



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

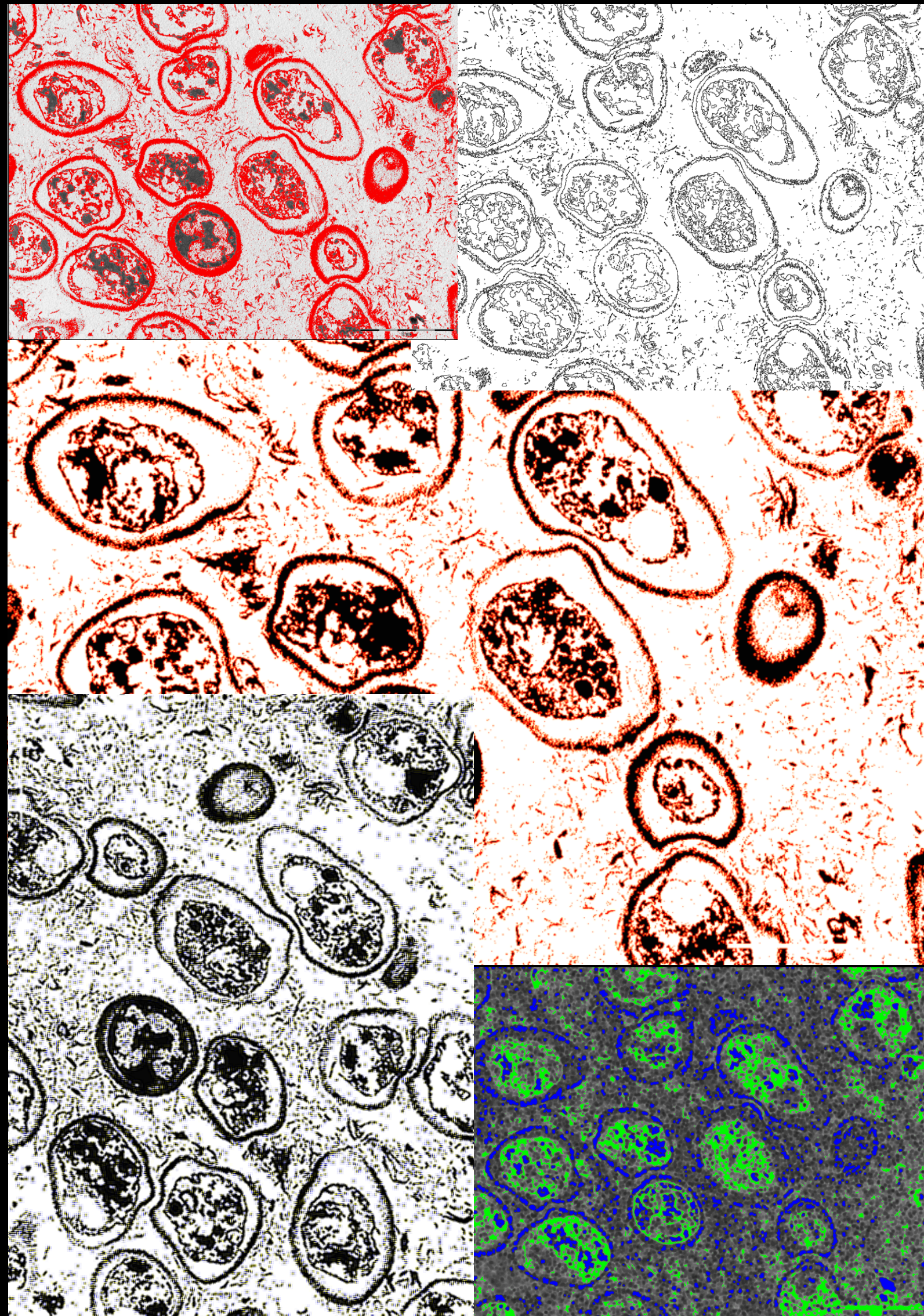
## Nuevas perspectivas en la caracterización de la autólisis en vinos espumosos

Rebeca Tudela Ramos

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

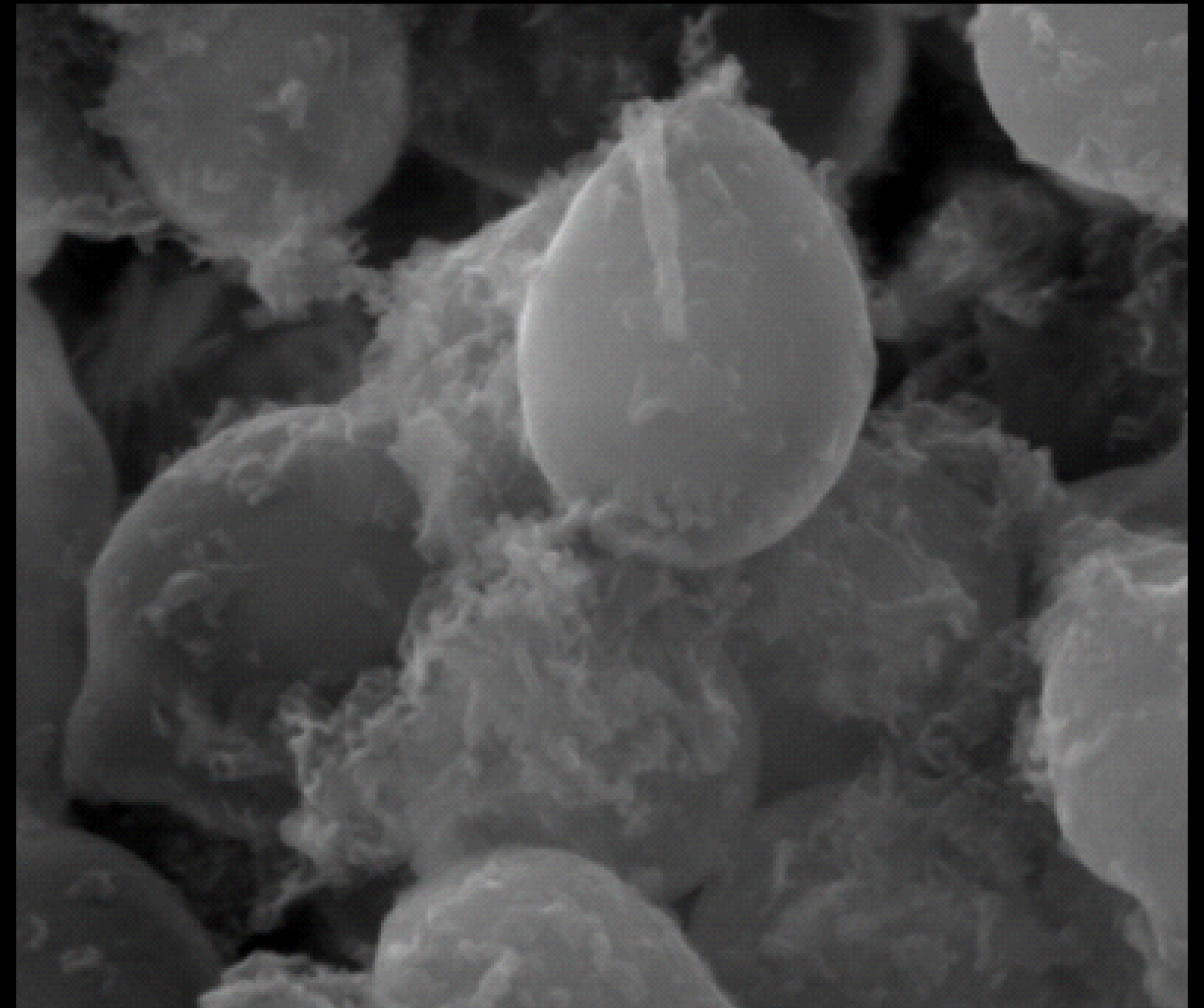


Tesis  
Doctoral

Nuevas perspectivas en la caracterización de la autólisis en vinos espumosos

Rebeca  
Tudela  
2015

# NUEVAS PERSPECTIVAS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LA AUTÓLISIS EN VINOS ESPUMOSOS



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Tesis Doctoral  
Rebeca Tudela Ramos  
Barcelona 2015





---

Universitat de Barcelona

**UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT FARMACIA  
DEPARTAMENT DE NUTRICIO I BROMATOLOGIA**

**Nuevas perspectivas en la  
caracterización de la autólisis  
en vinos espumosos**

Rebeca Tudela Ramos

2015



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA  
DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO  
BIOTECNOLOGÍA  
2009–2015

**Nuevas perspectivas en la  
caracterización de la autólisis  
en vinos espumosos**

Memoria presentada por Rebeca Tudela Ramos para optar al  
título de doctor por la Universitat de Barcelona, dirigida por:



Dra. Susana Buxaderas Sánchez



Dra. Elvira Lopez Tamames



Rebeca Tudela Ramos  
2015



Este trabajo ha estado financiado por:



La Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) del **Ministerio de Educación y Ciencia** a través de los proyectos:

- AGL2008-03392
- AGL2011-23872

**ACCIÓ**



**Generalitat de Catalunya**

La **Generalitat de Catalunya** mediante ACCIÓ y ayudas para Grupos de Investigación

Consolidados:

- EVALXARTA2010 (EX12)
- 2009 SGR 606

*Freixenet*

Las bodegas del **Grup Freixenet S.A** mediante la aportación de las muestras.





A Verónica y Joaquín



”En medio del invierno, me pareció que había,  
dentro de mí, un invencible verano”

*Albert Camus*

*“In Vino Veritas”*

*Plinio el Viejo*



## **Agradecimientos**

Haciendo una retrospectiva de todos estos años, la realización de mi tesis ha tenido buenos momentos con buenos resultados y con muchas risas incluidas, y también momentos complicados; pero el balance global ha sido muy positivo para mi crecimiento personal, y para mi crecimiento como investigadora.

Soy muy consciente que no es fácil que una tesis sin beca y sin estar asociada directamente a un proyecto salga adelante, y menos si además se realiza a tiempo parcial. Por esta razón y por muchísimas más, agradecer a mis directoras de tesis Susana y Elvira todo el apoyo, motivación y ayuda a lo largo de todos estos años, y por hacerme sentir en todo momento que formaba parte del grupo de investigación. Concretamente a Susana por darme la oportunidad de realizar la tesis y a Elvira por estar siempre para todo. Las dos han sido muy buenas directoras, cada una en su estilo, formando un buen tándem de trabajo y personal, Susana haciendo que la tesis avanzara con orden y sentido y Elvira con sus innumerables discusiones científicas. Gracias a las dos por todos los conocimientos que he adquirido del mundo del cava, por esos cafés de la máquina, esas risas y esos momentos compartidos hablando de todo un poco. Además de directoras de tesis han sido muy buenas amigas.

A Montse porque aunque no ha sido mi directora de tesis, siempre ha estado para ayudar y ser parte de la solución.

A Gallardo por ser quien me guio en mi primera toma de contacto con la dura realidad del laboratorio, por su introducción a la microscopía electrónica de transmisión y por tantos buenos ratos. A Arnau por todos los días que compartimos risas y lloros en el laboratorio. A M<sup>a</sup> Ángeles por esas risas y esos desahogos telefónicos.

A Nuria Rius por su constancia y su buen hacer en el trabajo.

Al personal de los Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, especialmente a Carmen López-Iglesias y Elisenda Coll por la inestimable ayuda para adentrarme al fascinante mundo de la microscopía. A Gerard Oncins por transmitirme esa positividad suya al explicarme el “nanomundo” en las levaduras.

A Massimo por dedicarme parte de su escaso tiempo y tener una paciencia infinita para explicarme todas mis dudas, que eran muchas. A Albert Ribas por todo su apoyo durante mi estancia en el IRTA de Monells.

A todos los compañeros del departamento por su predisposición siempre a ayudar, Estefanía, Mari Luz, Joan Bosch, etc.

A las bodegas colaboradoras Grup Freixenet S.A. por la oportunidad de obtener cavas a escala industrial y especialmente a Pilar Urpí y Jordi Torrent.

A mis compañeros de Telefónica por aguantar todos mis cambios de humor y mi enajenación “a veces” del trabajo.

A Ana Cris, que siempre me ha dado ánimos para que siguiera estudiando.

A mis padres, a mi hermana Cecilia por todas esas buenas comidas, a mi tía Ángeles y Trini por interesarse siempre por lo que estaba haciendo y a toda mi familia por su ánimo para que acabara la tesis, y en especial a mi sobrino Víctor Varela por sus innumerables muestras de solidaridad con sus palabras de: “¿cómo va la tesis tita?”.

Y especialmente agradecerle a Joaquín que durante estos años ha sabido comprender todos mis estados de ánimo y me ha apoyado hasta el final para que pudiera acabar la tesis. Gracias a sus innumerables consejos (sin ser un conocedor en profundidad del tema), su cariño y su paciencia, que me han ayudado enormemente a concluir esta etapa de mi vida. A mi “Xici” Verónica, por todo su cariño y sus besos cuando estaba en los mejores y peores momentos. Siempre hace que me salga una sonrisa y mientras nos abrazamos me olvide de todo.

