell wall mannans.

32

33 **Keywords:** aging, sparkling wine, yeast lees, cell surface, antioxidant, DPPH, FRAP.

34

35

36 **Introduction**

37 Sparkling wines obtained by the *méthode champenoise* are characterized by two successive
38 fermentation processes. Yeasts for second fermentation are selected on the basis of some
39 desirable technological attributes such as pressure tolerance, alcohol resistance, capability for
40 growing at low temperature, low production of SO₂ and off-flavors, and flocculating ability
41 (Suárez-Lepe, 1997 and Zoecklein, 2002). Once the second fermentation has finished, cell
42 viability decreases more than 90% in one month (Hidalgo et al., 2004) and a degradation
43 process known as autolysis takes place (Leroy et al., 1990). Lees from the second fermentation
44 then remain in contact with the wine during a process called *sur lie* aging (Moreno-Arribas and
45 Polo, 2005) which lasts at least 9-12 months. The results of this practice have recently been
46 reviewed (Caridi, 2006; Fornairon-Bonnefond et al., 2002; Pérez-Serradilla and Luque de
47 Castro, 2008), and have indicated an increase in product structure, richness and roundness. In
48 particular, contact with yeast lees seems to protect wine from oxidation, contributing to the
49 prevention of browning (Caridi, 2006; Pérez-Serradilla and Luque de Castro, 2008; Palomero et
50 al., 2009) and the development of oxidation-related volatiles (Cullere et al., 2007). Model
51 phenolic solutions (López-Toledano et al., 2002) and sparkling wine (Bosch-Fusté et al., 2009)
52 subjected to different accelerated oxidation tests showed a significantly lower degree of
53 oxidative alteration when assayed in the presence of yeasts. The prevention of wine browning
54 could be an indirect effect of the absorption of colored compounds by lees (López-Toledano et
55 al., 2002; Razmkhab et al., 2002), but this resistance could also be ascribed to yeast-promoted
56 protection. The protective effect of lees could be largely due to the release of intracellular
57 compounds to the wine (Pinheiro et al., 2002; Santiago and Mori, 1993; Demasi et al., 2001),
58 as well as to membrane lipids, which consume oxygen during wine aging, thus preventing wine
59 oxidation (Salmon et al., 2000). Recent studies that evaluated the antioxidant activity of

60 different cell wall fractions of spent brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), proved the
61 significant antioxidant activity for wall proteins and glucans (Jaehrig et al., 2007; 2008). The
62 cell wall makes up between 25-50 % of cell volume (Lipke and Ovalle, 1998) and consists of an
63 inner three-dimensional network of ramified glucans and outer layer of mannoproteins (Kath
64 and Kulicke, 1999; Gemmill and Trimble, 1999). The antioxidant activity of these wall
65 biomolecules could also occur during *sur lie* aging contributing to prevent oxidation, and these
66 interactions deserve to be clarified. The studies on spent brewer's yeast have demonstrated
67 that much of yeast wall activity depends on the exposure of the reactive groups to substrate
68 (Jaehrig et al., 2007). At enological aging conditions, i.e. without cell disruption and fraction
69 isolation, some of these biomolecules may hardly interact with the wine because they
70 constitute inner layers of the cell wall or because intra- and intermolecular interactions make
71 the reactive groups inaccessible. The role of lees surface in protecting wine from oxidation
72 during *sur lie* aging should be then investigated on the entire cell, as it seems to maintain
73 along the usual aging period (Martínez-Rodríguez et al., 2001b). Cell wall degradation during
74 autolysis (Martínez-Rodríguez et al., 2001b; Piton et al., 1988) is expected to affect the
75 antioxidant capacity of lees surface by improving the accessibility of the reactive groups and
76 their exposition to the medium. However, the progressive loss of structural biomolecules
77 (Pueyo et al., 2000; Martínez-Rodríguez and Polo, 2000; Martínez-Rodríguez et al., 2001a;
78 Martínez-Rodríguez et al., 2001b) could reduce the number of reactive groups. The balance
79 between these phenomena would determine the effective participation of lees surface in
80 preventing sparkling wine oxidation during *sur lie* aging. Moreover, as yeasts growing
81 conditions influence the cell wall structure (Fornairon-Bonnefond et al., 2002), the antioxidant
82 potential of cell surface could differ in model fermentation systems and real enological
83 conditions. Therefore, to assess the role of lees cell surface, the antioxidant capacity during

84 the long aging period should be determined on the whole cell and preferably at real enological
85 conditions. As far as we know, the present paper represents the first study using this
86 approach.

87 The objective of the present study is to determine the antioxidant capacity of cell surface in
88 real lees samples obtained from sparkling wines produced at industrial scale by the *méthode*
89 *champenoise*. The antioxidant activity of whole cells was determined in lees from sparkling
90 wines with different *sur lie* aging periods. The identification of the molecules involved in the
91 antioxidant effect was attempted by determining the presence and antioxidant activity of cell
92 wall thiols and adsorbed wine polyphenols. In addition, the antioxidant activity of cell wall
93 polysaccharides was assessed and applied to the amounts theoretically present in the yeast
94 cell wall to estimate their possible influence on lees' protective effect.

95 **Material and Methods**

96 **Chemicals**

97 Sodium acetate trihydrate, sodium carbonate, acetic acid glacial, hydrochloric acid,
98 trifluoroacetic acid, FeCl₃·6H₂O, 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
99 in free radical form (DPPH·), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox),
100 methanol, 4,4'-dithiodipyridine (DTDP), Glutathione, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA),
101 Folin-Ciocalteu reagent, and mannan from *Saccharomyces cerevisiae* were from Sigma-
102 Aldrich (St. Louis, MO, USA). All reagents were prepared using Milli Q-deionized water.

103 **Lees samples**

104 Lees were obtained from industrial sparkling wines produced by Freixenet S.A. winery during
105 *sur lie* aging. Yeasts were from the same strain of *Saccharomyces cerevisiae* belonging to the
106 private collection of the winery and selected for its second fermentation and aging abilities.

107 Samples were from two distinct *coupages* of base wines (A and B). Lees were collected at the
108 same time from wines which had aged *sur lie* for 2, 10, 18 and 40 months. Lees from two
109 bottles were analyzed for each sample (total 8x2 bottles), making a total of 16 independent
110 samples analyzed in triplicate.

111 Sampling points corresponded to the aging periods of Cava sparkling wine categories: Cava (9
112 months), Reserva (18 months) and Gran Reserva (30 months) (BOE nº 50, february 2007), plus
113 one sampling point in the initial stages of *sur lie* aging (2 months).

114 **Lees isolation**

115 Lees were prepared as follows: the content of 1 bottle (750 mL) was centrifuged for 15 min at
116 1410 x *g* at 4 ° C (Rotina 48CR); the pellet was washed in 10 mL of acetate buffer (pH 3.6,
117 0.3M) and resuspended in 5 mL of the buffer. The lees were maintained refrigerated under a
118 nitrogen atmosphere. All the determinations were performed in the dark.

119 **Cell number and dry weight determination**

120 Each lees suspension in acetate buffer (pH 3.6, 0.3M) was tested using a Multisizer TM Coulter
121 Counter with a 70 µm aperture. The number of cells/mL was established by dividing the
122 number of events by the volume of the loop (500 µL). For each suspension the measure was
123 made in triplicate, and the mean values presented RSD<5%.

