

---

## **Materials i mètodes**

---

*Índex - Materials i mètodes*

<b>1. Determinació de la qualitat de l'escuma</b> .....	113
1.1. El Mosalux .....	113
1.2. Anàlisi sensorial .....	116
<b>2. Determinació dels col·loides del vi</b> .....	118
2.1. Preparació de la mostra .....	119
2.2. Fraccionament i anàlisi per cromatografia líquida (FPLC) .....	119
2.2.1. Anàlisi d'exclusió molecular .....	120
2.2.2. Anàlisi d'intercanvi iònic .....	121
2.2.2.1. Intercanvi catiònic .....	121
2.2.2.2. Intercanvi aniònic .....	122
2.2.3. Cromatografia d'afinitat .....	122
2.3. Determinació de la proteïna total soluble .....	123
2.4. Electroforesi en gels de poliacrilamida .....	125
2.5. Electroforesi capil·lar .....	126
<b>3. Determinació d'àcids grassos i altres substàncies volàtils per CG</b> .....	129
<b>4. Clarificació del vi en rama</b> .....	130
<b>5. Tiratges experimentals</b> .....	133
<b>6. Autolisat de llevats en un medi sintètic</b> .....	136
<b>7. Obtenció de col·loides del vi, d'un autolisat de llevats i de les pells de raïm</b> .....	136
<b>8. Tractament estadístic de les dades</b> .....	137

## **1. Determinació de la qualitat de l'escuma**

Per a la determinació de la qualitat de l'escuma s'han utilitzat dos sistemes d'avaluació diferents. Per una banda, amb el Mosalux s'ha volgut realitzar una mesura objectiva dels diferents paràmetres escumants, de forma que factors externs com el vidre de les copes o la subjectivitat en l'apreciació d'aquestes qualitats per part dels degustadors no siguin un motiu de discordància en l'anàlisi dels resultats. D'altra banda, en certs casos s'ha cregut interessant obtenir l'opinió d'un grup d'experts en degustació per tal d'avaluar no només el comportament escumant real dins la copa, sinó també el conjunt de característiques organolèptiques del vi.

### **1.1. El Mosalux**

El Mosalux és un instrument que consta d'un mòdul de mesura connectat a un ordinador. L'element principal és una proveta de vidre de 40 mm de diàmetre i 430 mm d'alçada, que conté 100 ml del vi o líquid que es vol analitzar (han de ser mostres desgasificades). A la seva part inferior hi ha un vidre porós i un petit tub lateral que permet la injecció de CO<sub>2</sub>, a través del vidre anterior, en el sinus del líquid. A l'esquerra de la proveta s'hi troba una font emissora de llum infraroja, i a la dreta hi ha un receptor que emet un senyal de 0-10 V inversament proporcional a l'alçada de l'escuma. El flux de CO<sub>2</sub> es controla mitjançant un regulador. La injecció a una pressió i un flux prèviament fixats provoquen la formació d'escuma dins la proveta, l'alçada de la qual és mesurada pel sistema emissor-receptor d'infrarojos i traduïda en forma de gràfic d'alçades per l'ordinador.

Després de tot un conjunt de proves, les condicions de pressió i flux de gas que s'ajusten millor a les característiques de les mostres han estat les següents: pressió de treball de 2 bar i flux de CO<sub>2</sub> regulat de forma que el cabal sigui de 12,5 L/h. La duració de la injecció de gas ha estat de 11 min, un temps suficient com per a permetre la correcta estabilització de l'alçada estable de l'escuma.

El rentat de la proveta és un punt molt important ja que qualsevol impuresa o partícula que hagi quedat en el seu interior podrà afectar el comportament escumant. Per aquest motiu, entre cada anàlisi la proveta es renta varies vegades amb aigua corrent, després amb etanol al 33% i, finalment, amb aigua destil·lada (fins que desapareix completament l'olor a alcohol). Just abans de realitzar l'anàlisi de la mostra es fa un últim rentat amb un petit volum de la mateixa mostra, de forma que la superfície interior

de la proveta quedi perfectament impregnada del líquid. Abans de començar un nou experiment es fa un rentat amb mescla cròmica amb l'objectiu d'eliminar qualsevol impuresa que hagi pogut quedar retinguda en el vidre porós.

Sempre que no es digui el contrari, totes les mesures es fan, com a mínim, per triplicat. A més, cada dues mostres, o sigui, cada sis mesures, es fa l'anàlisi d'un vi patró per tal d'assegurar-nos que l'equip funciona correctament i que els possibles canvis de les condicions exteriors no alteren el valor de les mesures.

El resultat de les anàlisis són l'obtenció dels valors dels paràmetres escumants següents:

- Escumabilitat (HM), referent a l'alçada màxima (mm) aconseguida per l'escuma en injectar el CO<sub>2</sub>.
- Permanència de l'escuma (HS); es correspon amb l'alçada (mm) a la que s'estabilitza, mentre es manté la injecció de gas carbònic.
- Estabilitat de l'escuma (TS); és el temps (s) que tarda aquesta en desaparèixer, una vegada aturat el flux de CO<sub>2</sub>

En el moment en que es para la injecció de gas, sol haver-hi una disminució ràpida de l'alçada de l'escuma, que normalment va seguida d'una altra etapa, molt més llarga, en la que han de desaparèixer altres bombolles. Aquestes poden formar part d'una corona originada a la cara interna de la proveta (en contacte amb el vidre), d'una monocapa o, simplement, de les últimes bombolles residuals. En aquest sentit, s'ha pogut constatar que el sistema de detecció del Mosalux no és prou fi, i els valors proporcionats per a TS poden ser extraordinàriament desproporcionats, fins i tot en les repeticions d'una mateixa mostra. Aquesta observació ha estat confirmada per altres investigadors (comunicació personal), i a causa d'això s'ha decidit prescindir dels valors d'estabilitat de l'escuma. De fet, els valors de HS són ja un indicador de la capacitat per a produir una escuma estable.

#### *Obtenció del vi d'escuma*

El vi d'escuma és el que s'obté a partir de l'escuma recollida després de ser provocada de forma artificial per injecció i borbolleig de gas carbònic al vi. D'aquesta manera poden distingir-se dues fraccions: el vi remanent i el vi d'escuma.

El propi disseny del Mosalux fa que resulti ideal per a realitzar la injecció controlada de CO<sub>2</sub>; per aquest motiu ha estat utilitzat, en condicions de no mesura, per a l'obtenció del vi d'escuma. Les condicions de pressió i flux de gas s'han ajustat de manera que es provoqui la formació d'una escuma abundant, sense que el valor d'un i altre paràmetres siguin importants per a la finalitat desitjada. S'ha utilitzat una proveta de les mateixes característiques que la usada en les anàlisis però de menor alçada per a facilitar l'aspiració de l'escuma. Aquesta aspiració s'ha fet amb una bomba de buit connectada a la part superior d'un matràs erlenmeyer tapat i des d'on surt un altre tub flexible amb el qual s'aspira l'escuma. Així, el matràs actua com a trampa de buit on queda atrapat el vi originat per l'escuma aspirada.

Es posen 100 ml de vi a la proveta. L'aspiració es fa al 50%, és a dir, de forma que el volum remanent de vi a la proveta sigui de 50 ml. Amb vàries extraccions successives es pot arribar a tenir el volum necessari de vi d'escuma i de fracció remanent per a poder realitzar les diferents mesures i anàlisis.