“Muchas gracias a todos”

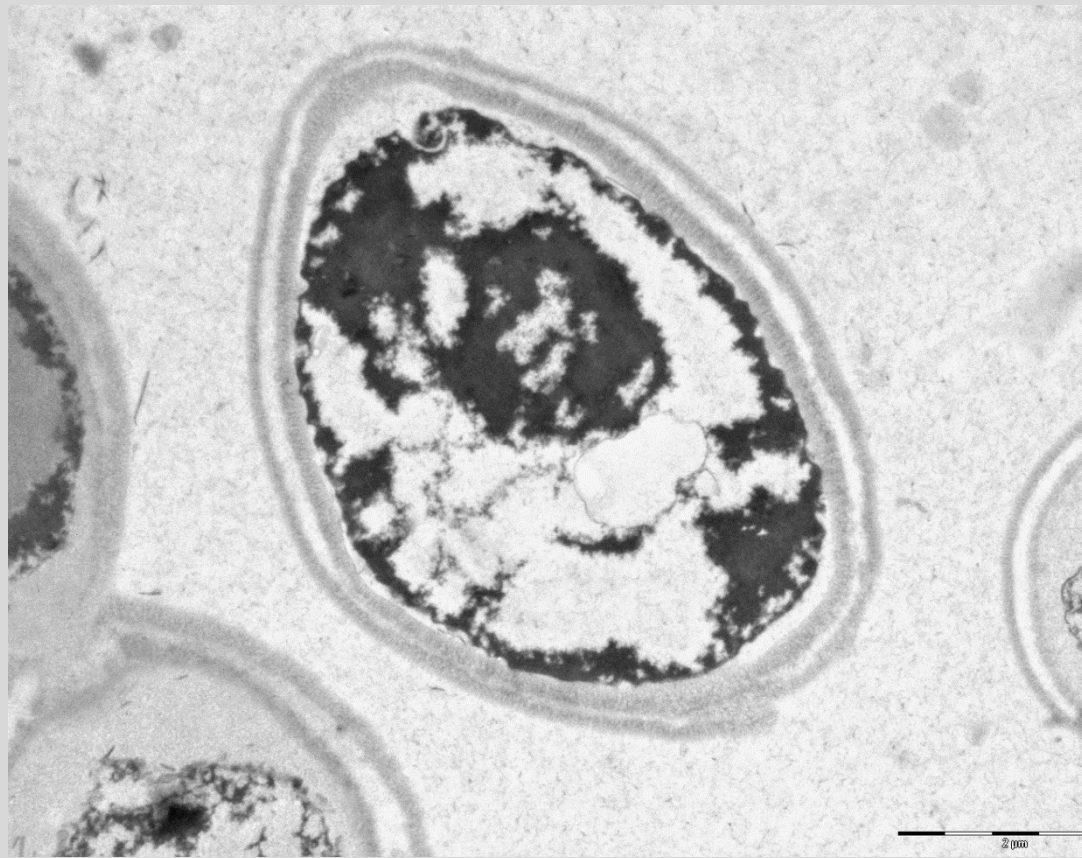
## ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| 1. INTERÉS Y OBJETIVOS.....  | 3   |
| 2. INTRODUCCIÓN.....   | 7   |
| 2.1 Antecedentes históricos de la elaboración del cava.....  | 7   |
| 2.1.1 Historia de los actuales vinos espumosos.....  | 7   |
| 2.1.2 Elaboración de vinos espumosos en Cataluña.....  | 10  |
| 2.1.3 Los primeros elaboradores.....   | 13  |
| 2.1.4 Reglamentación del Cava.....   | 14  |
| 2.2 Elaboración de vinos espumosos.....  | 18  |
| 2.2.1 Métodos de elaboración de espumosos de calidad.....  | 18  |
| 2.2.2 Método tradicional en la elaboración del cava.....   | 22  |
| 2.3 Características de las levaduras de segunda fermentación.....  | 25  |
| 2.3.1 Ultraestructura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....   | 25  |
| 2.3.2 Fase de toma de espuma.....  | 29  |
| 2.3.3 Autofagia y lisis de las levaduras.....  | 35  |
| 2.4 Referencias bibliográficas.....  | 45  |
| 3. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO.....  | 57  |
| 3.1 Plan de trabajo: cambios estructurales, morfológicos y de las<br>propiedades superficiales de las lías.....        | 58  |
| 3.1.1 Muestreo.....  | 58  |
| 3.1.2 Procedimientos analíticos.....   | 60  |
| 3.1.2.1 Obtención del pelet de las lías.....   | 60  |
| 3.1.2.2 Operaciones preparatorias y observación con TEM.....   | 60  |
| 3.1.2.3 Observación y cuantificación de los cambios morfológicos mediante<br>AFM.....                                  | 63  |
| 3.2 Plan de trabajo: indicadores químicos del estado autolítico.....   | 65  |
| 3.2.1 Muestreo.....  | 66  |
| 3.2.2 UPLC/MS/MS.....  | 69  |
| 3.2.2.1 Espectrometría de masas.....   | 69  |
| 3.2.2.2 Procedimiento.....   | 71  |
| 3.3 Referencias bibliográficas.....  | 73  |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 77  |
| 4.1 Cambios ultraestructurales de las lías del cava durante el envejecimiento en<br>condiciones enológicas reales..... | 78  |
| 4.1.1 Resumen.....   | 78  |
| 4.1.2 Publicación: <i>FEMS Yeast Research</i> , 12 (4), 466-476 (2012).....  | 81  |
| 4.1.3 Datos de la aplicación de AFM.....   | 93  |
| 4.1.3.1 Resultados.....  | 95  |
| 4.1.3.2 Referencias bibliográficas.....  | 102 |
| 4.2 Evolución de los catabolitos de ARN en el Cava durante la crianza biológica.....                                   | 106 |
| 4.2.1 Resumen.....   | 106 |
| 4.2.2 Publicación: <i>J Agric Food Chem</i> , 61, 6028-6035 (2013).....  | 109 |
| 4.3 Evolución de indoles en el Cava durante la crianza biológica.....  | 117 |
| 4.3.1 Origen y función de la melatonina y sus isómeros.....  | 117 |
| 4.3.2 Antecedentes bibliográficos en vinos.....  | 122 |
| 4.3.3 Análisis de indoles en las muestras de cava.....   | 127 |



|   |     |
|---|-----|
| 4.3.3.1 Validación de un método de Ultra Alto Rendimiento mediante Cromatografía Líquida (UHPLC) tándem espectrometría de masas (MS / MS) para la cuantificación de nueve indoles en los vinos espumosos..... | 128 |
| 4.3.3.1.1 Resumen.....  | 128 |
| 4.3.3.1.2 Publicación enviada: <i>J Agric Food Chem</i> .....   | 129 |
| 4.3.3.2 Contenidos de indoles en muestras de cava con distinta crianza.....   | 151 |
| 4.3.4 Referencias bibliográficas.....   | 165 |
| 5. COMENTARIOS A LOS RESULTADOS.....  | 173 |
| 6. CONCLUSIONES.....  | 179 |

# Capítulo 1



## 1. Interés y objetivos



# 1. Interés y objetivos

---

La elaboración de cavas es uno de los procesos biotecnológicos comercialmente más prósperos que se realiza en España (98% de su producción se localiza en Cataluña). Pertenecen a la categoría de vinos espumosos de calidad elaborados según el método tradicional o *champenoise*, cuya calidad y autenticidad está controlada por la Denominación de Origen (DO) correspondiente. Los cavas se clasifican en función de diferentes criterios, atendiendo a la duración de la crianza, el contenido de azúcar y las variedades de uva empleadas. Aunque la producción de estos vinos es menor en comparación con la de los vinos tranquilos, el impacto económico para la industria enológica es muy importante. Con 33.325 hectáreas de cultivo en 2014 se produjeron 215 millones de botellas de la categoría Cava (mínimo 9 meses de crianza), 22.6 millones de botellas de la categoría Reserva (mínimo 15 meses de crianza) y 4.7 millones de botellas de la categoría Gran Reserva (mínimo 30 meses de crianza).

El cava se obtiene tras la segunda fermentación de un vino tranquilo llamado vino base al que una vez embotellado se le añade el licor de tiraje y se deja reposar. En esta fase de la elaboración denominada “en rima” se efectúa la segunda fermentación, toma de espuma y la posterior crianza mínima de nueve meses. Durante la crianza tiene lugar un fenómeno llamado autólisis que se produce cuando la segunda fermentación termina y las levaduras mueren. La autólisis es un proceso lento en el que se produce una auto-digestión enzimática de los compuestos de la levadura (péptidos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos entre otros) y biopolímeros de la pared celular (glucanos, manoproteínas). La ruptura de las membranas celulares y las modificaciones en la estructura de la pared celular, permite la liberación de los productos de degradación al medio extracelular (el cava). Este proceso autolítico influye en las características organolépticas que adquiere el cava en función del tiempo de envejecimiento. El conjunto de modificaciones a lo largo de la crianza que transforman un cava joven en otro más evolucionado con nuevas sensaciones aromáticas, determinan su calidad. Por ello, los Cavas Reserva y Gran reserva que se someten a una larga crianza de 15 y 30 meses respectivamente, son los cavas mejor valorados desde el punto de vista organoléptico.

Así, “la rima” implica un enriquecimiento del medio vino en componentes cedidos por las lías y una serie de procesos químicos y bioquímicos, de interacción levadura/vino, no suficientemente esclarecidos pero dependientes del tiempo y de las características físico-químicas de cada vino.

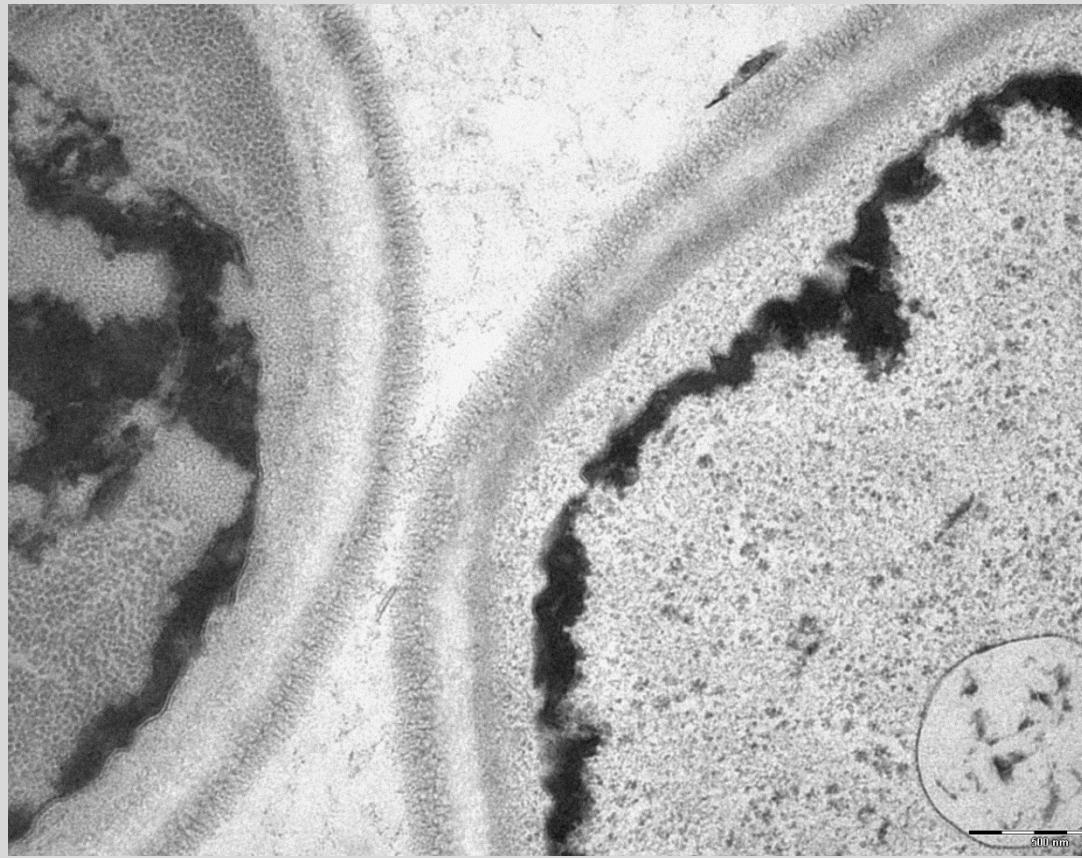
Los elaboradores de los vinos espumosos disponen de su habilidad profesional en la descriptiva sensorial de vinos para decidir sobre el estado organoléptico del producto. Es una opinión subjetiva

sobre la calidad y sería de gran utilidad contar con indicadores químicos objetivos, que puedan relacionarse con el tiempo de crianza y que informen sobre su correcta evolución. Para alcanzar esta finalidad es necesario profundizar tanto en los cambios morfológicos de las lías a lo largo del tiempo de envejecimiento, como en las variaciones químicas que se producen en los vinos espumosos en contacto con las células autodegradadas o lías.

Por estas razones los objetivos generales que se plantean en esta tesis doctoral son:

- 1.-Caracterizar los cambios ultraestructurales y morfológicos de las lías durante la larga crianza biológica de los cavas.
- 2.-Definir posibles indicadores químicos en el vino que se relacionen con el tiempo de crianza y con el grado de degradación de las lías y, que se puedan utilizar para controlar objetivamente el envejecimiento de los cavas.