124 In order to estimate the approximate mannan amount in cell wall, lees' dry weight was
125 determined as follows: 1 mL of lees suspension in the acetate buffer was dried at 105 ° C for 1
126 hour in glass vials (tare weight known). The samples were cooled in a desiccator then weighed
127 (the weight of 1mL of acetate buffer was taken into account). The dry matter is expressed as
128 mg/million cells.

129 **Extraction of adsorbed polyphenols**

130 Yeast polyphenols were extracted using the method described by Mazauric and Salmon (2006)
131 modified as follows: 100 μ L of the isolated lees suspension was added to a mixture of
132 methanol/water/trifluoroacetic acid (80/20/0.05) with a final volume of 2 mL and placed in an
133 ultrasound bath with ice for 5 min. Supernatant was isolated by centrifugation for 15 min at
134 1410 x *g* at 4 ° C (Rotina 48CR).

135 **Folin-Ciocalteu reagent (FCR) reducing capacity method**

136 The FCR reducing capacity of polyphenol extracts was determined by modifying the official
137 method CEE 2676/90. Each sample (80 μ L) was diluted with 630 μ L of water in a 1 mL
138 spectrophotometer cuvette. After adding 40 μ L of FCR and 100 μ L of sodium carbonate 20%,
139 the solution was mixed and incubated at room temperature for 60 min. The absorbance was
140 read at 750 nm. The calibration curve was calculated by analyzing gallic acid solutions in the
141 concentration range of 10-50 nmol/mL, and the results were expressed as nmol of gallic acid
142 equivalents/million cells.

143 **Antioxidant activity of lees surface, polyphenol extracts and reference compounds**

144 The antioxidant activity of lees surface, polyphenol extracts and some reference compounds
145 was evaluated using two common methodologies: the free radical scavenging activity assay
146 using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method, and the reducing antioxidant power
147 assay using the ferric reducing ability of plasma (FRAP) method. Trolox, glutathione and yeast
148 mannan were the reference compounds analyzed, with final results expressed as nmol Trolox
149 equivalents/million cells.

150 **DPPH assay**

151 The DPPH assay was performed according to Molyneux (2004), modified as follows. A stock
152 solution of DPPH was prepared by diluting 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl in free radical form in
153 a mix (60:40) of methanol:acetate buffer (pH 5.5, 0.1 M). Once the DPPH stock solution was

154 added to the blank, the absorbance at 517 nm was approx. 0.8 (80 μ M) for lees suspensions
155 and 0.2 (18 μ M) for polyphenol extracts and reference compounds. Next, 0.5 mL of the DPPH
156 solution was mixed with 0.5 mL of progressive dilutions of the samples in methanol:acetate
157 buffer. After 30 min at room temperature the lees samples were filtered through 0.45 μ m
158 cellulose filters (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) and the decrease in
159 absorbance at 517 nm was measured. The EC50 was calculated as the number of cells
160 necessary to decrease the initial amount of DPPH to 50%.

161 **FRAP assay**

162 The FRAP assay was performed according to a modified version of the Benzie and Strain (1996)
163 method. The FRAP solution was prepared daily with 25 mL of 0.3 M acetate buffer (pH 3.6),
164 2.5 mL of 10 mM TPTZ solution in 40 mM HCl (previously prepared) and 2.5 mL of 20 mM
165 ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Finally, after warming at 37° C, 900 μ L of FRAP solution was mixed
166 with 30 μ L of cells suspended in acetate buffer (pH 3.6), polyphenol extracts or reference
167 compounds, and 90 μ L of H_2O . After 8 min at 37° C the lees were removed by filtration
168 through a 0.45 μ m pore size filter and the increase in absorbance at 593 nm was measured
169 against an acetate buffer blank. Calibration curves were made for each assay using Trolox as
170 the standard.

171 **Determination of thiol groups on lees surface**

172 Thiols on lees surface were determined in cell suspensions using an adapted version of the
173 DTDP method described by Egwim and Gruber (2001). The lees suspension (300 μ L) in acetate
174 buffer (pH 3.6, 0.3 M) was mixed with acetate buffer (pH 4.5, 0.1 N) containing EDTA 0.2 mM
175 to a final volume of 3 mL. Then, 125 μ L of DTDP (4 mM in 12 mM HCl) was added and after 5
176 min at room temperature the samples were filtered through a 0.45 μ m pore size filter. The
177 absorbance of the supernatant was measured at 324 nm. Calibration curves were calculated

178 analyzing glutathione in acetate buffer-EDTA (5-200 nmol/L), and the results were expressed
179 as nmol glutathione equivalents/million cells.

180 **Statistics**

181 The statistical data were obtained using R: A language and environment for statistical
182 computing (R Development Core Team (2008); R Foundation for Statistical Computing, Vienna,
183 Austria). Results were analyzed by simple and multi-factorial ANOVA and considered
184 significant at $p < 0.05$.

185 **Results and Discussion**

186 **Antioxidant activity of lees surface**

187 The methods used to determine the antioxidant capacity of lees surface (FRAP and DPPH
188 assays) can be applied at a pH value between 3.5 and 5.5, which is near to the pH value of
189 wine. Different pH values can modify the electrical charge and tertiary structure of
190 mannoproteins in cell surface, thus altering the properties of cell walls (Caridi, 2006;
191 Chassagne et al., 2005; Palomero et al., 2009). A FRAP assay measures the reducing capacity of
192 antioxidants, while a DPPH assay determines their radical scavenging activity (Ou et al., 2002;
193 Huang et al., 2005). These methods are usually applied to liquid samples and must be adapted
194 to analyze a solid discontinuous matrix. The filtration step immediately before the
195 spectrophotometric analysis allowed sample turbidity to be avoided (data not shown) without
196 modifying the accuracy of the measures, as observed analyzing standard solutions responses
197 before and after the filtration step (recovery >98%). The precision of the adapted methods
198 (applied to lees samples from *coupage* A, 2 months) was then evaluated by their relative
199 standard deviations (FRAP: RSD%=6.6, n=10; DPPH: RSD%=3.0, n=10). As a lees cell modifies its
200 weight and shape along the aging (Martínez-Rodríguez et al., 2001; Pitón et al., 1988), the
201 antioxidant activity due to active groups present on lees surface was expressed as antioxidant

202 activity (nmol Trolox equivalents) per number of cells (millions). This enabled cells with
203 different aging periods to be compared, while overcoming the errors that could be induced by
204 cell morphological changes.

205 The results of lees surface antioxidant activity obtained by two different methods and
206 expressed as nmol Trolox/million cells (Table 1) showed comparable values and a significant
207 linear correlation, (correlation coefficient $r=0.98$, $p<0.05$), indicating a high agreement
208 between them. The data reported in Table 1 indicate that both the wine *coupage* and aging
209 period significantly influenced the antioxidant activity of lees surface. In particular, cells from
210 *coupage* A wines showed higher antioxidant activities than those from *coupage* B. This could
211 be explained by the different compositional characteristics of lees surface, which depends on
212 the medium in which they are grown (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

213 Furthermore, lees surfaces seem to progressively lose their antioxidant activity of the longer
214 they are in contact with the wine (Table 1). This leads to the supposition that, subsequent to
215 oxidation and the loss of structural biomolecules, the effect of lower active group availability
216 prevails over higher accessibility due to weakening in the cell wall. Despite the differences in
217 the initial FRAP and DPPH values for lees from distinct *coupages*, the percent decrease in their
218 antioxidant activity under the same environmental conditions during aging was comparable
219 (Figure 1). These results suggest that under similar enological conditions, time is the main
220 factor in reducing the antioxidant capacity of lees surface's, regardless of wine characteristics.
221 Considering that antioxidant activity is proportional to the concentration of available
222 antioxidant groups on lees surface, this behavior could be explained by the fact that the
223 reaction rate is also proportional: the higher the concentration, the faster the antioxidant
224 consumption.