A la figura 19 es mostra de forma esquemàtica el fraccionament per a l'obtenció del vi d'escuma:

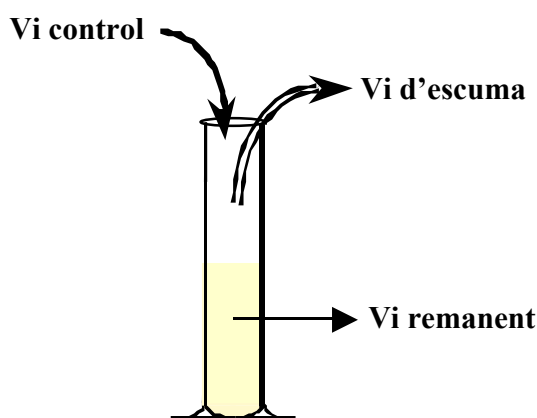


Figura 19 - Fraccions de vi d'escuma i remanent, a partir d'un vi inicial

### 1.2. Anàlisi sensorial

Per a l'avaluació sensorial de les propietats escumants i del conjunt de característiques organolèptiques d'un vi s'ha elaborat una fitxa de tast en la que, gràcies a la col·laboració desinteressada d'un grup d'experts coneixedors dels vins escumosos, s'ha qualificat, segons criteri de cada un d'ells, tot un conjunt de característiques.

Les sessions de tast s'han realitzat a la sala de la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili destinada a tal efecte. Cada un dels degustadors ha hagut d'avaluar de forma independent el vi, podent fer ús de les diferents condicions d'il·luminació posades a la seva disposició per a facilitar l'examen visual. Les puntuacions s'han fet de 0 a 5, corresponent-se els valors més alts amb una major apreciació de la característica avaluada.

Els diferents paràmetres que s'han tingut en compte són:

- Examen visual: qualitat de l'escuma en funció de la formació d'un collar de bombolles, qualitat de l'efervescència d'aquestes bombolles i intensitat de la coloració del vi.
- Examen olfatiu: descriptors, intensitat i qualitat dels aromes.
- Examen gustatiu: cos, amargor i agressivitat del CO<sub>2</sub>.
- Aromes en boca: descriptors i qualitat.
- Valoració de la qualitat global del cava

Per tal de facilitar la descripció i tenir una major uniformitat en els resultats s'han suggerit alguns descriptors; aquests són, la majoria, bastant genèrics: floral, fruita, balsàmic, animal, vegetal, làctic, SO<sub>2</sub>, cafè, mel, oxidat, llevat, brut, picat...

Els tasts s'han realitzat amb els vins escumosos procedents dels dos tiratges experimentals: un als 23 mesos de conservació en el tiratge fet l'any 1999, i l'altre als 9 mesos de contacte amb els llevats en el cas del tiratge fet l'any 2000.

A la pàgina següent es pot veure un model de fitxa de tast.

*Model de fitxa de tast*

	mostra 1	mostra 2	mostra 3
Examen visual			
Corona			
Efervescència			
Intensitat colorant			
Examen Olfactiu			
Intensitat global			
Qualitat dels aromes			
Descriptors i intensitat			
descriptor 1			
descriptor 2			
descriptor 3			
descriptor 4			
Examen gustatiu			
Cos			
Amargor			
Agresivitat CO <sub>2</sub>			
Qualitat aromes en boca			
Descriptors i intensitat			
descriptor 1			
descriptor 2			
descriptor 3			
descriptor 4			
Qualitat global			

Suggerències per als descriptors:

floral, fruita, balsàmic, animal, vegetal, làctic, SO<sub>2</sub>, cafè, mel, oxidat, llevat, brut, picat.

## 2. Determinació dels col·loides del vi

Per a la determinació i caracterització dels diferents col·loides estudiats s'ha utilitzat una tècnica o una altra amb l'objectiu de conèixer millor els distints compostos trobats. La cromatografia líquida de proteïnes (FPLC), en les seves diferents modalitats, ha estat de gran utilitat i és la base d'aquest treball. Altres tècniques com l'electroforesi en gels de poliacrilamida i l'electroforesi capil·lar han servit per a complementar alguns dels resultats trobats o per aprofundir en certs aspectes que hem cregut eren importants.

A la figura 20 es mostra de forma esquemàtica el procediment general seguit per a la determinació i quantificació dels col·loides del vi.

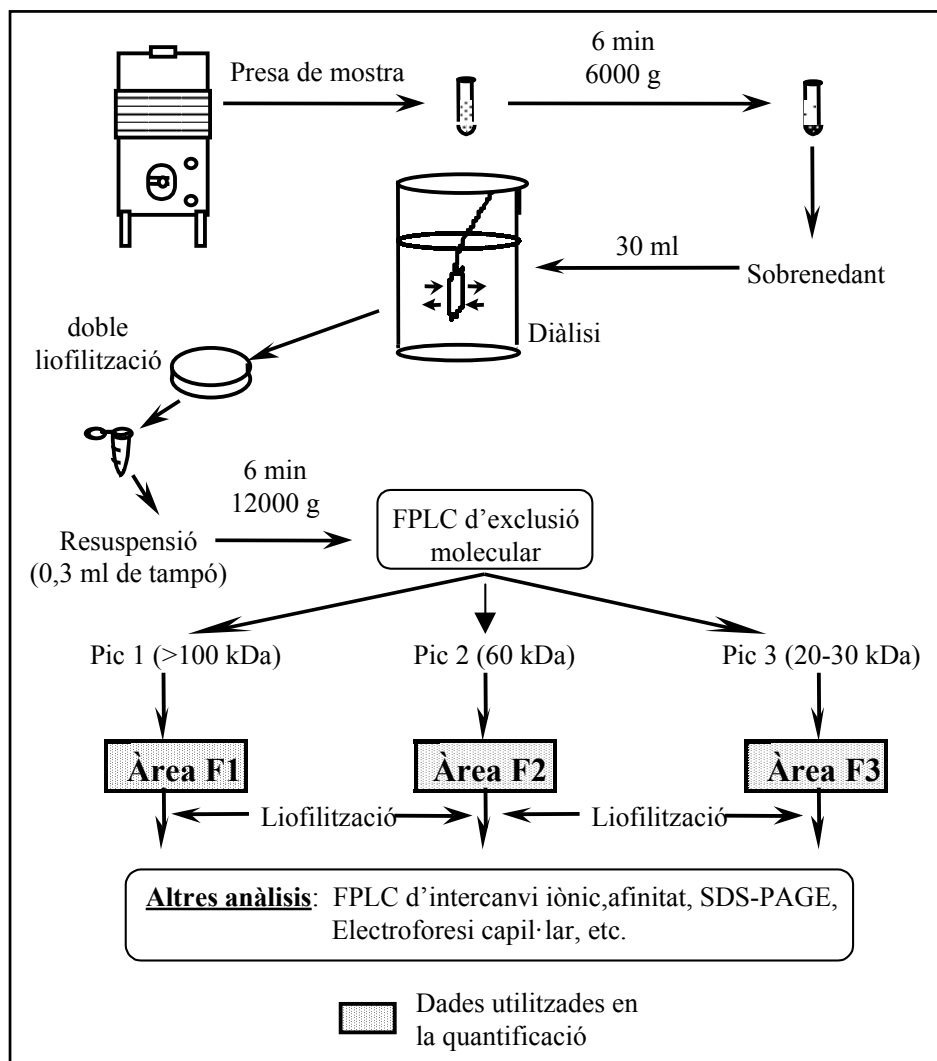


Figura 20 - Esquema general de preparació i tractament de les mostres per a la determinació dels col·loides del vi



### 2.1. Preparació de la mostra

El tractament de la mostra ha estat el mateix tant si es treballa amb most, vi tranquil, vi escumós o el líquid procedent de la fermentació d'un most sintètic.