# Capítulo 2



## 2. Introducción



## 2. Introducción

---

### 2.1 Antecedentes históricos de la elaboración del cava

El primer antepasado de los espumosos actuales se llamaba *vinum titillans* y fue servido en el siglo I de nuestra era durante un banquete en honor de César y Cleopatra. Se dice que ya se bebían vinos espumosos en la Grecia antigua, donde para algunos la espuma, el alcohol y el sabor dulce invitaba a la lujuria, y para otros era una bebida endemoniada por los dolores de cabeza que producía. Según afirma Mario Fregoni (citado por Peñín, 2008), profesor de la Universidad Católica de Piacenza, los vinos espumosos vienen de lejos y no sólo son atribuibles al champaña, ya que el deseo de los romanos de beber vino burbujeante por la sensación fresca del carbónico residual, y por el dulzor de una fermentación sin acabar, fue una constante entre sus bebedores (Peñín, 2008). El poeta romano Publio Virgilio Marón (70-19 a C) en "La Eneida" utiliza la expresión *spumantem plateram* donde describe unos vinos que producían un cosquilleo en el paladar y una sensación de frescor en boca (Daban, 2005). Según Daban (2005) parece que su obtención era más fruto del azar que de otra cosa. Sin embargo para Fregoni (Peñín, 2008) los romanos, que ya conocían la técnica de añadir uva pasa para obtener el vino con burbujas, también experimentaron la fermentación y refermentación programada en las ánforas, y descubrieron un método para retrasar la fermentación espontánea del mosto a través del frío (Peñín, 2008).

En el siglo XIV hay referencias escritas del teólogo franciscano Francesc Eiximenis (Girona, hacia 1330-Perpiñán, 1409) sobre vinos *frizzanti*. En su obra *Lo Crestià* (de cuatro volúmenes) dentro de la diversidad de temas que trató, uno de los más importantes fue la relación del hombre con la comida y la bebida. El descriptor organoléptico utilizado en uno de sus tratados induce a pensar en la presencia de carbónico en el vino (Daban, 2005).

#### 2.1.1 Historia de los actuales vinos espumosos

Los primeros indicios de elaboración de vino espumoso en la región francesa de la Champaña se encontraron hacia el siglo XVII, aunque este vino no era el champaña que hoy conocemos, ya que sólo mantenía las burbujas hasta el verano (Díaz de Mendivil *et al.*, 1999, Buxaderas y López-Tamames, 2012). El término vino de Champaña se cree que aparece a inicios de ese siglo siendo el vino D'Aÿ el más conocido (Duteurtre, 2010). No obstante, en esta zona vitivinícola ya se elaboraban vinos bajo el dominio del Imperio Romano (desde el año 50 d.C), denominados *vinum titillum*, aunque no es hasta el año 800 cuando se documenta la producción de vino. En la Edad Media, los vinos de la Champaña se identifican como vinos vivos, ligeros, claros, poco azucarados y que a



menudo presentan una ligera y efímera efervescencia debida a una fermentación incompleta del mosto (Díaz de Mendivil *et al.*, 1999, Buxaderas y López-Tamames, 2012). Alrededor del siglo XVI la zona de la Champaña ya es conocida por sus vinos blancos del valle de Marne, los tintos de la montaña de Reims y los “gris”, parecidos a los actuales rosados. Estos últimos se elaboraban con una mezcla de uvas blancas y tintas y son los precursores de los actuales vinos espumosos. El clima septentrional de la región provocaba vendimias tardías y el frío del invierno podía interrumpir la fermentación del mosto. Cuando la temperatura aumentaba en primavera, la fermentación arrancaba de nuevo pero la mayor parte del gas se escapaba de los toneles. Con objeto de preservar la efervescencia natural introdujeron el vino en botellas cerradas con madera y cáñamo, pero muchas de ellas no resistían la presión y se rompían (Buxaderas y López-Tamames, 2012). Este obstáculo, junto con la creciente demanda de vinos espumosos motivó que los fabricantes de vidrio ingleses mejoraran la calidad de las botellas. En 1640 sir Kenelm Digby (según otros autores Eugene Digby) revoluciona el mundo del vino, creando la primera industria para fabricar botellas en hornos de carbón de hulla. Su patente era más resistente y valiosa que todas las inventadas hasta entonces, por lo que se le considera el inventor de la botella tal y como hoy la conocemos. Sir Kenelm, comenzó a fabricar una botella de vidrio ahumado, con más espesor, peso y solidez, pero no es hasta 1662 cuando el parlamento reconoce la paternidad de esta nueva botella, que no es adoptada por los viticultores franceses hasta el año 1707.

Pero el champaña es el único vino del mundo ligado a un nombre propio, el del fraile Dom Pérignon sobre el que han circulado numerosas leyendas (Peñín, 2008). No fue el “descubridor accidental”, como le atribuyen las leyendas, del champaña pero sin duda fue el primero en la región en tener un enfoque razonado sobre la elaboración de los vinos (Bonal, 1995). El inicio de un proceso de elaboración del champaña más metódico se debe a él, que fue el *procureur* de la abadía de Hautvilles, desde 1668 hasta su muerte en 1715. Esta abadía se dedicaba a la producción de vino con un viñedo propio de diez hectáreas pero que recibía también diezmos de uvas de los terrenos cercanos. El propósito de Dom Pérignon, además de la obtención de un vino blanco excepcional, fue el de embotellar el vino sin terminar de fermentar, para poder beberlo fuera de la bodega y que durara por lo menos hasta la siguiente cosecha, y no hasta el fin de la primavera (Peñín, 2008). Él escribió el libro: "El arte de tratar bien la viña y el vino de Champagne" que se publicó tres años después de su muerte por el canónigo Godinot. Es un tratado de normas sobre cómo vendimiar para obtener vino con el mejor color blanco a partir de la uva Pinot Noir. Describe la forma de podar el viñedo para evitar exceso de producción, las precauciones que deben tomarse para mantener intactos los granos, la necesidad de seleccionar la uva separando los granos podridos de los sanos, además de retirar hojas y otro material vegetal, etc. Llegó incluso a clasificar los viñedos por su

calidad de uva y a recomendar la vinificación independiente de cada pago. También a Dom Pérignon se debe la separación de mostos por distintas presiones de prensado. El primer mosto obtenido al prensar con los pies daba origen al vino más delicado y con menos cuerpo, llamado *vin de goutte*. Las dos prensadas siguientes se denominan primera y segunda *taille* y dan lugar a vinos también buenos pero de calidad algo menor. Con posteriores prensadas se obtienen mostos de baja calidad que no podían utilizarse para elaborar vinos de alta gama. También algunos autores defienden que fue Dom Pérignon el primero que decidió utilizar el tapón de corcho (Daban, 2005; Buxaderas y López-Tamames, 2012) tras visitar el monasterio benedictino de Sant Feliu de Guixols. Pero es difícil atribuirle su autoría ya que no hay datos fiables sobre este hecho (Peñín, 2008).

Dos hechos importantes marcan la evolución de la elaboración del champaña en el siglo XVIII, primero la creación de las primeras *maisons de champagne* a partir de 1729. Los comerciantes o *negociants* de estas *maisons* tienen en su mayoría una cultura industrial y comercial, vienen de los comercios del textil y la banca. Sus organizaciones y sus experiencias de la producción y del comercio dan un primer paso hacia la preocupación sobre la calidad que desplaza la producción monástica. Segundo, el siglo XVIII es el de la luz, de los grandes descubrimientos, del desarrollo científico; Lavoisier, después de descubrir el papel del oxígeno, fue el primero en comprender el fenómeno de la fermentación; Gay-Lussac completa sus trabajos escribiendo la ecuación de esa reacción y construyendo un alcoholímetro que permitía medir el grado alcohólico de los líquidos espirituosos; Chaptal, químico y agrónomo perfecciona la utilización del azúcar en el vino, *de suppléer par l'art au défaut de la nature*, añadir al mosto un poco de azúcar para aumentar el grado alcohólico (Duteurtre, 2010).

Ya en el siglo XIX el científico Jean-Baptiste François, farmacéutico de Châlons-sur-Marne, hizo un progreso considerable en la maestría de la toma de espuma. Se interesó por el gran número de problemas en la elaboración del champaña, las explosiones de botellas en la cava y la incompleta toma de espuma por falta del azúcar necesario la fermentación en botella. Puso a punto una técnica analítica llamada *réduction François*, que permitía medir la cantidad de azúcar presente en un vino. Y así pudo mostrar la relación existente entre la cantidad de azúcar presente en un vino en botella y la presión del gas carbónico (Duteurtre, 2010).

En este siglo aparece otra figura clave, la viuda de Clicquot (Nicole-Barbe Ponsardin) inventora del pupitre. Su marido tenía un pequeño negocio de vinos en Reims y muere muy joven debido a unas fiebres. La viuda se hace cargo del negocio y gracias a ella aparecen las técnicas del degüelle y del removido. En esa época para eliminar las lías (los turbios blanquecinos del vino espumoso) se trasvasaba el vino de una botella a otra de manera delicada con las consecuentes pérdidas de vino

(Duteurtre, 2010; Buxaderas y López-Tamames, 2012). Ella en colaboración con uno de sus empleados Antoine Müller desarrolló en 1818 unos estantes con agujeros, con la dimensión de las botellas de forma oblicua y no cilíndrica lo que permitía mantener las botellas en diferentes posiciones (Duteurtre, 2010). Al principio se colocaban en estado horizontal y se les proporcionaban diariamente ligeros giros de un octavo de vuelta. Progresivamente, los giros y una posición cada vez más vertical, con el cuello de la botella perpendicular al suelo, los turbios se iban situando sobre el corcho. Al sacar el tapón, la descompresión hacía salir de la botella las lías arrastradas hasta el corcho. Así se consiguió que el vino espumosos adquiriese un aspecto limpio y un color amarillo brillante (Buxaderas y López-Tamames, 2012).

Pero el considerado de una manera general, como el padre de la enología moderna, de la microbiología, de la fermentación y la biotecnología fue Pasteur (Duteurtre, 2010). Después de haber vivido su juventud en una región vitícola, siendo decano de la facultad de ciencias de Lille, se interesó por las fermentaciones lácticas y alcohólicas, las levaduras de cerveza, etc. Demostró, oponiéndose a la doctrina oficial de la época, la presencia de células a través del microscopio, y acabó con la creencia de la generación espontánea.

### **2.1.2 Elaboración de vinos espumosos en Cataluña\_(Emili Giralt i Raventós)**

En este apartado se realiza una síntesis del libro de Emili Giralt i Raventós (1998) *Els inicis del cava: Mont-Ferran, Agustí Vilaret i Centrich (1820-1903)*. Su autor, Emili Giralt, fue catedrático de historia contemporánea en la universidad de Valencia (1965) y desde 1971 de la de Barcelona. Fue el fundador y director del *Centre d'Estudis d'Història Rural* y de la revista *Estudis d'Història Agrària*, desde el año 1977. Antoni Roca Rosell (profesor de historia de la ciencia y de la técnica en la *Universitat Politècnica de Catalunya*) publica una reseña sobre este libro en *els Quaderns d'Història de l'Enginyeria* (2007) en la cual comenta que, conociendo la personalidad del autor, este trabajo es una investigación sobre los orígenes de la industria del cava vinculados a la renovación de la enología en Cataluña; su trabajo se ha basado en documentos públicos del archivo de la propiedad y del archivo notarial, y en las publicaciones que Vilaret llevó a cabo.

La aparición histórica del cava comienza como imitación de los vinos espumosos elaborados en la Champaña. Desde los últimos años del siglo XVIII, los catalanes podían conocer el vino espumoso elaborado en la Champaña de tres posibles maneras: directamente como consumidor, a través de los fabricantes y exportadores de los tapones de corcho, y por medio de la literatura enológica.

Una de las noticias más antiguas del consumo en Cataluña la da el cronista de la alta sociedad el *baró de Maldà* donde constata la presencia de champaña en la boda de la hija de los condes de Santa

Coloma en 1803. El consumo de esta bebida pertenecía a un ambiente elitista. Pero fue en la guerra napoleónica (1808-1814) cuando los catalanes como otros europeos tuvieron conocimiento directo del champaña. Parece ser que Napoleón y por mimetismo todos sus oficiales, eran grandes devotos del champaña. Poco después durante la segunda ocupación militar francesa (1823-1827), esta vez como aliados de Fernando VII, los *Cent Mil Fills de Sant Lluís* (ejército francés con voluntarios españoles) disfrutaron de una intendencia privilegiada y pudieron consumir como lo demuestran documentos oficiales, productos franceses sin casi trabas aduaneras. En estos años, las manufacturas, las modas y, en general, todas las costumbres francesas penetraron en la sociedad catalana con una intensidad superior a la de muchos otros sitios de la monarquía española. Los vinos franceses se consideraron un elemento insustituible de los grandes banquetes y el mejor exponente del refinamiento de una buena mesa.

Como todos los otros vinos comercializados en Cataluña, el espumoso era designado siempre por su origen sin ninguna referencia a una marca comercial. Hasta los últimos años de la década de los sesenta no comenzó a aparecer en la prensa barcelonesa las marcas de las grandes casas elaboradoras de Francia.

Al acabar la primera guerra carlista (1833-1840) ya debía existir en Cataluña una burguesía lo bastante cultivada gastronómicamente, y con la suficiente capacidad económica como para constituir un sector consumidor del producto. El engrosamiento de la capa social acomodada, que es una característica de la Cataluña contemporánea, corre paralela al consumo de champaña, que continuó aumentando desde mediados del siglo XIX. Este crecimiento les provocó a los vinateros catalanes la necesidad de elaborar un vino espumoso con la misma calidad que los espumosos franceses.