225 For an indicative comparison with other compounds or foodstuffs, the maximum antioxidant
226 activity observed for lees surface at the beginning of the aging process (two months of *sur lie*
227 aging) was estimated by fresh weight. This was based on the mean cell weight calculated from
228 Multisizer™ results (approximately 0.25 million cells/mg). The cell surface antioxidant
229 activities of lees from wine *coupages* A and B were 24.5 and 7.3 μmol Trolox/g cells (fresh
230 weight), respectively, measured by the DPPH assay, and 21.3 and 10.2 μmol Trolox/g cells
231 (fresh weight), respectively, determined by the FRAP assay. These results situate the initial
232 antioxidant activity of lees surface above several commonly consumed vegetables and fruits
233 (Stratil et al., 2006; 2007), and wine (Alén-Ruiz et al., 2009; Villano et al., 2006).

234 **Contribution of distinct biomolecules to the lees antioxidant effect.**

235 Proteins and glucans are considered the principal fractions responsible for yeast wall
236 antioxidant activity (Jaehrig et al., 2007; 2008). In particular, thiol groups from denatured
237 proteins could have an important role in the antioxidant effect of yeast cell wall (Jaehrig et al.,
238 2007) and the extent of their participation in lees surface antioxidant deserves further
239 analysis. With this aim, the amount of reactive thiol groups on lees surface was directly
240 determined, as proposed by Egwim and Gruber (2001) (Table 2). The amount of thiol groups
241 was higher in lees from *coupage* A wines, and decreased between 2 and 10 months. For longer
242 aging periods, the low thiol amounts showed high deviations and no differentiation between
243 samples.

244 In addition, wine polyphenols retained by lees (Mazauric and Salmon, 2005; Mazauric and
245 Salmon, 2006, Palomero et al., 2009; Wu et al., 2009) could contribute to the antioxidant
246 effect. A phenolic extraction from lees surface was performed according to Mazauric and
247 Salmon (2006). The total polyphenol content in the extracts was assessed using the Folin-

248 Ciocalteu reagent (FCR) reducing capacity method, and their potential contribution to lees
249 surface antioxidant activity was assessed using DPPH and FRAP assays (Table 2).

250 In order to estimate the effect of the above mentioned biomolecules on lees' antioxidant
251 activity, their percentage contribution to total antioxidant activity was calculated for both
252 FRAP and DPPH methods (Figure 2). Standard glutathione showed antioxidant activities of
253 0.034 and 3.25 Trolox equivalents when measured by the FRAP and DPPH assays, respectively.

254 According to the glutathione equivalents detected on lees surface, thiols accounted for a
255 mean $25\pm 11\%$ of the lees antioxidant activity detected by DPPH, but only $0.3\pm 0.1\%$ of the
256 activity measured by FRAP, regardless of wine *coupage*. Regarding adsorbed wine
257 polyphenols, their contribution was also irrespective of wine *coupage* and meanly accounted
258 for a mean $39\pm 8\%$ and $54\pm 7\%$ of lees surface antioxidant activity measured by FRAP and
259 DPPH, respectively (Figure 2). As the FRAP method depends entirely on the electron
260 transference mechanisms (Benzie and Strain, 1996), it cannot detect the effect of antioxidants
261 acting by hydrogen transfer; this includes proteins, thiols and some of the polyphenols usually
262 detected in wine (Ou and Huang, 2002). Conversely, DPPH radical quenching is believed to
263 occur by either electron or hydrogen transfer (Huang and Ou, 2005; Prior et al., 2005). This
264 method should, therefore, detect the effect of compounds acting by both mechanisms,
265 making it a suitable approach for lees surface antioxidant activity approximation.

266 Cell wall thiol groups and adsorbed polyphenols accounted for approximately 40% and 80% of
267 lees surface antioxidant activity assessed by FRAP and DPPH, respectively, and their
268 percentage contribution did not vary significantly with regard to the aging period. The
269 depletion of lees surface antioxidant activity during aging reflected in part the decrease in
270 these compounds. Other cell wall components account for approximately 60% and 20% of lees
271 surface antioxidant activity according to these assessment methods. Previous studies have

272 claimed that yeast polysaccharides are a powerful antioxidant cell wall fraction (Jaehrig et al.
273 2007, 2008). In particular, among antioxidants of polysaccharide origin, the (1->3)- β -D-linked
274 glucose polymers (Bobek et al., 1997; Xie et al., 2005) have been shown to exert free radical
275 scavenging properties (Patchen et al., 1987; Patchen and MacVittie, 1993). Yeast wall
276 mannans have also demonstrated antioxidant activity based on mechanisms of metal
277 complexation and free radical elimination (Križkova et al., 2001; Bučková, 2002). In *S.*
278 *cerevisiae* cells, mannan is located in the outer layer and is thus the most accessible
279 polysaccharide. Given the unsuitability of extracting cell wall mannan maintaining the integrity
280 of lees cells, commercially available mannan from *S. cerevisiae* was tested by FRAP and DPPH
281 methods, with the aim to hypothesize a maximum potential contribution of this
282 polysaccharide to cell surface antioxidant activity. The antioxidant activity of *S. cerevisiae*
283 mannan corresponded to 40.0 nmol Trolox equivalents/mg according to DPPH and 55.6 nmol
284 Trolox equivalents/mg according to FRAP. Considering the cell wall of *S. cerevisiae* accounts
285 for approx. 20 % of the cell's dry weight and consists of 20-50% of mannans (Kath and Kulicke,
286 1999), the theoretical contribution of the latter can be estimated on the basis of the lees' dry
287 weight (data not shown). Cell wall mannans account a maximum of 14% and 9% of lees
288 surface antioxidant activity according to FRAP and DPPH assays, respectively. On this basis, cell
289 wall components other than thiols, adsorbed polyphenols and mannans, and acting by
290 transferring electrons are responsible for a considerable percentage of the reducing activity
291 according to FRAP.

292

293 In conclusion, the surface of sparkling wine second fermentation lees showed a higher
294 antioxidant capacity than wine and several vegetables and fruits; this capacity progressively
295 decreased the longer the *sur lie* aging period. Base wine characteristics seem to influence the

296 lees surface antioxidant activity, in agreement with previous studies on the effect of growing
297 conditions on the cell wall structure. However, the aging period appears to be the main factor
298 in the reduction of lees surface antioxidant activity, possibly due to the structural modification
299 of cell wall and the oxidation of active groups. Cell wall thiols and adsorbed wine polyphenols
300 accounted for most of the total lees surface antioxidant activity detected by the DPPH
301 method, while FRAP results indicate that, in addition to adsorbed polyphenols and to a
302 hypothetical maximum contribution of cell wall mannans, a considerable part of the
303 antioxidant effect is due to other cell wall substances acting by electron transfer.

304

305 **Acknowledgement**

306 The authors are grateful to Freixenet S.A. wineries for providing samples. This study was made
307 possible thanks to financial assistance from the Comisión Interministerial de Ciencia y
308 Tecnología (CICYT) (Spain) AGL2008-03392/ALI, from the Generalitat de Catalunya (Spain),
309 Project 2009SGR606, from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) Juan de la Cierva
310 program, and Networking Centre on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-
311 BBN) through a contract to the PhD student Joan Gallardo-Chacón.