La mostra se centrifuga (Sorvall, rotor alta capacitat GSA) a 6000g, durant 6 min, a una temperatura de 4°C. S'omplen tres sacs de diàlisi amb 30 ml del sobrenedant i se sotmeten a diàlisi (72 h, 4°C) front a aigua desionitzada, que es va renovant regularment. Per a la diàlisi s'utilitzen sacs de membrana de cel·lulosa (Sigma) amb un tall de pes molecular de 12 kDa. Un vegada dialitzada, la mostra es buida en una placa petri i es liofilitza (Christ-Alpha 1-4, Bräun Biotech). Per poder treballar més comodament, es resuspèn el liofilitzat en 1,5 ml d'aigua destil·lada, es posa en eppendorfs i es torna a liofilitzar. Les mostres es guarden a -20°C fins el moment d'utilitzar-les. En les anàlisis per cromatografia líquida, hi ha una nova resuspensió de la mostra en el tampó transportador que s'utilitzarà en la FPLC, se centrifuga a 12000g durant 6 min i es treballa amb el sobrenedant.

La diàlisi és un procés de separació de la mostra amb finalitat sobretot preparativa. L'objectiu és evitar les interferències de les substàncies de baix pes molecular (etanol, sucres, glicerol, pèptids i aminoàcids, certs polifenols i polisacàrids, etc). Presenta l'avantatge de poder seleccionar el tamany molecular mínim de les substàncies retingudes, en funció del tamany de porus escollit per a la membrana. Es dóna sempre una dilució de la mostra (la diàlisi es fa front a un altre tampó), pel que caldrà recórrer després a sistemes de concentració. En alguns casos és possible treballar amb la mostra sense concentrar, però cal tenir en compte quin ha estat el factor de dilució (pes dels sacs abans i després de la diàlisi).

### 2.2. Fraccionament i anàlisi per cromatografia líquida (FPLC)

La separació de proteïnes per cromatografia líquida s'ha fet amb un equip Smart System equipat amb un detector  $\mu$ -peak (Pharmacia Biotech). Consisteix en dues bombes (de pressió màxima 2,5 MPa) que permeten treballar en modus isocràtic o en gradient, una cambra de barreja, un injector automàtic de volum variable, un suport mòbil per a la columna, una cel·la de detecció, un conductímetre i un col·lector de fraccions. Està dotat d'un sistema de control de temperatura que permet treballar a qualsevol temperatura compresa entre 4°C i la temperatura ambient. En el nostre cas s'ha escollit una temperatura de separació de 20°C. El detector és per a UV-visible, amb

un rang de longituds d'ona que va de 190 a 600 nm, i està connectat a la cel·la de mesura mitjançant un cable de fibra òptica. Poden llegir-se tres longituds d'ona a la vegada. Les dades es recullen en un ordinador, juntament amb els valors de conductivitat, temperatura, pressió de treball i flux de cada bomba. Les longituds d'ona que s'han seleccionat han estat 280 i 230 nm, corresponents a l'anell aromàtic i a l'enllaç peptídic, respectivament (Somers *et Ziemelis*, 1973).

### 2.2.1. Anàlisi d'exclusió molecular

Les molècules se separen en diferents fraccions, en funció del seu pes molecular, sobre un gel format per una matriu de dextrà i un entrecreuament d'agarosa al 12%. El perfil d'elució s'obté mitjançant el seguiment continu de la densitat òptica a 280 nm.

S'ha treballat amb una columna Superdex 75 PC 3.2/30, de 2,4 ml de volum total, empaquetada amb Superdex 75; el diàmetre de partícula és de 13 µm aproximadament, amb un volum d'exclusió de 100 kDa i un rang òptim de separació entre 3 i 70 kDa. La columna permet treballar a un flux de 100 µl/min, sempre que no se superi la pressió màxima de 2,4 MPa.

El tampó utilitzat ha estat acetat d'amoni 0,3 M, filtrat per 0,22 µm i desgasificat. Les mostres liofilitzades es resuspenen en 0,6 ml de tampó (concentració 50x). El llaç d'injecció és de 50 µl de capacitat, i el flux d'elució és de 40 µl/min. Les diferents fraccions s'han recollit en tubs per a permetre, si escau, la seva posterior liofilització i separació per intercanvi iònic o electroforesi.

El calibrat de la columna s'ha realitzat per triplicat amb proteïnes de massa molecular coneguda: ribonucleasa A (13,7 kDa), quimotripsinògen A (25 kDa), ovoalbúmina (43 kDa) i seroalbúmina bovina (67 kDa). La relació entre el logaritme de la massa molecular i el volum d'elució és lineal, ajustant-se pel mètode de mínims quadrats. El volum d'exclusió es determina amb blau dextrà (massa molecular més gran de 2000 kDa)

Les condicions del fraccionament han estat les següents:

- Columna Superdex 75 PC 3.2/30 de 3,2 mm x 300 mm (Pharmacia)
- Tampó portador: acetat amònic 0,3 M
- Flux: 40 µl/min
- Volum màxim de les fraccions col·lectades: 0.52 ml

### 2.2.2. Anàlisi d'intercanvi iònic

La separació i el fraccionament de les molècules es fa en funció de la seva càrrega elèctrica.

Les mostres corresponen a les diferents fraccions obtingudes per exclusió molecular i han estat resuspeses, prèvia liofilització, en el tampó inicial. El llaç d'injecció és de 100 µl de capacitat. La columna s'equilibra amb 0,5 ml d'aquest mateix tampó inicial (100 µl/min) i, a l'injectar la mostra, es baixa el flux a 10 µl/min per assegurar l'adhesió de tota la proteïna a la columna. Una vegada injectada completament es passa a un flux constant de 50 µl/min fins al final de la separació. Aquesta es monitoritza a 230 nm ja que la sensibilitat és major que a 280 nm (longitud d'ona utilitzada en la separació per exclusió molecular). Els pics detectats es corresponen amb diferents fraccions que novament són col·lectades en tubs.

#### 2.2.2.1. Intercanvi catiónic

La matriu de la columna està formada per un gel que presenta grups sulfonat ( $-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ ) que actuen com a intercanviadors forts de cations. Es troba fixat en forma de perletes a sobre d'un polímer hidròfil. Totes les molècules que presentin una càrrega neta positiva al pH 2,0 de treball, com ara les proteïnes, seran retingudes pel gel. L'elució s'efectua augmentant la força iònica del tampó, en forma d'un gradient salí continu de tres rampes. El perfil proteic s'obté per mesura de la densitat òptica a 230nm.

Les condicions de fraccionament han estat les següents:

- Columna Pharmacia MonoQ PC 1.6/5 (1,6mm x 50mm)
- Tampó inicial: àcid acètic 50 mM portat a pH 2,0 amb HCl al 10%
- Tampó d'elució: NaCl 1 M en el tampó d'àcid acètic 50 mM, pH 2,0
- Flux: 50 µl/min.