También los catalanes conocieron la existencia del champaña gracias a los fabricantes y exportadores de tapones de corcho de las comarcas de la Selva y del Empordà, los cuales desde el segundo tercio del siglo XVIII, se convirtieron en habituales proveedores de tapones para las empresas de champaña. El alto precio que se pagaba por los tapones y la muy superior cotización del champaña en las lista de precios de los vinos de mayor prestigio, fueron un incentivo para conocer aquel vino espumoso y un poderosos estímulo para intentar elaborarlo. Por esta razón no es fortuito que las primeras instalaciones de bodegas y cavas para obtener el vino espumoso sean en las localidades de Blanes con Agustí Vilaret (1870), Romanyà de la Selva con Marçal de Trinxeria (1877) y Tossa con Jaume Esteve-Llach (1908), poblaciones situadas todas ellas en el ámbito de la producción corchera.

La literatura enológica que permitió el conocimiento del vino espumoso fueron la francesa y la reelaborada por enólogos catalanes. El diccionario de Rozier (botánico y agrónomo), cuya obra

completa se publicó traducida al español entre 1897 y 1903, y las obras de Chaptal, que se ocupaban extensamente del vino espumoso, se tradujeron al castellano y se publicaron en Barcelona al final del siglo XVIII y al inicio del XIX.

Las técnicas de elaboración son brevemente descritas por el valenciano J.A. Varcárcel en el tomo VIII escrito en 1791 perteneciente a su obra de diez volúmenes *Agricultura general y gobierno de la Casa de Campo* (Valencia 1765-1795), donde escribe sobre la vid y el vino.

Las técnicas de vinificación *champenoise* se encuentran descritas más ampliamente en las obras de dos principales enólogos catalanes: Francesc Carbonell i Bravo, farmacéutico, doctor en medicina, y químico autor de varios artículos publicados en una revista *Memorias de Agricultura y Artes* que publicó la Junta de Comercio entre 1815 y 1821; 20 artículos se compilaron en el libro *Arte de hacer y conservar el vino* (Barcelona 1820). Es Emili Giralt quien considera a Francisco Carbonell y Bravo uno de los dos principales enólogos del primer tercio del siglo XIX en Cataluña. El otro fue Josep Roura, discípulo suyo que escribió *Memoria sobre los vinos y su destilación* (Barcelona 1839). También circulaban impresas en revistas y publicaciones, durante todo el siglo XIX, recetas que prometían la obtención de vino espumoso ácido y picante como el champaña. Estas recetas aconsejaban añadir al vino unas porciones de aguardiente y de jarabe, unas determinadas cantidades de bicarbonato de sosa y de potasa, y ácido cítrico o tartárico con el fin que desprendiera gas carbónico.

Por tanto, los dos procedimientos empleados en Cataluña amparados por los enólogos catalanes para elaborar espumosos eran el método tradicional de la Champaña y también la inyección de gas carbónico a un vino de más o menos calidad. Los dos fueron puestos en práctica por vinicultores y comerciantes de vino del país, pero parece que este último método fue el primer camino que siguieron los vinateros catalanes. En 1886 el farmacéutico de Tarrasa Bonaventura de Casteller publica la segunda edición de *Viticultura y enología españolas* donde se declara un gran partidario del vino gaseado, aunque estos vinos no ganaron nunca ningún premio en esa época. Sin embargo el método tradicional también tuvo grandes defensores durante el siglo pasado: el médico de Vic Joaquim Salarich, el catedrático de química Magin Bonet i Bonfill, el químico e ingeniero industrial madrileño Luis Justo y Villanueva y muchos propietarios de viñas, enólogos y elaboradores de vino que fueron los precedentes de la actual industria del cava. Magin Bonet i Bonfill escribió *De la fermentación alcohólica al zumo de uva* en 1857 y una nueva edición en 1860 <http://bdh-rd.bne.es/viewer.vm?pid=d-1856500> Describe todo el método tradicional, desde la selección del vinos hasta los tapones de corcho, pero debido a su carácter científico tuvo una difusión escasa entre los vinicultores.

Una persona muy importante que impulsó la industria del vino espumoso en Cataluña, gracias a su labor divulgativa y como formador de los primeros champañistas, fue Justo Villanueva. Este ingeniero madrileño dirigió el laboratorio del *Institut Agrícola Català de Sant Isidre*, entre 1861 y 1876. Aquí se impartieron unos cursos de química aplicada a la agricultura donde se incluía la fabricación de champaña con sus correspondientes prácticas enológicas. Sus discípulos fueron los fundadores de las primeras grandes bodegas para la producción de cava en Cataluña. En estos cursos se enseñaba una metodología de trabajo para una perfecta vinificación. Justo decía que “es un problema tan matemático, exige tantas minuciosidades, que en fallando cualquiera de ellas, al cabo de tres años nos encontramos con un resultado negativo, y por lo tanto es el problema con cuya resolución puede estudiarse mejor la fabricación de vinos” (texto sacado del libro de Emili Giralt). No era partidario de los vinos de imitación sino de vinos de calidad ligados a su propia tierra. Él afirmaba que no se podría elaborar nunca un auténtico champaña aunque se importaran las variedades de allí, igual que si con las variedades de aquí se elaborara como allí. Lo que hicieron algunos viticultores catalanes fue intentar aclimatar variedades procedentes de la Champaña como Francesc Gil de Reus, Agustí Vilaret de Balnes y Miquel Esquirol de Vilanova y la Geltrú. Otros viticultores seleccionaron variedades autóctonas como Manuel Raventós, de can Codorniu a quien se le debe la base del cava del Penedés: el cupage de la variedades Macabeu, Xarel·lo y Parellada.

### 2.1.3 Los primeros elaboradores

En la segunda mitad del siglo XIX surgieron los primeros concursos de vinos como método para promocionarlos (Peñin, 2008). La primera exposición que a Emili Giralt le consta que se exhibieran vinos espumosos catalanes se celebró en Madrid en 1850 y el producto considerado por el jurado “una feliz imitación del champaña” fue de un terrateniente de Tarrasa, el industrial Antoni Galí i Comas. Posteriormente en 1857, en la Exposición General celebrada en Madrid queda constancia de otros dos elaboradores más, Francisco Campuzano, de Villaviciosa de Odón presentando un espumoso fabricado por el sistema de vino de Champaña y el *baró de les Quatre Torres*, de Tarragona con un vino parecido al *cremant*. En 1859 l’*Institut de Sant Isidre* organizó la exposición Agrícola donde de 106 expositores de vinos, dos presentaron vinos espumosos, el *baró de les Quatre Torres* y Agustí Costa, de *Sant Vicenç del Horts (baix Llobregat)* pero no obtuvieron ningún premio.

En 1862, en la segunda Reunión Agrícola en Reus, no se presenta ningún vino espumoso y queda palpable la falta de un espumoso catalán. En 1863 el reusense Francesc Gil i Borràs se propuso estudiar los vinos para poderlos embotellar, algo que no se había hecho en esa época en toda Cataluña. Con este objetivo se asoció con Domènec Soberano i Mestres (Soberano y Cia) expidiendo

algunos vinos en 1866 que se vendieron en el primer establecimiento de vinos embotellados abierto en Barcelona por Antoni María Llobet.

En la Exposición Universal de París en 1867, las casas Soberano y Cia, Antoni Maria Llobet y Cia, Joaquin Pedrosa i Castell del Mas (viticultor de Esparraguera) y el comerciante Josep Mestre i Abella (colaborador de Justo) fueron las cuatro únicas empresas catalanas que participaron presentando vinos espumosos.

Entre 1868 y 1874 hay un crecimiento interior de los vinos espumosos y una proyección exterior.

En septiembre de 1871 se organizó una Exposición General Catalana donde Soberano y Cia tuvo derecho a una mención especial “por su imitación del champaña”.

En la Reunión Agrícola de 1872 convocada por el Instituto de San Isidro solamente se mencionaron como elaboradores de espumosos los reusenses Soberano y Cia y Francesc Gil (ya se habían separado) y Agustí Vilaret de Blanes, siendo el espumoso de Francesc Gil el mejor. En este mismo año bajo las directrices de Justo en una cava construida en el subterráneo del domicilio en la calle Gerona (Barcelona) de la familia Codorniu, su propietario Josep Raventós junto con el otro discípulo de Justo, el vilanovense Miquel Esquirol, comenzaron los primeros ensayos de la elaboración de vino espumoso.

La consolidación de la industria llega a finales del siglo XIX con la obra de Manuel Raventós i Domènech que desde 1885 continuó el trabajo de su padre.

Como síntesis según Agustí Vilaret, los protagonistas de la primera etapa de elaboración de espumosos con interés en su comercialización fueron por este orden: Domènec Soberano y Francesc Gil, los dos de Reus, y Agustí Vilaret de Blanes. Unos años más tarde se incorporó Miquel Esquirol, de Vilanova i la Geltrú y Josep Raventós de Sant Sadurní d'Anoia. Todos ellos actuaron según las enseñanzas de Luis Justo y Villanueva. Las cavas supervivientes de estos primeros elaboradores son Mont-Ferrant y Codorniu.

#### **2.1.4 Reglamentación del cava (Mestre i Raventós y Solé i Bordes 1998)**

Las primeras referencias a los vinos espumosos se encuentran en el antiguo estatuto del Vino de 1932. En este primer estatuto, la Administración, deja el método de elaboración en las manos de los productores que actuaban individualmente y que perduró hasta los años cincuenta de una forma caótica e insostenible. En este estatuto sólo hacía referencia a:

## Artículo 2

d/ Vinos espumosos, los que tienen anhídrido carbónico producido en el seno de los vinos por una segunda fermentación alcohólica en envase cerrado, ya sea espontánea o producida por el método clásico de estas elaboraciones o variantes.

e/ Vinos gasificados, aquellos a los que se añade anhídrido carbónico después de haber sido elaborados definitivamente.

## Artículo 8

En la elaboración, conservación y crianza de vinos, mostos y mistelas y demás bebidas alcohólicas definidas en la presente disposición serán permitidas únicamente las prácticas de operaciones y adición de las sustancias siguientes:

22. En los vinos espumosos se empleará azúcar en la preparación que requiera el llamado licor de expedición.

En España el uso de nombres como Champaña y Xampany en Cataluña acaba con El Arreglo de Lisboa relativo a la Protección de las Denominaciones de Origen y su Registro Internacional (en adelante llamado “el Arreglo de Lisboa”) que se adoptó en 1958 y que fue revisado en Estocolmo en 1967 (<http://www.wipo.int/lisbon/es/general/>), donde se reconocían la protección de los nombres geográficos y entre otros muchos el de “Champagne”. A este acuerdo también se adhiere España y entra en vigor el 25 de septiembre de 1966 siendo administrado por la Oficina Internacional de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), que mantiene el Registro Internacional de Denominaciones de Origen y publica el boletín titulado “Las denominaciones de origen”. También el 27 de junio de 1973 en Madrid se ratifica un Convenio entre el Estado Español y la República Francesa contra la competencia desleal a los productos naturales o fabricados y en especial sobre la protección de las denominaciones de origen ([http://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=BOE-A-1975-9284](http://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-1975-9284)).

Por tanto había que encontrar un nombre nuevo que no fuera el de espumoso porque estaba relacionado con vinos espumosos de baja calidad. Como en la denominación de origen Penedés que se creó el 28 de junio de 1958 y se aprobó su reglamento el 25 de mayo de 1960, no se decía nada sobre vinos espumosos, estos no quedaban amparados por esta DO. Tampoco los elaboradores de vinos espumosos quisieron alinearse con la DO Penedés así que en una Orden del 2 de julio de 1959 (B.O.E. número 185, del 4 de agosto de 1959) se dieron las primeras normas sobre vinos espumosos y vinos gasificados y también por primera vez se utilizó en un documento oficial la palabra “Cava”.



Como este nombre todavía no poseía la etimología que más tarde la hará definitoria de una clase de vinos espumosos, en las etiquetas se especificaba “Vino espumoso” o “Vino gasificado” según cada caso, ya que eran las únicas definiciones que admitía el Estatuto del Vino. También según esta Orden, previa solicitud al Servicio Central de Defensa Contra Fraudes, los elaboradores podían hacer figurar en sus etiquetas como subtítulo el tipo de elaboración: “Criado o elaborado en Cava”, “Elaborado en tanques o cubas de fermentación cerrada” u otro similar.

Durante estos años por la falta de autoridad y “la picaresca nacional” la mayoría de los elaboradores de vinos espumosos habían dejado de producir por el método tradicional ya que resultaba más costoso y el mercado se llenó de fraudes (vinos gasificados artificialmente).

Hasta que no se promulgó una nueva Orden del 12 de enero de 1966 (B.O.E. núm. 15 del 18 de mayo de 1966) con la que se aprueba la “Reglamentación de Vinos Espumosos y Gasificados” no se aplicó el nombre genérico de Cava. Fue en su artículo 5 donde se definió la palabra Cava, para caracterizar los vinos espumosos elaborados por el sistema clásico de fermentación en botella y envejecimiento en cava, pero no fijaba el límite del tiempo de crianza. Un contencioso administrativo mantuvo prácticamente sin efectividad esta Orden hasta el 27 de enero de 1969 cuando se dio a conocer la sentencia del tribunal supremo. Para reglamentar estos vinos se publica una nueva Orden del 23 de abril de 1969 (B.O.E. núm. 104 del 1 de mayo de 1969) donde se realizan algunas modificaciones del contenido de la Orden del 12 de enero de 1966 como que los locales destinados a la elaboración, etiquetado y almacenado de vinos espumosos debían de estar separados de cualquier otro local donde se elaboraran o almacenaran vinos espumosos obtenidos por otros sistemas de fabricación.