312

313 **References**

- 314 Alén-Ruiz, F., García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, M.C., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J.,
315 2009. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red
316 wines. *Food Chem.* 113, 53–60.
- 317 Benzie, I.F.F., Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of
318 "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76.
- 319 Bobek, P., Ozdin, L., Kuniak, L. 1997. Effect of oyster mushroom and isolated beta-glucan on
320 lipid peroxidation and on the activities of antioxidative enzymes in rats fed on cholesterol diet.
321 *J. Nutr. Biochem.* 8, 469–471.
- 322 BOE nº 50 february 2007. ORDEN APA/415/2007, de 23 de febrero, por la que se modifica el
323 Reglamento de la Denominación «Cava» y de su Consejo Regulador. 50, 8487-8491.
- 324 Bosch-Fusté, J., Sartini, E., Flores-Rubio, C., Caixach, J., López-Tamames, E., Buxaderas, S. 2009.
325 Viability of total phenol index value as quality marker of sparkling wines, "cavas". *Food Chem.*
326 114, 782–790.
- 327 Bučková, M., Labuda, J., Šandula, J., Křížková, L., Štěpánek, I., Ďuračková, Z. 2002. Detection of
328 damage to DNA and antioxidative activity of yeast polysaccharides at the DNA-modified
329 screen-printed electrode. *Talanta* 56, 939–947
- 330 Caridi, A. 2006. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie Van*
331 *Leeuwenhoek* 89, 417–422.
- 332 CEE Regulation 2676/90, October 3th 1990. D.O.C.E. Nº L272 de la Comisión del 17 de
333 septiembre por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el
334 sector de vino, Annex chap. 41, pp. 178-179.
- 335 Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., Voilley, A. 2005. Sorption of wine volatile
336 phenols by yeast lees. *Food Chem.* 91, 39–44.

337 Cullere, L., Cacho, J., Ferreira, V. 2007. An Assessment of the Role Played by Some Oxidation
338 Related Aldehydes in Wine Aroma. J. Agric. Food Chem. 55, 876–881.

339 Demasi, A.P.D., Pereira, G.A.G., Netto, L.E.S. 2001. Cytosolic thioredoxin peroxidase I is
340 essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. FEBS Lett. 509,
341 430 – 434.

342 Egwim, I.O.C., Gruber, H.J. 2001. Spectrophotometric measurement of mercaptans with 4,4'-
343 dithiodipyridine. Anal. Biochem. 288, 188–194.

344 Fornairon-Bonnefond, C., Camarasa, C., Moutounet, M., Salmon, J. M. 2002. New trends on
345 yeast autolysis and wine aging on lees: A bibliographic review. J. Int. des Sci. Vigne Vin 36, 49–
346 69.

347 Gemmill, T.R., Trimble, R.B. 1999. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures
348 found in various yeast species. Biochim. Biophys. Acta 1426, 227–237.

349 Hidalgo, P., Pueyo, E., Pozo-Bayón, M.A., Martínez-Rodríguez, A.J., Martín-Alvarez, P., Polo, M.
350 C. 2004. Sensory and analytical study of rose sparkling wines manufactured by second
351 fermentation in the bottle. J. Agric. Food Chem. 52, 6640–6645.

352 Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric.
353 Food Chem. 53, 1841–1856.

354 Jaehrig, S.C., Rohn, S., Kroh, L.W., Fleischer, L.G., Kurz, T. 2007. In vitro potential antioxidant
355 activity of (1→3),(1→6)-beta-D-glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae*
356 cell walls. J. Agric. Food Chem. 55, 4710–4716.

357 Jaehrig, S.C., Rohn, S., Kroh, L.W., Wildenauer, F.X., Lisdat, F., Fleischer, L.G., Kurz, T. 2008.
358 Antioxidative activity of (1→3),(1→6)-beta-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on
359 different media. Food Sci. Technol. 41, 868–877.

360 Kath, F., Kulicke, W.M. 1999. Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast
361 *Saccharomyces cerevisiae*. *Angew. Makromol. Chem.* 268, 59-68.

362 Křižková, L., Ďuracková, Z., Šandula, J., Sasinková, V., Krajčovič, J. 2001. Antioxidative and
363 Antimutagenic Activity of Yeast Cell Wall Mannans in Vitro. *Mutat. Res.* 497, 213–222.

364 Leroy, M.J., Charpentier, M., Duteurtre, B., Feuillat, M., Charpentier C. 1990. Yeast autolysis
365 during champagne aging. *Am. J. Enol. Vit.* 41, 21–28.

366 Lipke, P.N., Ovalle, R. 1998. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New
367 Challenges. *J. Bacteriol.* 180, 3735–3740.

368 López-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. 2002. Yeast-Induced Inhibition of (+)-
369 Catechin and (-)-Epicatechin Degradation in Model Solutions. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1631-
370 1635.

371 Martínez-Rodríguez, A.J., Carrascosa, A.V., Polo, M.C. 2001a. Release of nitrogen compounds
372 to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced
373 autolysis in a model wine system. *Int. J. Food Microbiol.* 68, 155–160.

374 Martínez-Rodríguez, A.J., Polo, M.C. 2000. Characterization of the nitrogen compounds
375 released during yeast autolysis in a model wine system. *J. Agric. Food. Chem.* 48, 1081–1085.

376 Martínez-Rodríguez, A.J., Polo, M.C., Carrascosa, A. V. 2001b. Structural and ultrastructural
377 changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *Int. J.*
378 *Food Microbiol.* 71, 45–51.

379 Mazauric, J.P., Salmon, J.M. 2005. Interactions between yeast lees and wine polyphenols
380 during simulation of wine aging: I. Analysis of remnant polyphenolic compounds in the
381 resulting wines. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5647–5653.

382 Mazaauric, J.P., Salmon, J.M. 2006. Interactions between yeast lees and wine polyphenols
383 during simulation of wine aging. II. Analysis of desorbed polyphenol compounds from yeast
384 lees. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3876–3881.

385 Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for
386 estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26, 211-219.

387 Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. 2005. Winemaking biochemistry and microbiology: current
388 knowledge and future trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 265–286.

389 Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. 2002. Analysis of
390 antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity
391 (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric.*
392 *Food Chem.* 50, 3122–3128.

393 Palomero, F., Morata, A., Benito, S., Calderón, F., Suárez-Lepe, J. A. 2009. New genera of
394 yeasts for over-lees aging of red wine. *Food Chem.* 112, 432–441.

395 Patchen, M.L., D’Alessandro, M.M., Brook, I., Blakely, W.F., MacVittie, T.J. 1987. Glucan:
396 mechanisms involved in its ‘radioprotective’ effect. *J. Leukocyte Biol.* 42, 95–105.

397 Patchen, M.L., MacVittie, T.J. 1983. Dose-dependent responses of murine pluripotent stem
398 cells and myeloid and erythroid progenitor cells following administration of the
399 immunomodulating agent glucan. *Immunopharmacol.* 5, 303–313.

400 Pérez-Serradilla, J.A., Luque de Castro, M.D. 2008. Role of lees in wine production: A review.
401 *Food Chem.* 111, 447–456.

402 Pinheiro, R., Belo, I., Mota, M. 2002. Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to
403 hydrogen peroxide, paraquat and pressure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 842–847.

404 Piton, F., Charpentier, M., Troton, D. 1988. Cell Wall and Lipid Changes in *Saccharomyces*
405 *cerevisiae* during Aging of Champagne Wine. *Am. J. Enol. Vit.* 39, 221–226.