<b>Volum (ml)</b>	<b>Funció</b>
0-0,5	Equilibrat
0,5-1	Injectar mostra
1-1,5	Gradient 0 a 5%
1,5-3,3	Gradient 5 a 30%
3,3-4	Gradient 30 a 100%
4-4,3	Neteja de la columna
4,3-4,8	Equilibrat

Taula 5 - Programa de separació per intercanvi catiónic

### 2.2.2.2. Intercanvi aniònic

La matriu de la columna està formada per un gel que presenta grups carregats positivament, en forma d'una etilamina quaternària ( $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ) que actua com a intercanviadora forta d'anions. El gel està format per perletes fixades a sobre d'un polímer hidròfil. Les molècules que presentin una càrrega neta negativa al pH 8,0 de treball seran retingudes. La seva elució es fa per augment de la força iònica del tampó mitjançant un gradient salí continu de cinc rampes. El perfil proteic s'obté per seguiment de la densitat òptica a 230 nm.

Les condicions de fraccionament són les següents:

- Columna Pharmacia Mono Q PC 1.6/5 (1,6 mm x 50 mm)
- Tampó inicial: tampó Tris HCl 20 mM portat a pH 8,0 amb NaOH concentrat
- Tampó d'elució: NaCl 1 M en el tampó Tris HCl 20 mM pH 8,0
- Flux: 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

<b>Volum (ml)</b>	<b>Funció</b>
0-0,5	Equilibrat
0,5-1	Injectar mostra
1-1,5	Gradient 0 a 5%
1,5-2,5	Gradient 5 a 10%
2,5-3,5	Gradient 10 a 30%
3,5-4,5	Gradient 30 a 45%
4,5-4,9	Separació, 100% Neteja de la columna
4,9-5,4	Equilibrat

Taula 6 - Programa de separació per intercanvi aniònic

### 2.2.3. Cromatografia d'afinitat

Com a lligand específic s'ha utilitzat una lectina, la concanavalina A (Con A), fixada sobre una matriu Sepharose NHS-activada d'alta resolució. La concentració de lectina és de 12-18 mg per ml de gel. L'elució de les molècules retingudes s'efectua mitjançant l'ús d'altres molècules que competeixin pels punts d'enllaç. En el nostre cas s'ha utilitzat el  $\alpha$ -D-metilmanòsid. El seguiment del perfil proteic es fa per mesura de la densitat òptica a 230 nm.

Les condicions de fraccionament han estat:

- Columna Pharmacia Hi Trap Con A (0,7 x 2,5 cm)

- Volum de gel: 1 ml
- Tampó inicial: Tris HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; MnCl<sub>2</sub> 1 mM.
- Tampó d'elució:  $\alpha$ -D-metilmanòsid 0,5 M; Tris HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M
- Flux: 1 ml/min
- Regeneració de la columna: NaOH 2 M
- Volum de les fraccions: 0,5 ml

Volum (ml)	Funció
0-3	Equilibrat
3-3,3	Preparació de la injecció
3,3-3,9	Injecció
3,9-7	Elució molècules no lligades Tampó d'elució 0%
7-12	Elució molècules lligades Tampó d'elució 100%
	Regeneració de la columna (10 volums NaOH 2 M)

Taula 7 - Programa de separació per cromatografia d'afinitat

### 2.3. Determinació de la proteïna total soluble

La determinació de la concentració de proteïna s'ha fet a partir del perfil que s'obté en l'anàlisi d'un vi per cromatografia líquida (FPLC) d'exclusió molecular amb detecció a 280 nm. S'ha escollit aquest sistema per dues raons principals. D'una banda, pel fet que la diversitat de mètodes que existeixen actualment per a quantificar les proteïnes en mostos i vins vé donada, sobretot, a causa dels problemes d'interferència d'altres substàncies presents en la matriu. D'altra banda, s'ha volgut aprofitar també el fet que per a caracteritzar el vi, la cromatografia líquida d'exclusió molecular ha estat utilitzada en la majoria d'experiments d'aquest treball (en alguns casos únicament com a tècnica preparativa) i que, segons els resultats trobats per Canals (1997), proporciona una informació de gran valor referent a la composició proteica del vi.

Aquest autor comprova, en el seu treball, que de les quatre fraccions obtingudes en l'anàlisi per FPLC d'exclusió molecular de diferents vins, prèvia diàlisi per a eliminar la interferència de les substàncies de baixa massa molecular, la segona i la tercera fracció corresponen a proteïnes de massa molecular al voltant de 60 kDa i entre 20 i 30 kDa, respectivament. La quarta fracció, en canvi, no està formada per proteïna. En quant a la primera fracció, la d'alta massa molecular, observa que conté una part polisacàrida important. No obstant, el fet que en la separació per SDS-PAGE doni lloc a

una banda d'intensitat molt dèbil, juntament amb alguns dels resultats obtinguts en el present treball, ens fa pensar que es pugui estar formada per glicoproteïnes i/o polisacàrids procedents de la paret dels llevats. Es tractaria, bàsicament, d'una barreja de manoproteïnes i glucans, els principals constituents d'aquesta paret (Charpentier *et Feuillat*, 1993; Waters *et al.*, 1994; ).

Per aquests motius, s'ha considerat que la suma de les àrees corresponents a aquestes tres primeres fraccions (anomenades F1, F2 i F3, respectivament) i la seva quantificació (expressada en mg/L BSA) es correspon amb la determinació de la concentració de proteïna en vins. Si més no, la magnitud dels valors trobats és del mateix ordre que la dels obtinguts per altres mètodes de determinació. A més, amb la diàlisi s'eliminen les interferències provocades per les substàncies de baixa massa molecular, com ara pèptids i aminoàcids. Pel que fa als compostos fenòlics, i a causa d'interaccions inespecífiques amb la columna, la seva elució podria veure's retrassada d'acord amb la separació per tamany molecular; en qualsevol cas, però, es trobarien en fraccions posteriors al pic 3. Així, doncs, tot i que aquest sistema de determinació de la concentració proteica en vins és més laboriós, els valors que proporciona poden considerar-se tan vàlids o més que els obtinguts per altres mètodes.

L'elecció de les concentracions de BSA per a la construcció de la corba de calibrat s'ha fet tenint en compte que les mostres de les quals en volem conèixer la concentració per mesura de l'absorció a 280 nm per FPLC d'exclusió molecular estan concentrades un factor de 50, i els valors trobats en la integració de les seves àrees ha de poder interpolar-se entre els valors obtinguts pel BSA. El resultat per a la corba de calibrat és el següent:

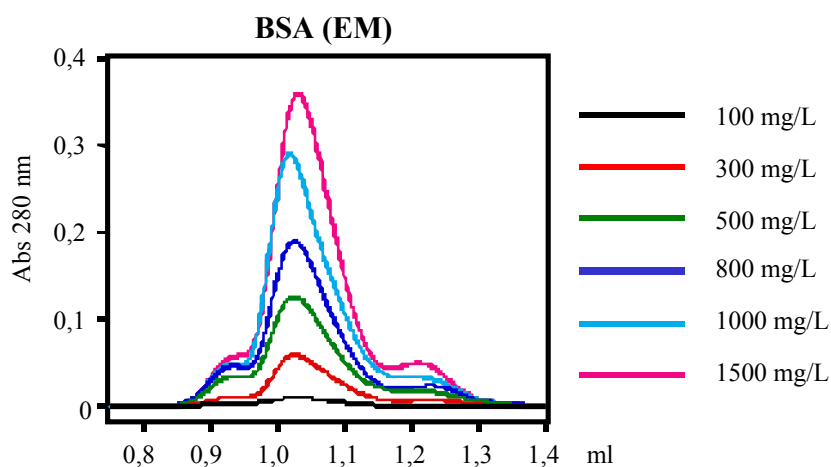
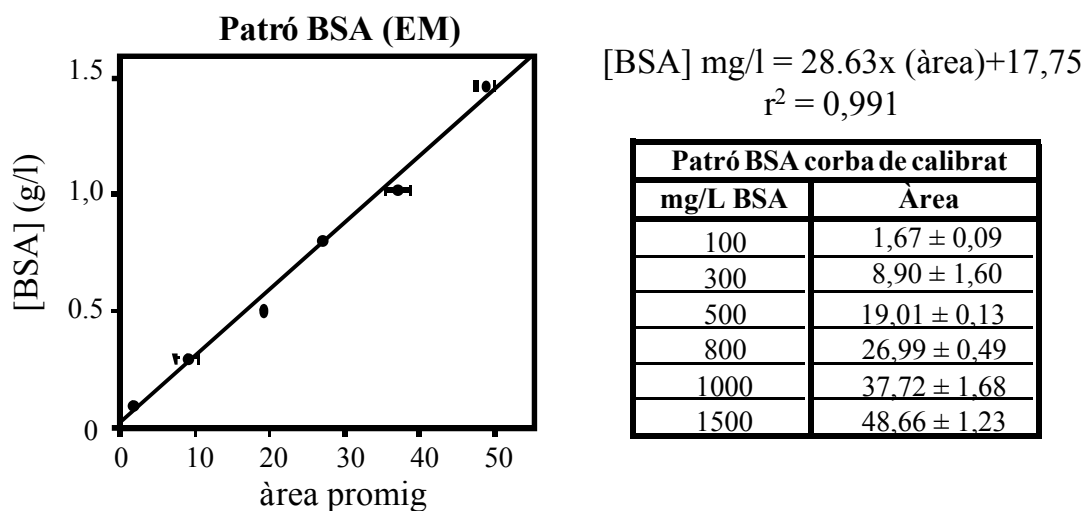


Figura 21 - Cromatograma d'exclusió molecular obtingut per a diferents concentracions de BSA (superposició)



Taula 8 - Determinació de l'ajust lineal per a la relació entre l'àrea mesurada en els cromatogrames d'exclusió molecular (EM) i la concentració de BSA, expressada en mg/L.

#### 2.4. Electroforesi en gels de poliacrilamida

L'electroforesi en gels de poliacrilamida s'ha realitzat en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE). L'equip i les plaques utilitzades (Biorad) estan formades per un gradient 4-15% Tris-HCl. S'han fet dos tipus de tinció: amb blau brillant de Coomassie (BBC) i amb el reactiu de Schiff, específic per a les glicoproteïnes.

S'han analitzat mostres de vi i de les seves tres fraccions separades per FPLC d'exclusió molecular. Una vegada liofilitzades s'han resuspès en un tampó que conté 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% glicerol i 0,002% de blau de bromofenol. A continuació es bullen durant 5 minuts. Amb les mostres es fa córrer un patró de substàncies de massa molecular coneguda format per:  $\square$ -lactoalbúmina (14,4 kDa), liozima (20,5 kDa), anhidrasa carbònica (33,9 kDa), ovoalbúmina (43,2 kDa), albúmina bovina (67,0 kDa) i fosforilasa b (94,2 kDa). Les condicions de separació han estat de 15 °C, amb una intensitat de corrent de 14 mA al començament, augmentada a 44 mA passats 5 min. La duració de la separació s'ha fet en funció de l'arribada del front de migració al final del gel i ha estat d'uns 45 min aproximadament.

La tinció amb blau brillant de Coomassie (BBC) s'ha fet seguint els següents passos: tinció amb una solució de BBC al 0,1% en metanol (25%), àcid acètic (10%) i aigua (65%), un mínim de quatre hores. Rentat amb una solució de metanol (40%) i àcid acètic (10%) en aigua destil·lada. Fixació amb una solució d'àcid acètic al 10%.

Per a la detecció de les glicoproteïnes s'ha usat el Glycoprotein Detection Kit de Sigma. La seqüència seguida ha estat la següent:

<b>temps</b>	<b>Procediment</b>
60 min	Tampó de fixació (etanol 50%)
20 + 20 min	Dos rentats amb aigua destil·lada
60 min	Tampó d'oxidació (àcid periòdic)*
20 + 20 min	Dos rentats amb aigua destil·lada
Fins aparició de bandes de color rosat	Tinció amb el reactiu de Schiff i Fuchsin-Sulfite*
120 min	Tampó de reducció (metabisulfid de sodi)*
Fins intensificació de les bandes	Varis rentats amb aigua destil·lada
Tota la nit	Tampó de conservació (acid acètic glacial al 5%)

\* Subministrat amb el kit

## **2.5. Electroforesi capil·lar**

L'equip d'electroforesi capil·lar utilitzat ha estat el P/ACE<sup>TM</sup> MDQ de Beckman (Beckman, 1997). El capil·lar es troba dins un cartutx amb control de temperatura, i connecta els distints vials que contenen les mostres, les solucions d'electròlit o les de regeneració del capil·lar. Els vials estan situats en unes safates de capacitat múltiple que es poden moure en totes direccions de tal manera que sota els extrems del capil·lar s'hi trobi sempre el vial amb el contingut adient segons el cas. Els extrems del capil·lar han de quedar immersos dins els diferents líquids continguts en els vials. Al costat de l'extrem de capil·lar submergit en el vial d'entrada es troba immers també un electrode capaç de proporcionar un voltatge variable de -30 a +30 kV, mentre que al costat de capil·lar submergit en el vial de sortida hi ha l'elèctrode amb descàrrega a terra. El software subministrat amb l'equip permet programar tota una gama de voltatges per a realitzar la separació. Quan el voltatge és positiu es diu que és treballa amb polaritat normal, i si és negatiu, amb polaritat invertida.

La mostra pot injectar-se en el capil·lar per pressió, buit o per aplicació d'un voltatge (injecció selectiva). Durant la separació, el voltatge aplicat fa que els components de la mostra migrin dins del capil·lar, amb diferent velocitat en funció de les característiques de cada un, de manera que quan arriben al detector (situat a prop de l'extrem de sortida del capil·lar) són detectats en forma de distints pics a l'electroferograma resultant.



Poden seleccionar-se diferents longituds d'ona en el detector. Si es disposa d'un detector de diode Array, com és el nostre cas, pot fer-se un escombrat de longituds d'ona dins el rang comprès entre 190 i 600 nm. Amb el software del sistema P/ACE<sup>TM</sup> MDQ es representen gràficament els valors mesurats per a l'absorbància i els temps de migració dels diferents compostos, de manera similar a un cromatograma obtingut per HPLC. Els valors del temps de migració i la determinació de l'àrea de cada un dels pics de l'electroferograma (amb el mateix software), permeten la identificació i la quantificació dels distints compostos de la mostra.