Con la promulgación de la ley 25/1970 del 2 de diciembre (B.O.E. núm. 291, del 5 de diciembre de 1970) se creaba el “Estatuto de la Viña, del vino y de los alcoholes” substituyendo al antiguo Estatuto del Vino (Ley del 26 de mayo del 1933). Esta ley no entró en vigor hasta que no se aprobó su reglamento por el Decreto 835/1972, del 23 de marzo (B.O.E. núm. 87, del 11 de abril de 1972). A partir de este Reglamento en sus artículos 96 y 97 quedaban reglamentados los vinos espumosos como una Denominación Específica por el método de elaboración, y en la Disposición Final Segunda se decía: “La Junta de *Vins Escumosos* creada por el Orden del Ministerio de Agricultura del 23 de abril de 1969, queda integrada en el Instituto Nacional de Denominaciones de Origen y se llamará de ahora en adelante *Consell Regulador de Vins Escumosos i Gasificats*” (Mestre i Raventós y Solé i Bordes, 1993).

En la Orden del 27 de febrero de 1986 se establece la reserva de la Denominación “Cava” para los vinos espumosos de calidad elaborados por el método tradicional en la región que allí se determina,

concretamente en su anexo, se determina la zona de producción de la Región Determinada del Cava y que actualmente está definida en el vigente Reglamento del Cava.

La incorporación de España a la CEE el 1 de enero de 1986, supone el reconocimiento del Cava como Vino Espumoso de Calidad Producido en una Región Determinada (V.E.C.P.R.D.), categoría en la que se agrupan todos los vinos espumosos de primera categoría o máxima calidad y que se equiparan a las Denominaciones de Origen y supone, el reconocimiento de la CEE, de que únicamente se puede elaborar Cava en el Estado Español y siempre que sea dentro de la llamada “región del Cava” (<http://www.institutdelcava.com>).

Como paso necesario posterior a la incorporación de España a la CEE y el reconocimiento del Cava como un vecprd, en 1991 se publica la Orden Ministerial de 14 de noviembre de 1991 que aprueba el actual vigente reglamento de la Denominación de Origen “Cava” y de su Consejo Regulador.

Esta es la norma básica que junto con la Orden Ministerial de 23 de febrero de 2007 que lo modifica parcialmente y la Ley 24/2003 de 10 de julio de la Viña y del Vino, regulan actualmente el sector del Cava (<http://www.institutdelcava.com>).

Recientemente la UE ha pretendido ordenar los vinos de calidad protegidos por diferentes tipos de nomenclaturas aplicadas en los países vitivinícolas tradicionales como España, Francia e Italia. Desde este punto de vista, en España existían los vinos de Denominación de Origen (DO) y los de Denominación de Origen Calificada (DOCa), en Francia, los vinos de *Appellation d’Origine Controlée* (AOC) y los de *Delimites de Qualité Supérieure* (VDQS), y en Italia, los vinos de *Indicazione Geografica Tipica* (IGT,) *Denominazione di Origine Controllata* (DOC) y los de *Denominazione di Origine Controllata e Garantita* (DOCG). El consumidor debía ser un gran experto en vinos para entender las diferencias. Al mismo tiempo, los productores europeos de otros muchos productos agrícolas estaban solicitando que también se aplicaran niveles de calidad diferenciada, es decir, que se extendiera a otros muchos alimentos los conceptos de denominación de origen e indicaciones geográficas de los vinos. Por esta razón, la UE decide unificar las nomenclaturas de todos los posibles productos agrícolas en dos niveles de calidad: Denominación de Origen Protegida (DOP) e Indicación Geográfica Protegida (IGP). A este respecto elaboran en 2008 y 2009 el nuevo reglamento (Reglamento (CE) nº 110/2008 y Reglamento (CE) 491/2009 (DOUE L 154 de 17/06/2009)), en el que se definen ambos niveles de calidad y se recoge el listado de productos que reciben alguna de estas calificaciones. La diferencia fundamental entre ambas calificaciones estriba en que la DOP, todas las fases de producción e ingredientes deben estar suscritos a la zona geográfica delimitada por la calificación, mientras que en la IGP, alguno/s de las fases productivas o ingredientes pueden pertenecer a un lugar fuera de la zona geográfica definida.

## 2.2 Elaboración de vinos espumosos

Genéricamente hablando, los vinos espumosos son un tipo de vino que contiene dióxido de carbono disuelto. Sin embargo, cuando el CO<sub>2</sub> es exógeno, añadido de una manera continua al vino que se ha estabilizado y enfriado a -2°C y en una cantidad insuficiente para formar espuma se considera vino efervescente (vino de aguja, *vinho verde*, *frizzante*, *pétillant*). Estos vinos carbonatados pertenecen a una categoría inferior, en cuanto a rango de precio y calidad. De acuerdo con la terminología de la Unión Europea (6.6.2008 Diario Oficial de la Unión Europea L 148/47), se les llama vinos “efervescentes” o en función de la presión de CO<sub>2</sub> “vinos espumosos gasificados”. El término “vino espumoso” está reservado para los vinos cuyo dióxido de carbono procede exclusivamente de la fermentación (por lo tanto, de origen endógeno) y cuya presión da lugar a espuma. Hay dos subtipos específicos en estas categorías de vinos europeos: “vinos espumosos de calidad” y “vinos espumosos aromáticos”. La primera categoría se caracteriza por tener presiones de dióxido de carbono de no menos de 3,5 bares a 20° C. La segunda categoría incluye vinos “cuvée”, derivados de variedades de uva específicas. Otras categorías como los vinos de aguja y vinos de aguja gasificados, cuyas presiones de dióxido de carbono se encuentran entre 1 y 2,5 bares, se producen con orígenes endógenos y exógenos del dióxido de carbono respectivamente (Buxaderas y López-Tamames, 2012)

Los vinos espumosos más prestigiosos son los europeos, ya sea por su origen, tradición histórica, o su elevada producción. Los más famosos del mundo incluyen Champagne y Crémants de Francia, Cava de España, Prosecco de Italia, Sekt de Alemania, Cap Classique de Sudáfrica y Icewine de Ontario.

### 2.2.1 Métodos de elaboración de los espumosos de calidad

Sea Cava, Champagne, Sekt etc., el vino espumoso es un peculiar producto obtenido a partir de la combinación de variedades adecuadas, con los azúcares y levaduras necesarios para producir una segunda fermentación y al cual, una maduración y posterior eliminación de las lías lo prepara para el consumo (Buxaderas y López-Tamames, 2003; Daban, 2005). Existen varios métodos de elaboración:

*Método ancestral.* Éste fue probablemente, el primer método desarrollado para la elaboración de vinos espumosos. Empieza con la elaboración del vino base mediante las técnicas clásicas de elaboración de vinos tranquilos, a media fermentación. En la segunda fase se transforma este vino, que todavía contiene azúcar residual procedente de la uva, en vino efervescente o espumoso. La fermentación secundaria o toma de espuma se produce en las botellas sin adición de azúcar (sin licor de tiraje o de expedición), y se detiene el proceso simplemente eliminando las levaduras. El sedimento es insignificante en volumen y no hay degüelle. Con este método, la acción de las levaduras nativas y de los inóculos se controla o detiene por eliminación de los nutrientes del medio,

una disminución de la temperatura, filtración o adición de dióxido de azufre (Daban, 2005) (Figura 2.1). Los espumosos más famosos elaborados mediante este método en Francia son el Bugey (mínimo 2 meses en botella) y el Ayze.

*Método Champenoise, Clásico o Tradicional.* Es el método de elaboración de espumosos más conocido y el único aceptado para el cava. El vino obtenido es un espumoso natural, en el que la elaboración y la crianza se hacen íntegramente en la misma botella por introducción de vino base, levaduras y azúcares necesarios para desencadenar la segunda fermentación. La extracción de las lías deja el vino a punto para su consumo, directamente en la misma botella donde empezó el proceso meses antes. El espumoso más famoso elaborado mediante este método en España es el Cava, cuya crianza debe ser como mínimo de 9 meses. En Francia el Champagne, cuya crianza debe ser como mínimo de 15 meses entre el tiraje y el degüelle; Champgane Millesimé con un mínimo de tres años después de la fecha de vendimia; Crémant de Borgoña, de Alsacia, de Burdeos, de Limoux, que debe permanecer 9 meses en botella; Crémant del Loira mínimo 12 meses en botella; Clairette de Die 9 meses en botella; Blanquette de Limoux con un mínimo de 9 meses en botella; otros espumosos franceses muy conocidos son: Gaillac Mousseux, Saumur Mousseux, Saint-Pourçain, Cheverny, Montlouis, Seyssel (mínimo tres años de crianza en cava), Crémant del Jura. En Italia: Spumante Classico y Astis secos. En Alemania: Flaschengärung Nach Dem Traditionellen Verfahren. En Mónaco: Crémant de Mónaco.

*Método Champenoise-Milispark.* Inventado por un español, pero llevado a la práctica por ingenieros y químicos de la empresa americana Millipore, es un proceso con las mismas fases y condiciones que el método tradicional, pero con variaciones considerables en las operaciones de removido y degüelle. Para el tiraje del vino base, el azúcar se introduce en las botellas en sus cantidades correspondientes, pero las levaduras que ocasionan la segunda fermentación van contenidas en el interior de un cartucho que a la vez, va unido al tapón donde permanecen durante toda la fase de rima. Durante el periodo de segunda fermentación y crianza las levaduras siempre están en el cartucho, ya que éste contiene en su interior una serie de membranas y filtros permeables al vino, e impermeables a la salida de las células y sus restos. De esta forma, el vino circula a su través sin enturbiarse. Llegada la operación del degüelle, el tapón saltará con los restos de levaduras en su interior y el vino permanecerá limpio. Según varios estudios y análisis sensoriales, en los espumosos jóvenes da buen resultado, pero en los de larga crianza, una mayor superficie de contacto entre las levaduras sin encapsular y el vino proporciona un carácter más marcado y una crianza más completa y compleja (Muñoz y Ávila, 2000; Daban, 2005).

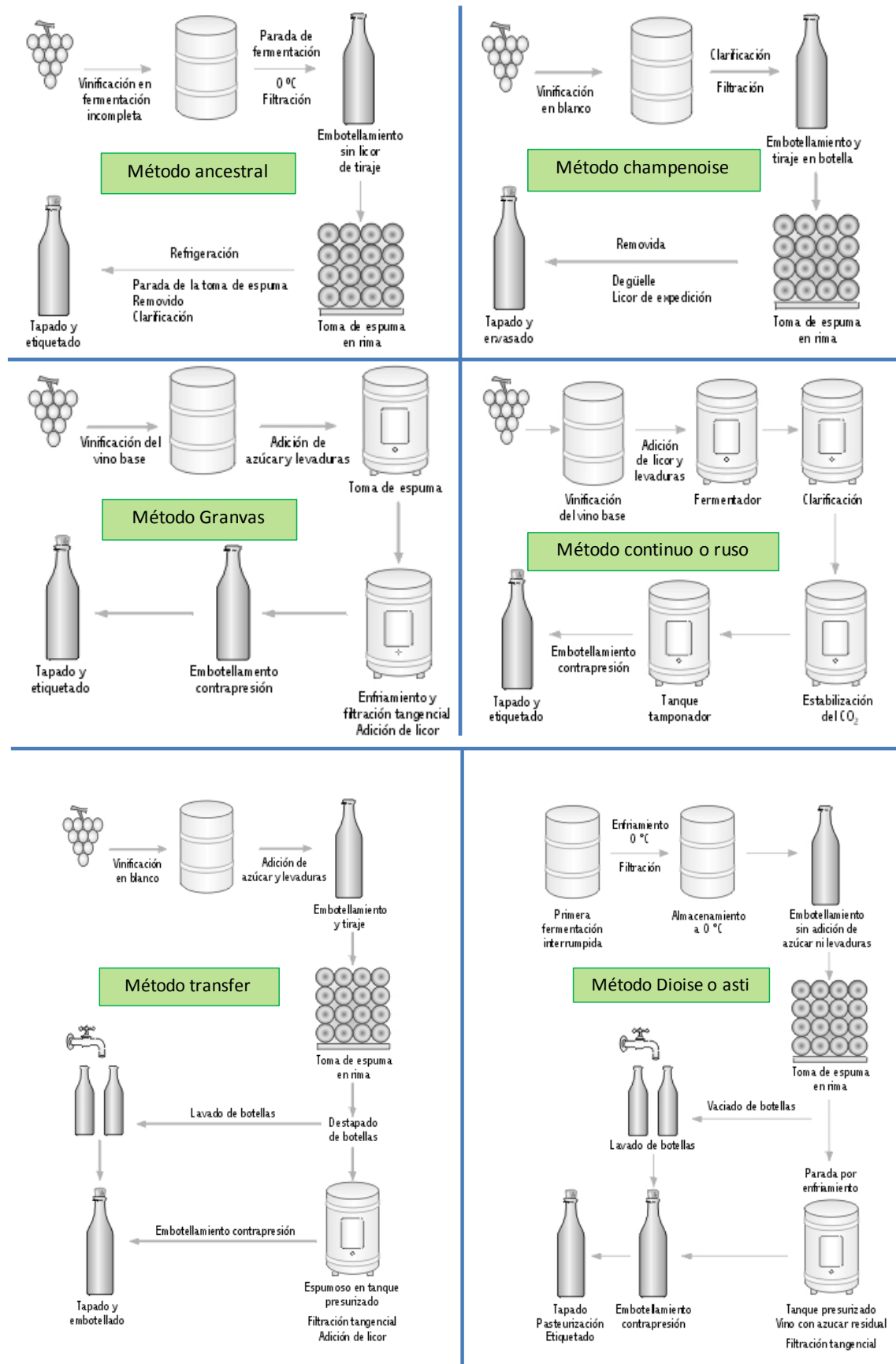


Figura 2.1: Diferentes métodos de elaboración de vinos espumosos. Diagramas adaptados de Daban 2005.