406 Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of
407 antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53,
408 4290–4302.

409 Pueyo, E., Martínez-Rodríguez, A., Polo, M.C., Santa-María, G., Bartolomé, B. 2000. Release of
410 lipids during yeast autolysis in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.* 48, 116-122.

411 Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J.M., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. 2002.
412 Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeast and their
413 cell walls. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7432–7437.

414 Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. 2006. Cytology, Taxonomy and
415 Ecology of Grape and Wine Yeasts. In “Handbook of Enology, Microbiology of Wine and
416 Vinifications”, 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd: Chichester, West. Sussex (England), Vol. no.
417 1, pp. 1-53.

418 Salmon, J.M., Fornairon-Bonnefond, C., Mazauric, J.P., Moutounet, M. 2000. Oxygen
419 consumption by wine lees: impact on lees integrity during wine aging. *Food Chem.* 71, 519-
420 528.

421 Santiago, L.A., Mori, A. 1993. Antioxidant defenses of baker’s yeast against free radicals and
422 lipid peroxides in rat brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 306, 16–21.

423 Stratil, P., Klejdus, B., Kubán, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant
424 activity in fruits and cereals. *Talanta* 2007, 71, 1741–1751.

425 Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V. 2006. Determination of Total Content of Phenolic Compounds
426 and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. *J.*
427 *Agric. Food Chem.* 54, 607–616.

428 Suárez-Lepe J.A. *Levaduras Vínicas*. 1997. Funcionalidad y uso en bodega. Ediciones Mundi-
429 Prensa, Madrid, 190-197.

430 Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M. C. 2006. Influence of
431 enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chem.* 95, 394–404.

432 Xie, W., Xu, P., Liu, Q. 2001. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorg.*
433 *Medic. Chem. Lett.* 11, 1699–1701.

434 Wu, J-J., Lin, J-Ch., Wang, Ch-H., Jong, T-T., Yang, H-L., Hsu, Sh-L., Chang, Ch. J. 2009. Extraction
435 of antioxidative compounds from wine lees using supercritical fluids and associated
436 antityrosinase activity. *J. Supercritical Fluids* 50, 33–41.

437 Zoecklein, B.W. 2002. A Review of Methode Champenoise Production. Virginia Cooperative
438 Extension No. 463-017, 1-32.

439

440 **TABLES**

441 **Table 1.** Mean values of antioxidant activity determined by different methods in lees from
 442 two distinct wine *coupages* and at different periods of *sur lie* aging. Different letters indicate
 443 significant differences in function of the time of aging ($p < 0.05$). The significance of each factor
 444 (p -value) calculated by multivariate ANOVA, is also reported.

	<i>coupage</i>	Aging time (months)				MANOVA p -values		
		2	10	18	40	time	<i>coupage</i>	interaction
FRAP	A	8.52 _a	5.69 _b	2.78 _c	1.63 _c	<0.05	<0.05	<0.05
(nmol Trolox/million cells)	B	4.06 _a	2.61 _b	1.92 _b	0.48 _c			
DPPH	A	9.81 _a	7.51 _a	3.37 _b	1.77 _c	<0.05	<0.05	>0.05
(nmol Trolox/millioncells)	B	3.40 _a	2.57 _{ab}	1.85 _b	0.44 _c			

445

446

447 **Table 2.** Amounts cell wall thiols, amounts (FCR) and antioxidant activity (FRAP and DPPH) of
 448 polyphenols extracted from cell surface, determined in lees from two distinct wine *coupages*
 449 and at different periods of *sur lie* aging. Different letters indicate significant differences in
 450 function of the time of aging ($p < 0.05$). The significance of each factor (p -value) calculated by
 451 multivariate ANOVA, is also reported.

	<i>coupage</i>	Aging time (months)				MANOVA p -values		
		2	10	18	40	time	<i>coupage</i>	interaction
Thiol groups (nmol glutathione/million cells)	A	0.89 _a	0.47 _b	0.10 _b	0.23 _b	<0.05	<0.05	<0.05
	B	0.32 _a	0.12 _b	0.18 _{ab}	0.03 _b			
FCR (nmol Gallic acid/million cells)	A	8.06 _a	5.92 _b	3.73 _c	2.11 _d	<0.05	<0.05	<0.05
	B	3.49 _a	2.12 _b	2.07 _b	0.51 _c			
FRAP (nmol Trolox/million cells)	A	3.85 _a	1.76 _b	1.27 _{bc}	0.75 _c	<0.05	<0.05	<0.05
	B	1.68 _a	0.78 _b	0.90 _{bc}	0.13 _c			
DPPH (nmol Trolox/million cells)	A	5.68 _a	3.71 _b	2.08 _c	0.76 _d	<0.05	<0.05	<0.05
	B	1.76 _a	1.29 _{ab}	1.22 _b	0.23 _c			

452

453

454 **Figure legends**

455 **Figure 1.** Percent decrease of lees surface antioxidant activity along the *sur lie* aging,
456 determined by DPPH and FRAP assays on samples from distinct wine *coupages*. A, B: wine
457 *coupages*; a: FRAP assay; b: DPPH assay.

458 **Figure 2.** Percent contribution of distinct cell wall biomolecules to the lees surface antioxidant
459 activity, expressed as % nmol Trolox equivalents/million cells. A, B: wine *coupages*; a: FRAP
460 assay; b: DPPH assay.