Les diferents variables que intervenen en la separació per electroforesi capil·lar (diàmetre i longitud del capil·lar, pH i concentració del tampó de separació, voltatge aplicat, quantitat de mostra injectada, ús d'additius per tal de modificar les condicions de separació, etc) afecten el perfil obtingut per a una mostra determinada (Dizy *et Bisson*, 1999; Dolník *et Hutterer*, 2001). Per això, cal determinar les condicions òptimes de separació per a cada tipus de mostra. En qualsevol cas, per a assegurar el bon funcionament de l'equip i que la repetibilitat en la determinació de l'àrea dels pics es manté, abans de cada sessió es fa una mesura amb el kit i les condicions de separació subministrats pel fabricant (Beckman-Capillary Performance Test Mixture B).

En aquest treball s'ha pretès intentar caracteritzar millor la fracció d'alta massa molecular obtinguda per FPLC d'esclusió molecular, i per això només s'ha treballat amb aquesta fracció. Les mostres, per a poder ser analitzades, s'han liofilitzats i resuspès en 20 µL d'aigua milli-Q. S'ha utilitzat un capil·lar de 50 cm de longitud efectiva i 50 µm de diàmetre intern. El tampó que ha proporcionat una millor resolució en la separació ha estat el borax 25 mM, a pH 9,2. La longitud d'ona de treball a la que s'obté un millor perfil electroforètic és a 190 nm. El voltatge de separació ha estat de 25 kV (per a voltatges inferiors, la duració de l'anàlisi augmenta sense que la resolució dels pics en resulti significativament millorada).

Tot i que per intentar millorar la resolució dels pics s'ha provat també l'addició de diferents substàncies al tampó de separació (Beckman, 1993; 1994), en cap cas no s'ha observat una millora significativa, pel que s'ha optat per treballar sense additius de cap tipus en el tampó. Entre els distints compostos provats hi ha el 1,3-diaminopropà i la trietilamina (l'ús d'aquestes amines elimina les interaccions entre el solut i la paret del capil·lar), la urea (solubilitza les proteïnes i desnatura els oligonucleòtids) i l'isopropanol (els disolvents orgànics modifiquen el flux electrosmòtic i afecten la solubilització dels compostos).

Així, les condicions òptimes de treball han estat:

- capil·lar de sílice fosa, de 50  $\mu\text{m}$  de diàmetre intern
- tampó Borax 25 mM, pH 9,2
- voltatge: 25 kV
- temps injecció de la mostra: 5 sec, pressió 0,5 psi
- absorbància: 190 nm

### **3. Determinació d'àcids grassos i altres substàncies volàtils per CG**

S'ha aprofitat la metodologia posada a punt per Lema *et al.* (1996) per a la determinació per cromatografia de gasos (CG) dels àcids grassos volàtils, ésters etílics, acetats d'alcohols superiors i altres compostos volàtils del vi.

En l'extracció s'agafen 50 ml de mostra, s'hi addiciona la mescla de patrons interns (àcid heptanoic 3,22 mg/L, 1-nonanol 0,92 mg/L i àcid heptadecanoic 2,90 mg/L), juntament amb 500 µL d'àcid ortofosfòric per tal d'acidificar el medi i millorar l'extracció. A continuació s'afegeixen 4 ml d'una mescla hexà-éter etílic (1:1), s'agita durant 10 min en un agitador magnètic i es passa a un embut de decantació. La fracció orgànica es guarda, mentre que a la fase aquosa es fan dues extraccions més, com abans, afegint únicament 2 ml de la mescla hexà-éter etílic. La suma de les tres fraccions orgàniques decantades, recollides en un únic vial, és la que conté les substàncies que es volien extreure i que s'intentaran separar posteriorment per cromatografia de gasos.

En l'anàlisi per cromatografia gasosa s'ha usat un cromatògraf Hewlett-Packard 4890A connectat a un integrador d'àrees (Hewlett-Packard Integrator 3393A), equipat amb un detector d'ionització de flama (Agilent). S'injecten 2 µL de l'extracte en una columna FFAP-HP de 30 m x 0,25 mm i 0,25 µm de gruix de fase (Agilent). La temperatura del programa varia de 50 °C fins 240 °C, en un temps de 15 min. La temperatura tant de l'injector com del detector és de 240 °C. S'utilitza heli com a gas portador, a un flux de 1 ml/min. Els compostos volàtils han estat identificats i quantificats per comparació amb els estàndards.

#### **4. Clarificació del vi en rama**

Els vins i caves amb que s'han fet les diferents proves i experiments procedeixen de les vinyes i el celler experimental del Mas dels Frares de la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili, situat al terme municipal de Constantí. S'hi conreen varietats blanques i negres, tant autòctones com forànies, a més d'una col·lecció ampel·logràfica composta per unes 60 varietats diferents. La zona on es troba la plantació presenta un clima mediterrani molt suau, a causa de la proximitat del mar. El celler de vinificació té una capacitat de processat de  $5 \times 10^4$  a  $6 \times 10^4$  kg de raïm, i disposa de tot l'equipament necessari per a elaborar i embotellar qualsevol tipus de vi, tant a escala de laboratori com actuant de planta pilot.

Les varietats utilitzades en els nostres experiments són el macabeu, el xarel·lo i la parellada, el chardonnay i el pinot noir (aquesta última és una varietat negra). Unes i altres corresponen a les varietats més utilitzades en l'elaboració de vins escumosos pel mètode tradicional, i caracteritzen les dues zones principals productores d'aquests vins al món. Es tracta de la regió del Cava, íntimament lligada al Penedès, i la regió de Champagne (a França) on, a més, s'utilitza una altra varietat negra, el pinot meunier. Les anàlisis s'han fet amb els vins monovarietals o amb els seus cupatges.

Per a l'elaboració del vi, primer de tot es premsa el raïm, prèviament derrapat, per a obtenir el most. A continuació es realitza un desfangat estàtic de 24 hores de duració amb addició d'enzims pectolítics per tal de que la sedimentació es vegi afavorida. La inoculació de llevats es fa a partir d'un peu de cup amb llevats secs actius (20 g/hL) rehidratats. El seguiment de la fermentació alcohòlica es realitza per mesura dels sucres consumits (disminució de la densitat i valoració dels sucres reductors al final de la fermentació). Una vegada acabada la fermentació s'afegeix el  $\text{SO}_2$  necessari (en forma de solució de metabisulfit potàsic) per a preservar el vi de qualsevol alteració i per evitar que es doni la fermentació malolàctica.

El vi acabat de fermentar es troba a l'estadi de vi en rama, i presenta un aspecte tèrbol. Per aconseguir una correcta limpidesa i obtenir el vi base que s'utilitzarà en el tiratge per a l'elaboració del cava, es procedeix a la realització de diferents trasbalsos, juntament amb l'addició de productes clarificants. El vi, una vegada límpid, es passa per un circuit de fred per provocar la precipitació de les sals tartàriques i, finalment, es filtra.

Quan s'addiciona un clarificant o mescla de clarificants al vi, l'eficàcia de la clarificació es mesura en funció del seguiment de l'evolució de la terbolesa, juntament amb l'avaluació de la quantitat i compactació dels sediments formats. La mesura de la terbolesa s'expressa en unitats NTU i ha estat realitzada amb un nefelòmetre Hanna Instruments, model HI 93703. Com a criteri d'eficàcia de la clarificació s'ha considerat que el vi apareix completament lípid si la seva terbolesa és inferior o igual a 1 NTU.