*Método transfer.* En este método inventado en Alemania, el vino base se elabora mediante las técnicas de vinificación en blanco tradicional. La transformación del vino tranquilo en espumoso por la segunda fermentación o toma de espuma se hace, como en el método tradicional, en las botellas en posición de rima, normalmente durante un período menor de tiempo que en el método tradicional (un mínimo de dos meses). No obstante, no hay operaciones de removido y degüelle. Las botellas se vacían por sifonaje directo y el vino se mantiene bajo presión en grandes tanques isobáricos. Se filtra, también bajo presión, y retorna a los tanques, donde se le añade el licor de expedición. Este vino es transferido de nuevo a las botellas con su contenido original de gas, en un proceso realizado a contrapresión. Las botellas se tapan y anillan inmediatamente. Las etiquetas de estos vinos deben incluir la frase «fermentado naturalmente en botella», en el idioma que corresponda (Muñoz y Ávila, 2000; Daban, 2005).

*Método de la cuba cerrada, Granvás o gran envase.* Otras denominaciones, según el país productor: Grand vas, Charmat, Cuvée close o Método continuo. Este método, que tiene su origen en la segunda mitad del siglo XIX y ha sido varias veces modificado y perfeccionado por técnicos italianos y fue puesto a punto en 1907 por un ingeniero francés, Jean-Eugène Charmat. El método comprendía 8 fases sucesivas, y en torno a los años treinta fue perfeccionado gracias a la disponibilidad de autoclaves de acero. Se deposita el vino en un tanque sellado donde se mantiene a 20° C de 12 a 16 horas. Seguidamente, se pasa a otro tanque donde se le añade el azúcar y la levadura y se deja fermentar de 10 a 15 días. Después, se traslada el vino a otro tanque, donde se clarifica por refrigeración (2° C) y, finalmente, se filtra a contrapresión y se embotella. Desde la siembra de las levaduras hasta su comercialización han de transcurrir un mínimo de 21 días. Este método se utiliza sobre todo para los vinos espumosos dulces Asti y Proseccos italianos, en los cuales el método se prolonga más días y por eso recibe el nombre de *charmat lungo* (Muñoz y Ávila, 2000; Daban, 2005). Los espumosos más famosos elaborados mediante este método en Italia son el Asti Spumante, Prosecco Spumante y Spumantes regionales nativos. En Alemania el Deutscher Qualitätsschaumwein o Deutscher Sekt Bestimmter Anbaugebiete.

*Método dioise.* También denominado rural, *gaillacoise* y *propieétaire*. Es, según se afirma, el más antiguo de la historia de los vinos espumosos, ya que hay datos de su introducción por los romanos cuando conquistaron las Galias (Muñoz y Ávila, 2000). Se considera que comprende el método ancestral y utiliza elementos del transfer. El principio básico es el mismo que en el ancestral: todo el azúcar proviene de las uvas. Se parte de un mosto parcialmente fermentado que contiene, como mínimo 35 g/L de azúcar, procedente de uvas dulces tipo moscatel. La fermentación en botella se realiza sin añadir licor de tiraje, durante un tiempo mínimo de cuatro meses, y el primer taponado (tiraje) de las botellas no puede tener lugar antes del primero de enero siguiente a la vendimia. La

eliminación de las lías se hace por filtraje isobarmétrico, ya sea de botella a botella, o trasladando el contenido a recipientes de unificación y filtración similares al transfer. Los mostos no deben permanecer en estos recipientes más de 10 días y la temperatura no debe sobrepasar los 4°C (Muñoz y Ávila, 2000). En este método está prohibido el uso de licor de expedición, ya que son vinos muy ricos en azúcar. El frío y los procesos de filtración son los dos mecanismos usados para controlar la acción de las levaduras. El contenido final de alcohol es de 9,5 % vol. y el azúcar residual de unos 50 g/L. Por este método se elaboran los espumosos en Francia: vino de Blanquette y vino de Limoux; Clairette de Die; Gaillac Mousseux.

*Método continuo o ruso.* La elaboración de vinos base se hace siguiendo las técnicas clásicas de vinificación en blanco, rosado o tinto. La segunda fermentación es un proceso lento y continuo. Después de la adición de azúcares y levaduras, el vino circula por una serie de tanques de fermentación, con anillas o piezas de roble sobre las que se absorben las levaduras y fermentan el azúcar del vino que circula a través de los tanques. A la salida de esta serie de depósitos de fermentación, el vino contiene sólo una pequeña cantidad de levaduras muertas, y ya es efervescente y espumoso. A la toma de espuma le sigue una fase de enfriamiento y estabilización del CO<sub>2</sub>. Antes de embotellarlo, el vino se almacena en un tanque tamponador y se embotella a contrapresión. El taponado y anillado se hace a la salida del filtro (Daban, 2005).

### **2.2.2 Método tradicional en la elaboración de Cava**

El cava es un vino espumoso de calidad producido en una región determinada que se elabora por re-fermentación de un vino base. El proceso de producción está estrechamente regulado por el Reglamento de la Denominación Cava y de su Consejo regulador aprobado por Orden 14.11.91 BOE nº 278 (20.11.91) y por sus posteriores modificaciones. La D.O. Cava incluye bodegas de diferentes regiones españolas, con gran predominio de Cataluña en cuanto a superficie cultivada y a volumen de producción. El método champenoise, clásico o tradicional es el único aceptado en la D.O. Cava.

El proceso de elaboración del cava consta de dos etapas claramente diferenciadas: la vinificación en blanco de la uva y la segunda fermentación del vino y posterior crianza (Figura. 2.2).

#### Primera fermentación

Se elabora el vino blanco, con una cuidadosa vinificación en la que sólo se prensan uvas en buen estado, y se separan las fracciones resultantes en función de la calidad del prensado. Son muy importantes los procesos de vendimia, transporte y prensado, hasta el punto que todos estos procesos y equipos están altamente regulados. Las variedades utilizadas son también objeto de regulación. El mosto desfangado se fermenta a una temperatura controlada (18 a 20 °C), y a

continuación se realizan los trasiegos, clarificaciones y mezclas adecuadas para obtener los vinos base (Figura 2.2).

### Segunda fermentación

Se realiza la segunda fermentación en una botella sellada después de añadir al vino base el licor de tiraje. Este licor se compone de 1-2 millones de células de levadura/ml, 500 g de sacarosa/l y 0.1-0.2 g de bentonita/l (para asegurar la aglutinación de las lías durante el removido), y/o compuestos de fosfato de amonio (50 ml/hl) y otros para estimular el crecimiento de la levadura. Debido a que se añaden aproximadamente 40-42 ml de licor de tiraje por cada 750 ml de vino base, cada botella recibe entre 21 y 24 g de sacarosa (Flanzy *et al.*, 1999). Es importante ajustar la cantidad de azúcar para obtener el grado alcohólico deseado, así como la presión suficiente de dióxido de carbono (5-6 atm a 20 °C) (Buxaderas y Lopez-Tamames, 2012). La toma de espuma (2ª fermentación) se produce por la desaparición del azúcar, la producción de etanol, generación de dióxido de carbono y formación de un sedimento (lías). El vino debe envejecer un período mínimo de 9 meses durante el cual se remueve periódicamente, para poder recoger los restos de levaduras en el cuello de la botella. Las fases finales incluyen el degüelle, dosificación del licor de expedición, taponado con el tapón de corcho y colocación de cápsula, alambre y etiquetado (Figura 2.2).



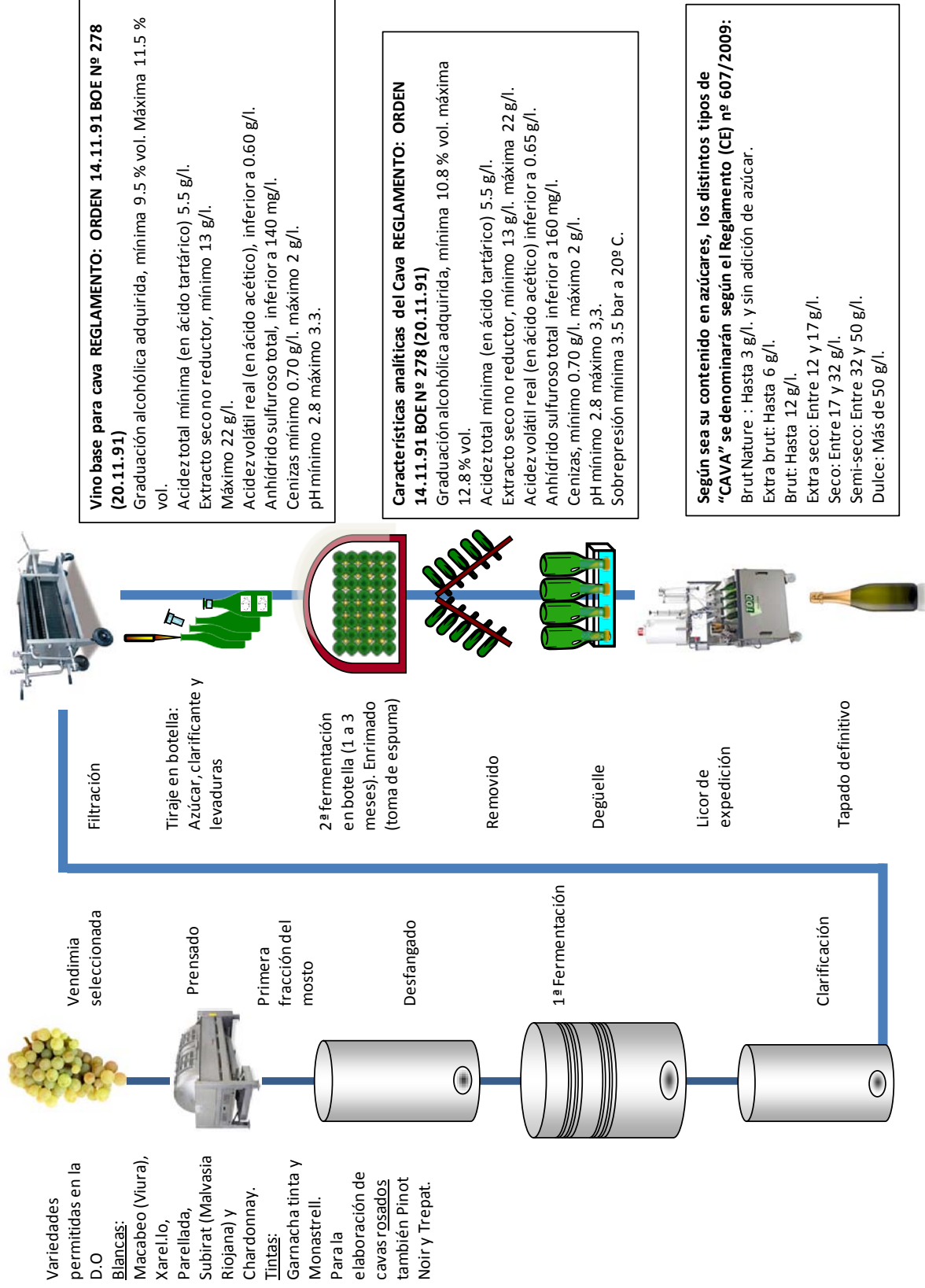


Figura 2.2: Diagrama de flujo de vinificación de espumosos en la DO Cava.

## 2.3 Características de las levaduras de segunda fermentación

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la especie clásica que se utiliza en la fermentación alcohólica. De las características de esta levadura depende en gran parte el éxito del proceso de elaboración de vinos espumosos por el método tradicional.

*Saccharomyces cerevisiae* es un organismo GRAS, reconocido como seguro y uno de los microorganismos unicelulares más estudiados. Miles de sus genes se han caracterizado y fue el primer genoma de una célula eucariota en ser secuenciado (Goffeau *et al.*, 1996). Es una levadura anaerobia facultativa que pertenece al filo Ascomycota del reino de los hongos. Su fisiología, bioquímica, metabolismo y fermentación han sido ampliamente investigados y existe una gran cantidad de información disponible. *Saccharomyces cerevisiae* está tan estrechamente asociado a los seres humanos que rara vez se encuentra en los alrededores retirados de los asentamientos humanos (Martini, 1993). De hecho, su éxito evolutivo probablemente puede explicarse por su relación con los humanos, sobre todo en la producción de bebidas alcohólicas, una actividad que el hombre desarrolla desde hace un mínimo de 7.000 años (McGovern *et al.*, 2004). Gracias también a nuestra especie, *S. cerevisiae* goza de un gran éxito reproductivo, se estima que se producen cada año unas 600.000 toneladas de levadura de panadería (Pretorius *et al.*, 2012).