Figure

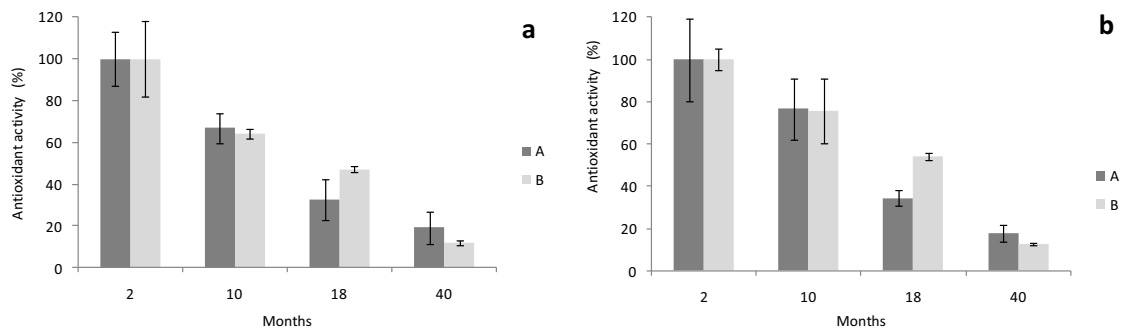


Figure 1

Figure

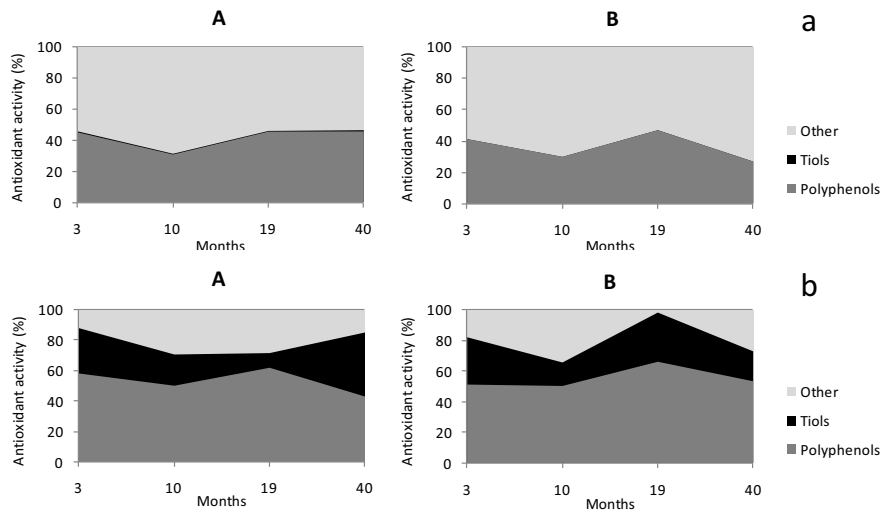


Figure 2

CAPÍTOL 6

Comentari dels resultats

S'ha deixat palès que les *lies* modifiquen les seves propietats fisicoquímiques al llarg de la rima a causa del procés autolític de les cèl·lules. Les propietats fisicoquímiques estudiades han estat: hidrofobicitat, capacitat electró-donador i electró-receptor i potencial ζ . El procés autolític no només modifica el contingut cel·lular, sinó també la ultraestructura de la paret; és per això que s'ha realitzat un estudi dels canvis morfològics de les cèl·lules de llevat durant un llarg període d'envelliment en rima. Per fer-ho s'ha seleccionat l'ús de la TEM de mostres fixades mitjançant HPF i substitució en fred, ja que, per les seves característiques, és la tècnica que millor manté la mostra en un estat similar al nadiu (apartat 4.2). La cèl·lula de llevat en contacte amb el cava modifica profundament la seva ultraestructura, de manera que es veuen afectats tots els orgànuls cel·lulars (apartat 5.1). A l'interior de la cèl·lula s'observa una progressiva desestructuració, amb la pèrdua dels orgànuls i el trencament de les membranes. Aquest canvis poden implicar l'alliberament de biomolècules típic de l'autòlisi al medi-vi (apartat 3.2), afectant-ne la seva composició i les seves característiques. D'altra banda, el llarg envelliment de *lies* en contacte amb el cava modifica la ultraestructura de la paret cel·lular, de manera que, amb el temps, es perd la distinció en capes de la paret i s'exposa l'entramat fibril·lar intern, presumiblement d'origen proteic (apartat 5.1.2). Els canvis observats a les cèl·lules durant la rima han permès plantejar estudis per veure com s'afecten les seves propietats fisicoquímiques, ja que aquestes guarden una estreta relació amb paràmetres rellevants com la conformació de l'aroma del cava.

La tècnica de SPME ha permès la caracterització eficient dels compostos volàtils adsorbits per la superfície de les *lies* de cava. Conèixer quines són les aromes que s'adsorbeixen a

les *lies* és de gran rellevància, perquè aquestes són remogudes durant la fase de degollat emportant-se una part de la fracció volàtil.

Les *lies* han mostrat la capacitat de retenir a la seva superfície volàtils dels vins on fan l'envelliment; entre aquests volàtils destaquen ésters, aldehids, norisoprenòids i terpens (apartat 5.2.2). A més, s'ha pogut observar la presència de volàtils de tipus norisoprenòid, mai descrits en caves, i que formen part dels compostos detectats a la superfície de les *lies*. El possible efecte de l'eliminació d'aquests compostos durant el degollat és un aspecte mereixedor de nous estudis. Finalment, tot i la seva abundància en els vins, els alcohols no tenen gran importància en la conformació del perfil cromatogràfic obtingut de les *lies* del cava.

Les *lies* poden contribuir en la protecció contra els processos de caire oxidatiu que afecten els vins modificant el seu color i generant-hi aromes no desitjades (apartat 3.4.1). Les tècniques de FRAP i DPPH s'han adaptat per al seu ús en la determinació de la capacitat antioxidant de les *lies* de cava per diversos mecanismes (apartat 5.2.3). Una primera conclusió que s'ha obtingut de l'anàlisi de *lies* amb diferents períodes de cria en rima ha estat que el temps disminuïa de manera sensible la seva capacitat reductora. Paral·lelament, s'han quantificat els grups tiols (pertanyents a les mannopteïnes de la superfície) i els polifenols (adsorbits per la paret cel·lular) i la seva participació en el poder antioxidant de les *lies*. Així s'ha pogut concloure que els polifenols participen en més d'un terç de la capacitat antioxidant, els tiols en aproximadament un quart i que la resta de l'efecte era atribuïble a les estructures d'origen glucídic. La pèrdua de l'estructura de la paret cel·lular podria estar relacionada amb la pèrdua de la capacitat de retenir polifenols i amb la disminució de grups actius, afectant-se així la seva capacitat com a antioxidant. Finalment, s'ha monitoritzat quins canvis se succeïen a les propietats superficials de les *lies* al llarg de la cria, s'ha intentat relacionar amb el seu efecte sobre la floculació i s'ha provat d'aproximar quins elements de la paret eren els responsables d'aquestes modificacions (apartat 5.2.1). Les cèl·lules de llevat s'han mostrat hidrofòbiques, disminuint aquest comportament al llarg de la rima. S'ha observat que existeix una

relació estreta entre la capacitat de floccular de les *lies* i els seus canvis a la hidrofobicitat. Atès que la superfície de la cèl·lula es desestructura al llarg del temps, sembla lògic pensar que això afecta als paràmetres que depenen de la seva composició. Aquesta teoria es veu refermada per l'efecte del temps sobre paràmetres altament lligats a la composició; junt amb la hidrofobicitat es veuen afectats la capacitat electró-donador i electró-receptor i el potencial ζ de les cèl·lules.

L'ús de l'anàlisi mitjançant TOF-SIMS ha permès elucidar quines biomolècules podrien ésser responsables de les alteracions de les característiques de la superfície, i s'ha observat que el ions que pertanyen a grups proteics estan altament relacionats amb les modificacions dels fenòmens superficials; les mannoproteïnes de la paret i la seva degradació serien els agents d'aquests canvis.

1. Les propietats fisicoquímiques de les *lies* estudiades -hidrofobicitat, capacitat electró-donador i electró-receptor i potencial ζ - varien amb el període de cria del cava. Els seus canvis es poden relacionar amb els canvis morfològics que pateixen les cèl·lules. A més, repercuteixen en les característiques organolèptiques del cava.
2. Les *lies* de segona fermentació de vins escumosos pateixen profunds canvis a la seva ultraestructura al llarg de la rima, els quals impliquen a tots els orgànuls cel·lulars. Es desestructura profundament el citoplasma, i desapareixen els orgànuls. La membrana plasmàtica es trenca, augmenta l'espai periplasmàtic i la paret perd progressivament la part amorfa de la seva estructura, relacionada amb el glucà, i exposa la capa fibril·lar interna, relacionada amb les mannopteïnes.
3. En les condicions en les que s'ha dut a terme aquest estudi, el tipus de vi no ha influït en la cinètica de degradació del llevat de segona fermentació.
4. Les *lies* en contacte amb el vi retenen compostos volàtils que participen a l'aroma del cava. La desestructuració de la paret cel·lular podria modificar els compostos volàtils retinguts així com aquells que es remouen durant el procés de degollament del cava.
5. Les *lies* de segona fermentació presenten una capacitat antioxidant similar a la de fruites i vegetals, segons els mètodes de FRAP i DPPH. Aquesta capacitat es redueix amb el temps de rima. Els polifenols retinguts semblen ésser els majors contribuïdors al poder reductor de les *lies*, seguits dels tiols. Altres substàncies que contribueixen a l'activitat antioxidant podrien ésser mannans i glucans.