Les proves de clarificació s'han realitzat a escala de laboratori en tubs de vidre de 200 ml, i la terbolesa s'ha mesurat en el terç superior d'aquests mitjançant l'extracció del volum necessari (10 ml) per a l'anàlisi. Les extraccions s'han fet a les 4, 24, 48 i 72 hores després d'addicionar la quantitat de clarificant seleccionada. Just després d'aquesta addició, els tubs s'han capgirat tres vegades per tal d'aconseguir una bona homogenització i s'han tapat per la seva part superior amb l'objectiu d'evitar que no hi pogués caure cap partícula de pols. El percentatge de sediments ha estat determinat com el quocient entre el volum de pòsits formats respecte del volum total de vi en els tubs.

Els vins emprats en els experiments de clarificació són els procedents de les collites 1999 i 2000. El vi en rama de la collita 1999 està compost per un cupatge de les varietats macabeu (75%), xarel·lo (15%) i parellada (10%). S'han utilitzat diferents clarificants comercials. Alguns d'ells són de naturalesa mineral, tipus bentonita (Bentonita Volclay, Bentonita F2, Adjuvant 83), una mescla de bentonita i alginats (Adjuvant 92), clarificants d'origen proteic (Gelatina Extra, Cola de Peix) i combinacions entre uns i altres. S'han realitzat també proves amb proteïnes vegetals (PV15, PV25, PV57, PV62, PV63) i amb combinacions d'aquestes amb bentonita (Bentonita Volclay) i amb sol de sílice (Silisol).

El vi de la collita 2000 és un vi monovarietal elaborat amb la varietat macabeu. S'han utilitzat alguns dels clarificants provats l'any anterior, a més d'altres de nous. Es tracta dels dos clarificants minerals Bentonita Volclay i Silisol. També s'han fet proves amb alginats, alginats d'alta viscositat i taní enològic (Tanixel), i amb els clarificants proteics Gelatina Extra i Gelisol (modalitat en solució de la gelatina). Les proteïnes vegetals utilitzades han estat les PV62, PV62ac i PV63. A més, s'han combinat les gelatines i les proteïnes vegetals amb els dos clarificants minerals, i el taní amb les dues gelatines.

A la taula 9 hi ha la relació de productes utilitzats en la clarificació del vi, així com la seva dosi, procedència i característiques bàsiques:

Clarificant	procedència	característiques	Dosi (g/hL) clarif vi 1999	Dosi (g/hL) clarif vi 2000
Bentonita Volclay	Sofralab-Martin Vialatte	bentonita càlcica, activada amb carbonat sòdic	30	30
Bentonita F2	Sofralab-MV	bentonita	30	-
Adjuvant 83	Sofralab-MV	mescla de diferents bentonites	20	-
Adjuvant 92	Sofralab-MV	bentonites + alginats sòdics	25	-
Gelatina Extra	Sofralab-MV	col·lagen d'origen animal, poc hidrolitzat, en pols	2	3
Gelisol	Sofralab-MV	col·lagen d'origen animal, poc hidrolitzat, líquid	-	3 cl/hl
Cola de Peix	Sofralab-MV	bufeta natatòria de peix, atomitzada	2	-
Silisol	Sofralab-MV	suspensió col·loidal de sílice amorfa estabilitzada en medi alcalí	2 cl/hl	3 cl/hl
Tanixel	Sofralab-MV	tani de castanyer	-	2
Alginats	Institut Enologique de Champagne	utilitzats habitualment	-	2
PV15	Sofralab-MV	proteïna vegetal	3 - 6	-
PV25	Sofralab-MV	proteïna vegetal	3 - 6	-
PV57	Sofralab-MV	proteïna vegetal	3 - 6	-
PV62	Sofralab-MV	proteïna vegetal	3 - 6	3
PV62ac	Sofralab-MV	proteïna vegetal	-	3
PV63	Sofralab-MV	proteïna vegetal	3 - 6	3

Taula 9 - Clarificants emprats en la clarificació del vi

## **5. Tiratges experimentals**

En el tiratge s'addicionen, al vi base, els sucres i els llevats que realitzaran la segona fermentació en botella. S'afegeixen també els anomenats adjuvants de tiratge, per a facilitar l'eliminació dels posits formats i evitar que aquests quedin adherits al vidre de la botella. Es tracta, normalment, dels mateixos productes utilitzats en la clarificació del vi, però utilitzats en dosis menors. L'addició de llevat en els diferents tiratges es fa a partir de la preparació d'un peu de cup en el que hi ha hagut una adaptació progressiva d'aquests a quantitats creixents d'alcohol (ja que hauran de realitzar la fermentació en un medi que conté etanol) i de forma que s'addicionen 1,5 milions de cèl·lules viables per mililitre.

S'han realitzat tres tiratges diferents amb vins de les collites 1995, 1998 i 1999, corresponents als tiratges 1996, 1999 i 2000, respectivament. En el tiratge realitzat l'any 1996 s'han utilitzat vins monovarietals corresponents a les varietats macabeu, xarel·lo, parellada, chardonnay i pinot noir. L'objectiu ha estat estudiar l'efecte de l'addició de bentonita (Bentonita Volclay, 3 g/hL) com a adjuvant de tiratge, i també la influència del temps de cria en botella durant un període relativament gran (25 i 56 mesos). El llevat utilitzat ha estat Levuline CHP (GLO).

Amb el vi base per a cava de la collita 1998 (macabeu 65%, parellada 20% i chardonnay 15%) s'ha fet un estudi previ d'utilització de diferents adjuvants amb l'objectiu de determinar quins d'ells, en funció dels resultats, seran utilitzats després en el tiratge. Així, les dosis, tot i tractar-se de la clarificació d'un vi, han estat les de tiratge. S'ha de remarcar el fet que l'objectiu d'aquest experiment és fer una selecció dels adjuvants que, en principi, semblin donar uns millors resultats en quant a l'efecte sobre les característiques del vi i les propietats escumants.

L'any 1999 es realitzà un tiratge amb el vi anterior, amb una doble finalitat: determinar l'efecte de la soca de llevat usada en la segona fermentació i veure la influència de diferents adjuvants de tiratge en el comportament escumant del vi (alguns d'ells escollits en funció dels resultats anteriors de clarificació del vi amb dosis de tiratge). Es provaren dos llevats comercials (DV 10 i AYZE) i tres llevats aïllats en els laboratoris de la Facultat d'Enologia (TA 07, P 01 i MF 20), amb l'Adjuvant 83 com a adjuvant de tiratge comú. Per a determinar l'efecte dels adjuvants, s'utilitzaren Bentonita Volclay, Adjuvant 83, Adjuvant 92, Gelatina Extra i una mescla de Gelatina i Silisol. El llevat comú de fermentació fou el DV 10.

L'any 2000 es realitzà un nou tiratge amb el vi base de la collita 1999 (macabeu 75%, xarel·lo 15% i parellada 10%). L'objectiu era comprovar l'efecte dels mateixos adjuvants del tiratge de l'any anterior sobre aquest nou vi, a més de provar dos nous adjuvants, la Colle MO i la Colle 2, elaborats amb una mescla de bentonita i alginats, com és el cas de l'Adjuvant 92. S'ha provat també l'ús combinat de l'Adjuvant 83 amb escorces de llevat i la combinació Bentonita Volclay i Gelatina Extra. El llevat usat en la presa d'escuma ha estat el DV 10. També s'ha fet un tiratge amb diferents llevats (DV 10, AYZE, P 01 i TA 07) amb l'adjuvant comú Adjuvant 83, per a comprovar si se segueix la mateixa tendència que en el tiratge de l'any anterior.

A la taula 10 apareixen els adjuvants usats en les proves de selecció realitzades amb el vi base de la collita 1998.