### 2.3.1 Ultraestructura de *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras presentan dos envolturas celulares, la pared y la membrana plasmática. Estas envolturas rodean el citoplasma que está compuesto por el citosol y los orgánulos (Figura 2.3).

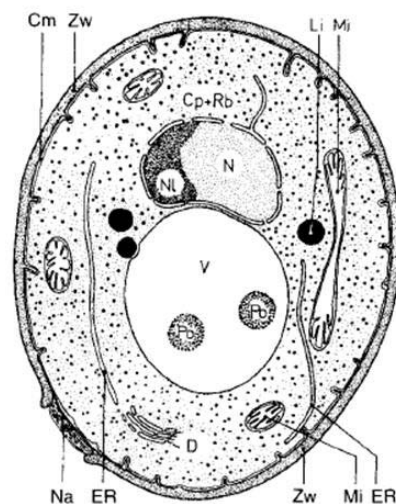


Figura 2.3: Esquema del corte transversal de una célula de levadura. Cm=membrana citoplasmática, Cp= citoplasma, D= dictiosoma, ER= retículo endoplasmático, Li= gotas lipídicas, Mi=mitocondrias, N= núcleo, Na= cicatriz de gemación, NI= nucleolo, Po= polifosfato, Rb= ribosomas, V= vacuola, Zw = pared celular.

## Pared celular

La pared celular es un orgánulo dinámico que preserva la integridad osmótica de la célula y cambia su morfología en función del estado fisiológico, proporcionando una estructura *scaffold* que permite exponer aglutinas y floculinas a otras células de levaduras (Orlean, 2012). Su composición y organización varía durante su crecimiento y desarrollo.

La pared representa entre el 15 y el 30% del peso seco de una célula de *S. cerevisiae* en estado vegetativo. El porcentaje de variación depende de las condiciones de crecimiento, estrés, mutaciones, etc. (Aguilar-Uscanga y François, 2003; Yin *et al.*, 2007; Backhaus *et al.*, 2010). Tiene un grosor de 110-200 nm, según las estimaciones hechas mediante micrografías electrónicas de transmisión y mediante el uso de microscopía de fuerza atómica (Dupres *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2011). Los principales componentes de la pared son glucanos  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 ligados, manoproteínas, y quitina, que pueden unirse covalentemente para formar complejos de orden superior. La columna vertebral de la red está compuesta por  $\beta$ -1,3-glucano creando una estructura ramificada que permite cubrir grandes áreas de la superficie celular. Tanto los  $\beta$ -1,6-glucano como algunos polisacáridos de quitina, están unidos a los extremos no reductores de los  $\beta$ -1,3-glucano. Aunque los  $\beta$ -1,6-glucanos son un componente relativamente menor de la pared celular, son muy importantes por su papel central en los enlaces cruzados *cross-linking* que la componen (Kollár *et al.*, 1997) y porque las manoproteínas están unidas a ellos mediante un anclaje al glicosil fosfatidil inositol (GPI), quedando retenidas en la pared celular. Algunas de estas manoproteínas tienen o se predice que tienen actividad enzimática, como hidrolasas o reticulantes (*crosslinkers*); otras pueden tener funciones estructurales o mediar en la "actividad social" al servir como aglutininas o floculinas (Orleans, 2012).

A través de micrografías electrónicas de secciones finas de la pared de las levaduras en estado vegetativo, se han podido observar dos capas bien diferenciadas. La exterior es electrodensa a los electrones y tiene una superficie en forma de "cepillo" (Baba *et al.*, 1989; Osumi 1998; Kapteyn *et al.*, 1999; Hagen *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2011), y se puede romper por proteolisis (Kopecká *et al.*, 1974; Zlotnik *et al.*, 1984) por lo tanto, consiste sobre todo en manoproteínas. La capa interna, más electro transparente a los electrones, es microfibrilar y  $\beta$ -glucanasa digestible, lo que indica que sus componentes principales son glucanos.

Las cantidades relativas y localización de los componentes individuales de la pared varían en función del ciclo celular o etapa de desarrollo, fase de crecimiento, las condiciones nutricionales, y el estrés de la pared impuesta por hipo-osmolaridad, pérdida mutacional de las actividades biosintéticas de la pared o proteínas de la pared, o por el tratamiento con drogas. Las variaciones en la composición de

la pared y la organización impactan en la medida en que la pared es una barrera para la exportación de proteínas que son secretadas, solubles al medio. Algunas proteínas pueden ser retenidas por la parte exterior de la membrana plasmática, en el espacio periplásmico. La función de barrera de la pared depende de la fase de crecimiento y las condiciones del cultivo, cuando las células están en crecimiento la pared es más porosa (De Nobel y Barnett, 1991). Glicoproteínas nativas tales como CTS1, así como muchas glicoproteínas solubles heterólogas con masas de hasta 400 kDa, pueden pasar a través de la pared al medio cuando las células están en la fase de crecimiento logarítmico, mientras que las paredes de las células en la fase estacionaria son menos porosas (De Nobel *et al.*, 1990; Kuranda y Robbins, 1991). La porosidad relativamente alta de las paredes de las células en la fase logarítmica podría reflejar un menor grado de reticulación, pero la disolución de material septal que se produce cuando las células en división se separan, también podría liberar proteínas de la pared al medio. Varios autores dan su propio enfoque sobre la organización de la pared como Kapteyn *et al.* (1999), Klis *et al.* (2002, 2006), Latgé (2007), Pitarch *et al.* (2008), y González *et al.* (2010). Los principales componentes de la pared son los siguientes:

**Polisacáridos:** Los polisacáridos de la pared están separados típicamente en tres fracciones definidas sobre la base de su solubilidad en álcali y ácido (Fleet, 1991). Estas fracciones contienen diferentes cantidades de glucanos ligados  $\beta$  1,3- y  $\beta$  1,6 y mananos (Magnelli *et al.*, 2002) y también difieren en la medida que los glucanos se reticulan con la quitina, esto determina su solubilidad en álcali.

**Quitina:** La quitina es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas entre sí con enlace  $\beta$  -1,4, que aporta sólo entre un 1 y 2% del peso seco de la pared de levaduras cuando no hay un grado intenso de estrés. La quitina normalmente se deposita en forma de anillo en el cuello, entre una célula madre y la célula hija, en el tabique división primaria, y en las paredes laterales de las células hijas recién separadas. La longitud media de la quitina en el septo digerido con  $\beta$ -glucanasa es de alrededor de 110 residuos de GlcNAc (Kang *et al.*, 1984) y se puede visualizar in situ mediante tinción con calcofluor blanco (CFW). La quitina se presenta en tres formas diferentes en la pared: además de quitina libre, algunas están unidos  $\beta$  1,3 -glucanos sobre todo en el cuello entre las células madre e hija, mientras que una cantidad menor, que se encuentra en las paredes laterales, está unida  $\beta$  1,6 -glucano, que a su vez está unido a mananos  $\beta$ 1,3 -glucano (Cabib y Durán, 2005; Cabib, 2009). Los niveles de quitina aumentan en respuesta al estrés (Orlean, 2012).

**$\beta$ -Glucanos:** las cadenas de  $\beta$ -glucanos comprenden entre el 30-60% del peso seco de la pared y se pueden separar en tres fracciones que contienen tanto  $\beta$ -1,3 como  $\beta$ -1,6 enlaces. La fracción

principal, que constituye alrededor del 35% del peso seco de la pared, son  $\beta$ -1,3 glucanos, ácido y alkali-insolubles, con un grado de polimerización de alrededor de 1500 residuos y cadenas laterales de  $\beta$ -1,3 glucanos ligados a cadenas laterales de  $\beta$ -1,6 glucosas que representan el 3% de todo el polímero (Fleet, 1991). Las terminaciones no reductoras de las cadenas de  $\beta$ -1,3 glucanos, se pueden vincular a la quitina, haciendo que el  $\beta$ -glucano sea insoluble (Kollár *et al.*, 1995). Una segunda fracción de  $\beta$ -glucanos que representa el 20% del peso seco de la pared, es similar en tamaño y composición que la alkali-insoluble  $\beta$ -1,3 glucano, pero esta es soluble en alkali porque no está reticulado con la quitina (Hartland *et al.*, 1994). Una tercera fracción alkali-insoluble glucano, que representa el 5% del peso seco de la pared, puede ser liberada por una extracción con ácido o digerido con endo  $\beta$ -1,3 glucanasa (Manners *et al.*, 1973; Boone *et al.*, 1990). Esta fracción son los  $\beta$ -1,6 glucanos con un grado de polimerización de 140 residuos, el cual comprende un 14 % de los  $\beta$ -1,6 residuos que sostiene una cadena lateral de  $\beta$ -1,3 glucanos (Manners *et al.*, 1973).

*Enlaces cruzados entre polisacáridos:* Se han descrito tres tipos de enlaces entre los polisacáridos de la pared. El primero es un  $\beta$ -1,4 enlace entre el final reductor de la cadena de quitina y el final no reductor del enlace  $\beta$ -1,3 glucano (Kollár *et al.*, 1995), y hasta la mitad de las cadenas de quitina en la pared pueden estar relacionados con  $\beta$ -glucano de esta manera. Debido a que existe una vinculación de aproximadamente una quitina-  $\beta$ -glucano por 8000 hexosas, estos enlaces cruzados tienen un impacto importante en la solubilidad del  $\beta$ -glucano (Kollár *et al.*, 1995). El segundo tipo de enlace se establece entre el final reductor de la quitina y el final no-reductor del  $\beta$ -1,3 glucano que se ramifica a partir del  $\beta$ -1,6 glucano (Kollár *et al.*, 1997). La configuración de estos enlaces es o bien  $\beta$ -1,2 o  $\beta$ -1,4. Los dos tipos de quitina- $\beta$ -glucano de unión se encuentran en diferentes partes de la pared. En el tercer tipo de enlace, los extremos reductores de las cadenas de glucano  $\beta$ -1,6 se pueden unir a  $\beta$ -1,3-glucano, pero la configuración es desconocida (Kollár *et al.*, 1997).

*Manoproteínas:* de la pared celular de la levadura pueden llevar asparagina con N-glucanos enlazados, O-Manno-oligosacáridos enlazados, y a menudo también un glicosilfosfatidilinositol (GPI). Los N-glucanos enlazados se pueden ampliar con una cadena exterior de 50 o más  $\alpha$ -1,6 enlaces de manosa que está ampliamente decorada con cadenas laterales cortas de  $\alpha$ -1,2-Manosa terminados en  $\alpha$ -1,3-Man. También se pueden unir a los residuos- $\alpha$ -1,2 enlaces fosfodiéster unidos a manosas. Muchas glicoproteínas también tienen glicanos O-manosil, que a menudo están presentes en tramos ricos en los aminoácidos serina y treonina.

En la Figura 2.4 se muestra la estructura y síntesis de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Después de la síntesis en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, las manoproteínas se empaquetan en vesículas y se transportan a la membrana plasmática, mientras que los polisacáridos,

tales como quitina,  $\beta$ -1,3-glucano y  $\beta$ -1,6-glucano, emergen de la membrana plasmática al espacio periplásmico. Hay que tener en cuenta que esta representación es hipotética para los  $\beta$ -1,6-glucano ya que no se conoce bien el mecanismo de su síntesis. Todos estos componentes se encuentran vinculados entre sí en la pared celular como un complejo polisacárido-manoproteínas. El recuadro muestra una representación esquemática de este complejo. En la unión de los diferentes componentes los extremos no reductores se muestran como círculos de color más claro e indican cadenas de polisacáridos de longitud indeterminada, y los extremos reductores se muestran como triángulos. La conexión entre manoproteína y los  $\beta$ -1,6-glucanos consiste en un anclaje residual de glicosilfosfatidilinositol. No se muestra la proporción de quitina celular que está libre, y tampoco las proteínas PIR, que se unen a  $\beta$ -1,3-glucano través de un enlace-alcalino lábil (Cabib y Arroyo, 2013).

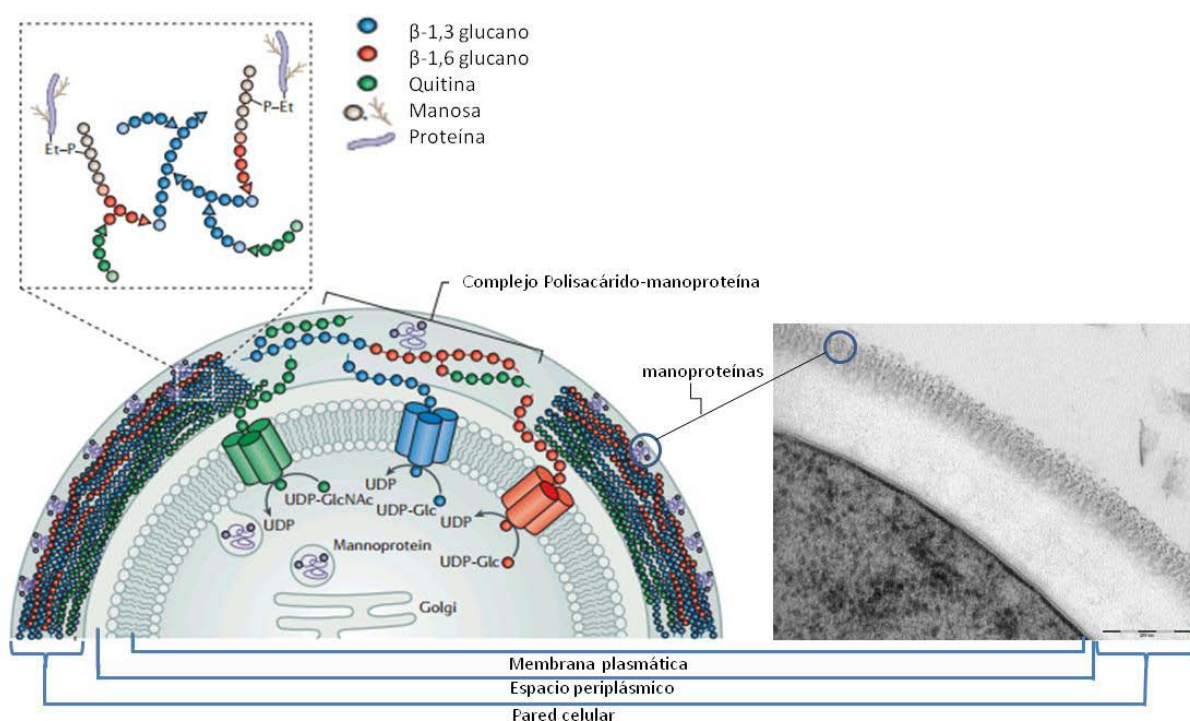


Figura 2.4: Parte izquierda estructura y síntesis de la pared de *Saccharomyces cerevisiae*. Et, etanolamina; Glc, glucosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; P, fosfato. Figura adaptada de Cabib y Arroyo, 2013. Parte derecha imagen de TEM de una sección de la pared de una levadura de cava.