6. La hidrofobicitat de les cèl·lules de llevats disminueix amb el temps de rima, i aquesta propietat està relacionada amb el seu caràcter electró-donador i amb l'increment de potencial ζ i del caràcter electró-receptor.
7. La davallada de la capacitat per flocular de les *lies* de segona fermentació sembla ésser deguda a les proteïnes de superfície i estar correlacionada amb la pèrdua de la hidrofobicitat. La pèrdua d'aquesta capacitat obliga a les bodegues d'elaboració de cava *Reserva* i *Gran Reserva* a utilitzar algun floculant, com la bentonita, per garantir la floculació de les *lies* i la seva separació del cava.

Bibliografía

- [1] H. Alexandre and M. Guilloux-Benatier. Yeast autolysis in sparkling wine - a review. *Aus J Grape Wine Res*, 12(2):119–127, 2006.
- [2] H. Alexandre, D. Heintz, D. Chassagne, M. Guilloux-Benatier, C. Charpentier, and M. Feuillat. Protease activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 26(4):235–240, 2001.
- [3] P. F. Amaral, M. Lehocky, A. M. V. Barros-Timmons, M. H. M. Rocha-Leão, M. A. Z. Coelho, and J. A. P. Coutinho. Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* imufrij 50682. *Yeast*, 23(12):867–877, 2006.
- [4] T. L. Babayan, M. G. Bezrukov, V. K. Latov, V. M. Belikov, E. M. Belavtseva, and E. F. Titova. Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: Morphological effects, rheological effects, and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. *Curr Microbiol*, 5(3):163–168, 1981.
- [5] R. Bautista, E. Fernández, and E. Falqué. Effect of the contact with fermentation-lees or commercial-lees on the volatile composition of white wines. *Eur Food Res Technol*, 224(4):405–413, 2007.
- [6] I. F. Benzie and J. J. Strain. The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of “antioxidant power”: the frap assay. *Anal Biochem*, 239(1):70–76, 1996.
- [7] B.O.E. Orden de 14.11.91, Reglamento de la Denominación «Cava» y de su Consejo Regulador. *B.O.E.*, 278:37587–37593, 1991.

- [8] B.O.E. Orden apa/415/2007, de 23 de febrero, por la que se modifica el Reglamento de la Denominación «Cava» y de su Consejo Regulador. *B.O.E.*, 50:8487–8491, 2007.
- [9] M. Bony, P. Barre, and B. Blondin. Distribution of the flocculation protein, flop, at the cell surface during yeast growth: the availability of flop determines the flocculation level. *Yeast*, 14(1):25–35, 1998.
- [10] J. Bosch-Fusté, E. Sartini, C. Flores-Rubio, J. Caixach, E. López-Tamames, and S. Buxaderas. Viability of total phenol index value as quality marker of sparkling wines, “cavas”. *Food Chem*, 114(3):782–790, 2009.
- [11] J. J. Bozzola and L. D. Rusell. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Jones & Bartlett Publishers, 1999.
- [12] J. E. Bueno, R. A. Peinado, M. Medina, and J. Moreno. Effect of a short contact time with lees on volatile composition of airen and macabeo wines. *Biotechnol Lett*, 28(13):1007–1011, 2006.
- [13] N. Cavazzani. *Fabricación de vinos espumosos*. Acribia, S.A, 1989.
- [14] C. Charpentier, J. Aussenac, M. Charpentier, J.-C. Prome, B. Duteurtre, and M. Feuillat. Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: kinetics and potential impact on flavor. *J Agric Food Chem*, 53(8):3000–3007, 2005.
- [15] D. Chassagne, M. Guilloux-Benatier, H. Alexandre, and A. Voilley. Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chem*, 91(1):39–44, 2005.
- [16] V. J. Cid, A. Durán, F. del Rey, M. P. Snyder, C. Nombela, and M. Sánchez. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, 59(3):345–386, 1995.
- [17] F. Claro, K. Rijsbrack, and E. Soares. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. *J Appl Microbiol*, 102(3):693–700, 2007.

- [18] A. P. D. Demasi, G. A. G. Pereira, and L. E. S. Netto. Cytosolic thioredoxin peroxidase i is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. *FEBS Let*, 509(3):430–434, 2001.
- [19] D.O.C. Consell Regulador Cava: Pàgina Oficial. web, <http://www.crcava.es/>.
- [20] I. O. Egwim and H. J. Gruber. Spectrophotometric measurement of mercaptans with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Biochem*, 288(2):188–194, 2001.
- [21] M. Feuillat and C. Charpentier. Autolysis of yeasts in champagne. *Am J Enol Vitic*, 33(1):6–13, 1982.
- [22] C. Fornairon, J. P. Mazauric, J. M. Salmon, and M. Moutounet. Observations on the oxygen consumption during maturation of wines on lees. *J Int Sci Vigne Vin*, 33(2):79–86, 1999.
- [23] R. Gandillon. *Naissance du Champagne: Dom Pierre Pérignon*. Hachette, 1968.
- [24] G. Giovani and I. Rosi. Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation. *Int J Food Microbiol*, 116(1):19–24, 2007.
- [25] T. Hernawan and G. Fleet. Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. *J Ind Microbiol*, 14(6):440–450, 1995.
- [26] P. Hidalgo, E. Pueyo, M. A. Pozo-Bayón, A. J. Martínez-Rodríguez, P. Martín-Alvarez, and M. C. Polo. Sensory and analytical study of rose sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle. *J Agric Food Chem*, 52(21):6640–6645, 2004.
- [27] M. Ibern-Gómez, C. Andrés-Lacueva, R. M. Lamuela-Raventós, S. Buxaderas, V. L. Singleton, and 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*, 51:1:29–36, 2000.

- [28] F. Z. Idrissi, H. Grötsch, I. M. Fernández-Golbano, C. Presciatto-Baschong, H. Riezman, and M. I. Geli. Distinct acto/myosin-i structures associate with endocytic profiles at the plasma membrane. *J Cell Biol*, 180(6):1219–1232, 2008.
- [29] S. C. Jaehrig, S. Rohn, L. W. Kroh, L.-G. Fleischer, and T. Kurz. In vitro potential antioxidant activity of (1–3),(1–6)-beta-d-glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J Agric Food Chem*, 55(12):4710–4716, 2007.
- [30] S. C. Jaehrig, S. Rohn, L. W. Kroh, F. X. Wildenauer, F. Lisdat, L.-G. Fleischer, and T. Kurz. Antioxidative activity of (1–3), (1–6)-[beta]-d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. *Food Sci. Technol.*, 41(5):868–877, 2008.
- [31] Y. L. Jin and R. A. Speers. Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Am Soc Brew Chem*, 58(3):108–116, 2000.
- [32] F. M. Klis. Cell wall assembly in yeast. *Yeast*, 10:851–869, 1994.
- [33] O. Kobayashi, N. Hayashi, R. Kuroki, and H. Sone. Region of flo1 proteins responsible for sugar recognition. *J Bacteriol*, 180(24):6503–6510, 1998.
- [34] M. Kopecká, H. J. Phaff, and G. H. Fleet. Demonstration of a fibrillar component in cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical nature. *J Cell Biol*, 62:66–76, 1974.
- [35] Y. Kotseridis and R. Baumes. Identification of impact odorants in bordeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine. *J Agric Food Chem*, 48(2):400–406, 2000.
- [36] M. J. Leroy, M. Charpentier, B. Duteurtre, M. Feuillat, and C. Charpentier. Yeast autolysis during champagne aging. *Am J Enol Vitic*, 41(1):21–28, 1990.
- [37] A. Lopez-Toledano, M. Mayen, J. Merida, and M. Medina. Yeasts used to delay browning in white wines. *Food Chem*, 97(3):498–504, 2006.