<b>Adjuvant</b>	<b>procedència</b>	<b>característiques</b>	<b>Dosi (g/hL)</b>
Bent. Electra	Sofralab–Martin Vialatte	bentonita sòdica activada	3
Bent. F2	Sofralab–Martin Vialatte	bentonita	3
Bent. Miracol	Sofralab–Martin Vialatte	bentonita sòdica activada, de gran puresa	3
Bent. Volclay	Sofralab–Martin Vialatte	bentonita càlcica, activada amb carbonat sòdic	3
Bent. 10	Sofralab–Martin Vialatte	bentonita	3
Adjuvant 83	Sofralab–Martin Vialatte	mescla de bentonites	2
Adjuvant 92	Sofralab–Martin Vialatte	bentonites & alginats sòdics	2.5
Kaolin	Sofralab–Martin Vialatte	kaolin	4
Silisol	Sofralab–Martin Vialatte	suspensió col·loidal de sílice amorfa estabilitzada en medi alcalí	2 cl/hl

Taula 10 - Adjuvants usats en clarificació del vi base per a cava i dosi

A la taula 11 apareix el llistat d'adjuvants usats en cada un dels dos tiratges, així com la seva dosi.



Adjuvant	procedència	característiques	Dosi (g/hL) tiratge 1999	Dosi (g/hL) tiratge 2000
Bentonita Volclay	Sofralab-MV	bentonita càlcica, activada amb carbonat sòdic	3	4
Adjuvant 83	Sofralab-MV	mescla de bentonites	2	3
Adjuvant 92	Sofralab-MV	bentonites + alginats sòdics	2.5	3
Colle 2	GLO	bentonita + alginats sòdics	-	3
Colle MO	GLO	bentonita + alginats potàsics	-	3
Gelatina Extra	Sofralab-MV	col·lagen d'origen animal, poc hidrolitzat, en pols	2	0.4
Silisol	Sofralab-MV	suspensió col·loidal de sílice amorfa estabilitzada en medi alcalí	2 cl/hl	-
Escorces de llevat	Sofralab-MV	escorces de llevat	-	3

Taula 11 - Adjuvants de tiratge utilitzats i dosis

Finalment, a la taula 12 es mostra la relació dels distints llevats emprats per a realitzar la presa d'escuma.

llevat	procedència
Levuline CHP	GLO
DV 10	Martin Vialatte-Station (Enotechnique de Champagne (Sofralab))
Ayze	MV-SÆC (Sofralab)
LX 4	MV-SÆC (Sofralab)
1A4	MV-SÆC (Sofralab)
L 3573	MV-SÆC (Sofralab)
EC 1118	Lallemand
TA 07	Fac. Enologia de Tarragona
P 01	Fac. Enologia de Tarragona
MF 20	Fac. Enologia de Tarragona

Taula 12 - Llevats utilitzats en la presa d'escuma

## **6. Autolisat de llevats en un medi sintètic**

S'ha volgut determinar quin és l'efecte dels llevats en la composició d'un medi després de la fermentació i d'un temps determinat de contacte amb ells, però sense la interferència dels compostos procedents del raïm. Per això, s'ha procedit a la fermentació d'un medi sintètic en el que s'intenten reproduir les principals característiques d'un most. La seva composició ha estat:

- Dissolvent: aigua
- 100 g/L glucosa + 100 g/L de fructosa
- 6 g/L àcid tartàric
- pH ajustat a 3,1 amb NaOH
- Activadors de fermentació (10 g/hL)

Per a realitzar la fermentació s'ha utilitzat el llevat comercial RV1 (Lallemand), en una dosi de 20 g/hL. Com que el medi sintètic té com a únics nutrients pels llevats els dos sucres afegits, s'han addicionat també activadors de fermentació (Vitamine-Martin Vialatte), consistents en una mescla de fosfat amònic i tiamina, en una dosi de 10 g/hL. La fermentació i el posterior període de conservació en contacte amb els llevats ha tingut lloc a una temperatura de 25 °C.

Tot i que s'ha comprovat que la fermentació es dona, no se n'ha fet cap seguiment, ni dels sucres consumits ni dels sucres residuals. Ha interessat més veure l'efecte conjunt de la fermentació i el contacte amb els llevats sobre l'alliberament de col·loides. Per aquest motiu, des del primer dia s'han anat extraient periòdicament diferents aliquotes per a determinar quina és la seva composició col·loidal. El recipient de fermentació ha estat sotmès a agitacions regulars amb l'objectiu d'afavorir l'alliberament al medi dels productes d'autòlisi.

## **7. Obtenció de col·loides del vi, d'un autolisat de llevats i de les pells de raïm**

El vi utilitzat per a l'extracció de col·loides correspon al cupatge (macabeu 65%, parellada 20% i chardonnay 15%) per a cava, sense clarificar, de la collita 2001. La mostra d'autolisat de llevats s'obté de la fermentació i conservació en contacte amb els llevats del medi sintètic anterior. Per a l'extracció dels col·loides de les pells de raïm s'ha usat un raïm blanc comercial de taula, de la varietat moscatell. En aquest raïm s'ha eliminat la rapa, s'ha premsat (extracció del 70% p:v) i el residu sòlid format per les

pellis i els pinyols s'ha resuspès en un volum d'aigua idèntic al de most obtingut. S'ha deixat en agitació durant 48 hores i, finalment, s'ha filtrat per a poder treballar amb la fracció líquida.

En tots els casos el que es pretén és obtenir un extracte sec de la fracció col·loidal que forma part de la matriu líquida inicial. Les mostres se centrifuguen a 6000 g (Sorvall, rotor alta capacitat GSA), durant 6 min, a 4°C . El sobrenedant es dialitza en sacs de diàlisi (Sigma), amb una membrana de tall de massa molecular de 12 kDa, front a aigua destil·lada. Un vegada dialitzada, la mostra es buida en una placa petri i es liofilitzada (Christ-Alpha 1-4, Bräum Biotech). En aquest instant ja es té l'extracte sec de col·loides. Per a poder treballar més còmodament amb ell es resuspen el contingut de la placa en 1,5 ml d'aigua destil·lada, es posa en tubs eppendorf i es torna a liofilitzar. Les mostres es guarden a -20°C fins el moment de ser utilitzades.

Si s'han d'analitzar per FPLC es resuspendran en el tampó portador corresponent, segons el procediment ja descrit. Si es vol comprovar l'efecte de la seva addició sobre les característiques escumants d'un vi o un altre líquid, aleshores es resuspendrà el contingut de cada eppendorf en un petit volum de vi o líquid, segons correspongui, i s'afegirà al volum total a analitzar.

## **8. Tractament estadístic de les dades**

Si no s'indica el contrari, les determinacions analítiques s'han realitzat per triplicat. L'anàlisi estadística de les dades s'ha realitzat amb el programa SPSS 10.0 per a Windows, amb anàlisi de Scheffe i el coeficient de correlació de Fisher per als triplicats, amb un nivell de significància del 95% ( $p < 0,05$ ) i separació per subconjunts homogenis. Així, en les comparacions dels resultats s'indica amb una mateixa lletra els valors que no són significativament diferents, i amb una lletra distinta quan el tractament estadístic mostra que la diferència és significativa.

En la comparació dels valors promig s'ha usat el coeficient de correlació de Pearson, amb un nivell de significància bilateral del 95% ( $p < 0,05$ ).