- [38] S. Lubbers, C. Charpentier, M. Feuillat, and A. Voilley. Influence of yeast walls on the behavior of aroma compounds in a model wine. *Am J Enol Vit*, 45:29–33, 1994.
- [39] A. J. Martínez-Rodríguez and M. C. Polo. Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *J Agric Food Chem*, 48(4):1081–1085, 2000.
- [40] A. J. Martínez-Rodríguez, M. C. Polo, and A. V. Carrascosa. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *Int J Food Microbiol*, 71(1):45–51, 2001.
- [41] J.-P. Mazauric and 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*, 53(14):5647–5653, 2005.
- [42] J. P. Mazauric and 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*, 54(11):3876–81, 2006.
- [43] M. Mercier-Bonin, K. Ouazzani, P. Schmitz, and S. Lorthois. Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system. *J Colloid Interface Sci*, 271(2):342–350, 2004.
- [44] P. Molyneux. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26:211–219, 2004.
- [45] V. Moreno-Arribas, E. Pueyo, F. J. Nieto, P. J. Martín-Álvarez, and M. C. Polo. Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chem*, 70(3):309 – 317, 2000.
- [46] Y. P. Nunez, A. V. Carrascosa, R. González, M. C. Polo, and 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*, 53(18):7232–7237, 2005.
- [47] M. Osumi, M. Konomi, T. Sugawara, T. Takagi, and M. Baba. High-pressure freezing is a powerful tool for visualization of *Schizosaccharomyces pombe* cells: ultra-low temperature and low-voltage scanning electron microscopy and immunoelectron microscopy. *J Electron Microscop*, 55(2):75–88, 2006.
- [48] M. Osumi, M. Sato, S. A. Ishijima, M. Konomi, T. Takagi, and H. Yaguchi. Dynamics of cell wall formation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal Genet Biol*, 24(1-2):178–206, 1998.
- [49] L. Perrot, M. Charpentier, C. Charpentier, M. Feuillat, and D. Chassagne. Yeast adapted to wine: nitrogen compounds released during induced autolysis in a model wine. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 29(3):134–139, 2002.
- [50] R. Pinheiro, I. Belo, and M. Mota. Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58(6):842–847, 2002.
- [51] F. Piton, M. Charpentier, and D. Troton. Cell wall and lipid changes in *Saccharomyces cerevisiae* during aging of champagne wine. *Am J Enol Vitic*, 39(3):221–226, 1988.
- [52] R. Pradelles, H. Alexandre, A. Ortiz-Julien, and D. Chassagne. Effects of yeast cell-wall characteristics on 4-ethylphenol sorption capacity in model wine. *J Agric Food Chem*, 56(24):11854–11861, 2008.
- [53] R. Pradelles, S. Vichi, H. Alexandre, and D. Chassagne. Influence of the drying processes of yeasts on their volatile phenol sorption capacity in model wine. *Int J Food Microbiol*, 135(2):152–157, 2009.

- [54] I. S. Pretorius. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8):675–729, 2000.
- [55] E. Pueyo, A. Martínez-Rodríguez, M. C. Polo, G. Santa-María, and B. Bartolomé. Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. *J Agric Food Chem*, 48(1):116–122, 2000.
- [56] J. Pérez-Serradilla and M. L. de Castro. Role of lees in wine production: A review. *Food Chem*, 111(2):447–456, 2008.
- [57] S. Razmkhab, A. Lopez-Toledano, J. M. Ortega, M. Mayen, J. Merida, and M. Medina. Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *J Agric Food Chem*, 50(25):7432–7437, 2002.
- [58] P. Ribereau-Gayon and D. D. D. B. *Handbook of Enology, Volume 1, 2nd Edition, The Microbiology of Wine and Vinifications*, volume 1. WileyBlackwell, West Sussex PO19 8SQ, England, 2 edition, 2005.
- [59] L. L. Ritcey. *Cell wall properties affecting brewing yeast flocculation*. PhD thesis, Technical University of Nova Scotia, 1997.
- [60] J.-M. Salmon, C. Fornairon-Bonnefond, J.-P. Mazauric, and M. Moutounet. Oxygen consumption by wine lees: impact on lees integrity during wine ageing. *Food Chem*, 71(4):519–528, 2000.
- [61] S. Sampermans, J. Mortier, and E. Soares. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. *J Appl Microbiol*, 98(2):525–531, 2005.
- [62] L. A. Santiago and A. Mori. Antioxidant defenses of baker’s yeast against free radicals and lipid peroxides in rat brain. *Arch. Biochem. Biophys.*, 306(1):16–21, 1993.
- [63] G. Smit, M. H. Straver, B. J. Lugtenberg, and J. W. Kijne. Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface

- hydrophobicity as a major determinant. *Appl Environ Microbiol*, 58(11):3709–3714, 1992.
- [64] R. L. Smith and A. D. Johnson. Turning genes off by *ssn6-tup1*: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci*, 25(7):325 – 330, 2000.
- [65] M. H. Straver, J. W. Kijne, and G. Smit. Cause and control of flocculation in yeast. *Trends Biotechnol*, 11(6):228–232, 1993.
- [66] M. H. Straver, G. Smit, and J. W. Kijne. Purification and partial characterization of a flocculin from brewer’s yeast. *Appl Environ Microbiol*, 60(8):2754–2758, 1994.
- [67] M. H. Straver, V. M. Traas, G. Smit, and J. W. Kijne. Isolation and partial purification of mannose-specific agglutinin from brewer’s yeast involved in flocculation. *Yeast*, 10(9):1183–1193, 1994.
- [68] M. H. Straver, P. C. vd Aar, G. Smit, and J. W. Kijne. Determinants of flocculence of brewer’s yeast during fermentation in wort. *Yeast*, 9(5):527–532, 1993.
- [69] D. Studer, W. Graber, A. Al-Amoudi, and P. Eggli. A new approach for cryofixation by high-pressure freezing. *J Microsc*, 203(3):285–294, 2001.
- [70] D. Studer, B. M. Humbel, and M. Chiquet. Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem Cell Biol*, 130(5):877–889, 2008.
- [71] J. A. Suárez-Lepe. *Levaduras Vínicas. Funcionalidad y uso en bodega*. Ediciones Mundi-Prensa, 1997.
- [72] D. Troton, M. Charpentier, B. Robillard, R. Calvayrac, and B. Duteurtre. Evolution of the lipid contents of champagne wine during the second fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Enol Vitic*, 40(3):175–182, 1989.

- [73] T. Unwin. *Wine and the vine. An Historical Geography of Viticulture and the Wine Trade*. Routledge, 1996.
- [74] K. J. Verstrepen, G. Derdelinckx, H. Verachtert, and F. R. Delvaux. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61(3):197–205, 2003.
- [75] R. Wright. Transmission electron microscopy of yeast. *Microsc Res Tech*, 51(6):496–510, 2000.
- [76] J. Zhao and G. H. Fleet. Degradation of DNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30(3):175–182, 2003.
- [77] J. Zhao and G. H. Fleet. Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* produces predominantly ribonucleotides. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32(9):415–423, 2005.
- [78] B. Zoecklein. A review of *Métode Champenoise* production. *Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia State University, and U.S. Department of Agriculture*, pages 1–28, 2002.