### 2.3.2 Fase de toma de espuma

Cada bodega selecciona una o más especies de levaduras con las que garantizar un proceso fermentativo completo del mosto de uva, en presencia del aditivo enológico por excelencia que es el dióxido de azufre, de una acidez de alrededor de 3.5 y una temperatura, a ser posible, inferior a los

20°C especialmente cuando se trata de elaborar vino blanco. No obstante, cuando se trata de fermentar un vino en botella los factores de selección son más numerosos y estrictos.

Son tres los criterios de selección más importantes para las células de levadura: resistencia al alcohol pues deben fermentar un vino base que tiene entre 9.5 y 11.5% de etanol; pH ácido, el del vino oscila entre 2.8 y 3.3 y deben ser criofermentativas, pues deben ser capaces de acabar la fermentación a 10°C - 15°C de temperatura en bodega. Cuando la segunda fermentación se lleva a cabo, otros tipos de estrés afectan a estas levaduras, como la presión de CO<sub>2</sub> (soportan hasta 6 atm) y la ausencia de nutrientes al final de la fermentación. Todo esto provoca cambios en la composición y la morfología de la levadura. Recientemente se ha propuesto como método de selección de levaduras para llevar a cabo la segunda fermentación, la capacidad que muestren para superar el estrés de pH ácido y la alta concentración de glicerol (Borrull et al., 2015).

Para la crianza o fase de toma de espuma, las levaduras necesitan aclimatarse progresivamente. Tal y como lo definen Tai et al. (2007) es la adaptación de la levadura a uno o varios factores de estrés durante varias horas o días. Estos factores incluyen el alto contenido de etanol, pH ácido, baja temperatura, una concentración de SO<sub>2</sub> total (50-80 mg/l) y acidez total alta (5-7 g/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Otros factores propios de la segunda fermentación pueden tener un efecto sinérgico con los antes mencionados, tales como ácidos grasos de cadena media (C6-C12), ausencia de nutrientes, etc. Además, algunas condiciones durante la aclimatación de las células de levadura puede modificar su comportamiento durante la segunda fermentación, tales como la presencia de oxígeno. En consecuencia, el principal problema para los productores de vino está en preparar el starter que esté bien adaptado a estas condiciones del medio. Durante la segunda fermentación, las levaduras siguen viéndose sometidas a condiciones desfavorables, a pesar de su aclimatación previa.

La cinética de las células de levadura en la fase de toma de espuma ha sido descrita de forma precisa por Valade y Laurent (1999). Esta toma de espuma es una nueva fermentación alcohólica cuya ecuación es la misma que la primera pero produciendo además diferentes metabolitos que contribuyen al flavor (*flaveur*) de los vinos espumosos. Muchos parámetros como la temperatura, SO<sub>2</sub>, pH, y contenido el alcohol se encuentran en un umbral límite para una buena actividad de las levaduras dificultando el buen desarrollo de esta nueva fermentación. La oxigenación del vino en el tiraje interviene también en la toma de espuma, así como la presencia de gas carbónico residual, resultante de la anterior fermentación alcohólica. Valade y Laurent (1999) han estudiado el efecto de todos los factores de la toma de espuma cuya cinética general se representa en la Figura 2.5. El aumento de presión que alcanzan las botellas es de 6 bares y representa una cantidad de gas

carbónico disuelto alrededor de 12 g/l. Una toma de espuma se considera como incompleta si la cantidad de azúcar residual es superior a 2g/l.

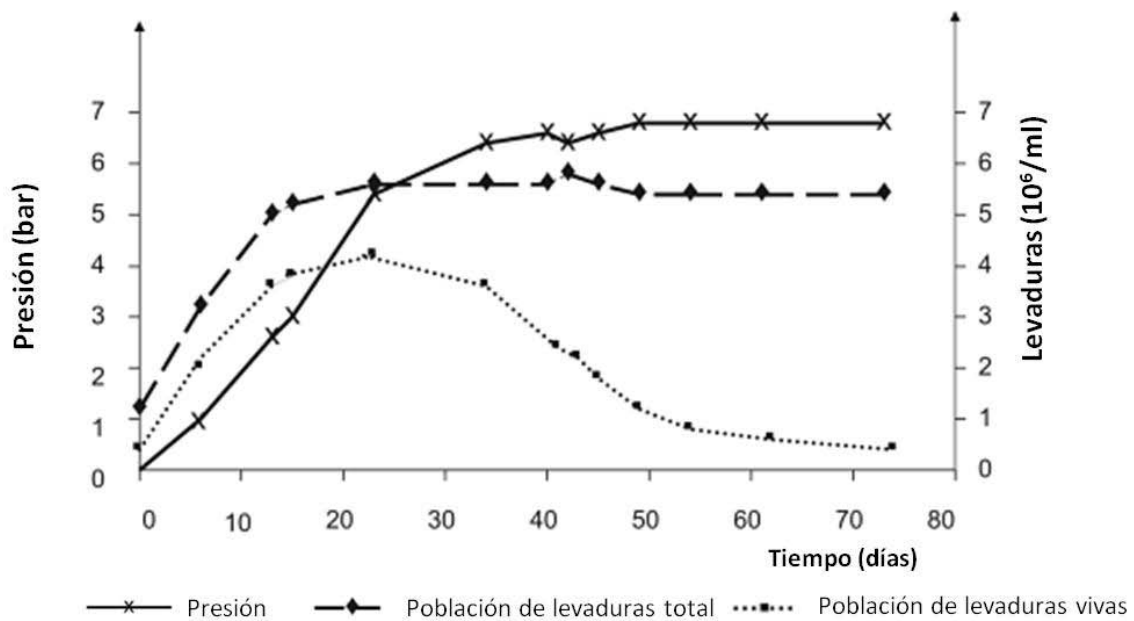


Figura 2.5: Evolución de la presión, de la población de levaduras vivas y totales a lo largo de la toma de espuma (Figura adaptada de Dutreurt, 2011).

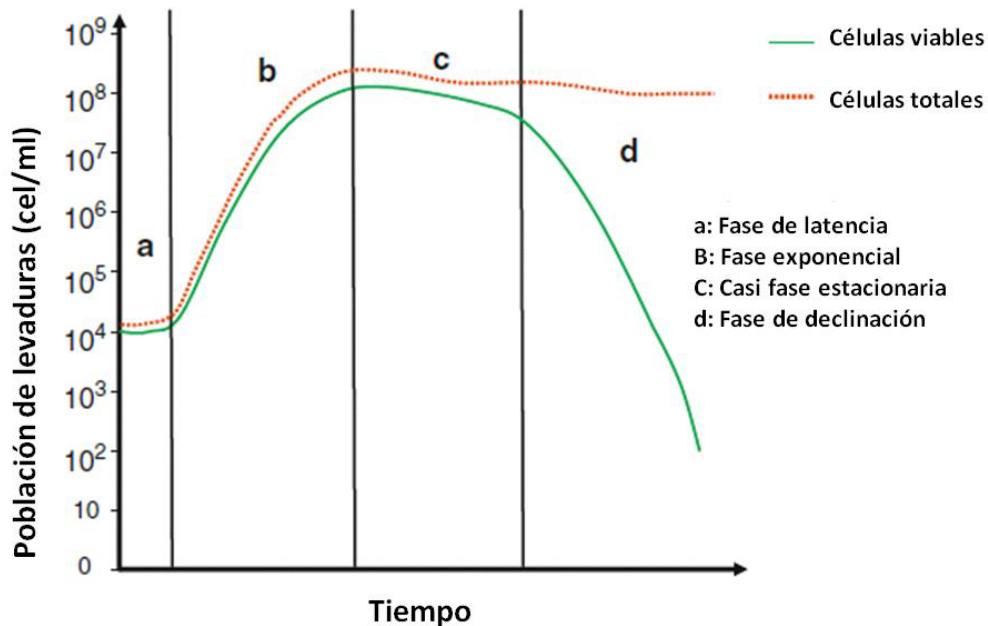


Figura 2.6: Ciclo clásico de crecimiento de la levadura bajo condiciones estándar. (Figura adaptada de Zamora, 2009)

A continuación se lleva a cabo un repaso de los factores microbiológicos y físico-químicos que actúan e influyen en el desarrollo del proceso fermentativo:



*La levadura.* La función principal de la levadura es catalizar la conversión, rápida, completa y eficiente, de los azúcares de la uva a etanol, dióxido de carbono y otros metabolitos. La Figura 2.6 muestra el ciclo clásico de crecimiento de la levadura bajo condiciones estándar (Fleet y Heard, 1993; Del Nobile *et al.*, 2003). El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos los individuos. El ciclo celular es el proceso de desarrollo de una levadura considerada de forma aislada. El intervalo para la formación de dos células a partir de una supone una generación, y el tiempo transcurrido para que esto ocurra se llama tiempo de generación. Durante cada generación, tanto el número de células como la masa celular se duplican (Madigan *et al.*, 2015). El crecimiento suele ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular. Por consiguiente, en un momento determinado en la población se encuentran células que acaban de dividirse, otras que están replicando su ADN y elongándose, otras que están iniciando la división celular, etc. La velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células o en la masa celular experimentado por unidad de tiempo.

Durante las primeras horas de una fermentación alcohólica estándar la población de levaduras no aumenta. Este período, también llamado fase de latencia, es necesario para que la célula pueda adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. La población inicial depende de varios factores. Si no se inoculan levaduras, la población es de alrededor de  $10^4$  células/ml. Sin embargo, esta población puede ser mayor si las uvas han sido atacados por la podredumbre gris u otras plagas fúngicas. Por otro lado, si se inoculó con levaduras secas seleccionadas, la población inicial es más alta (alrededor de  $5 \times 10^6$  células/ml) (Zamora, 2009). Una vez que las levaduras se han adaptado a las condiciones ambientales, comienzan a crecer. Este período, llamado fase de crecimiento exponencial está muy influenciado por la temperatura (Ough, 1964), por la concentración de aminoácidos y otros nutrientes (Lafon-Lafourcade, 1984; Sablayrolles *et al.*, 1996) y por la presencia de oxígeno (Sablayrolles y Barre, 1986). Durante la fase de crecimiento exponencial, las levaduras aumentan su población de  $10^7$  hasta  $10^8$  células/ml. Esta fase puede durar de 3 a 6 días. Después la levadura deja de crecer debido a que algunos nutrientes están en concentraciones deficientes. Durante esta nueva fase, llamada fase cuasi-estacionaria, la población de la levadura permanece casi estable y puede durar de 2 a 10 días. Más tarde, comienza el declive y la población de la levadura disminuye gradualmente hasta que desaparece casi por completo. Durante este período hay levaduras que mueren a causa de la falta de nutrientes y también porque el etanol y otras sustancias producidas durante la fermentación alcohólica, son tóxicas para ellas (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1984). La muerte de una población microbiana, igual que su crecimiento durante la fase exponencial, es normalmente logarítmica (esto es, una cantidad constante de células muere cada hora). Aunque la mayor parte de la población microbiana muere de forma logarítmica, la velocidad de mortalidad puede disminuir

después de reducirse drásticamente la población. Esto se debe a la supervivencia prolongada de células particularmente resistentes. Por éstas y otras razones, la curva de la fase de muerte puede ser compleja (Willey *et al.*, 2009).

En la segunda fermentación, cuando se añade el licor de tiraje, la levadura se deposita muy rápidamente en la cara interior de la botella que le sirve de apoyo en la rima, lo que permite un área relativamente grande de contacto entre la levadura y el vino (alrededor de 50 cm<sup>2</sup>). La proliferación de la levadura se ve severamente limitada por diversos parámetros que caracterizan el vino, y la población celular máxima no excede generalmente de 7 a 8 millones de células por ml para una temperatura de toma de espuma de 13°C. Cuando las condiciones están particularmente cerca del límite, se recomienda aumentar el nivel de siembra hasta 3 millones de células por ml con el fin de compensar la falta de la multiplicación celular y finales de toma de espuma difíciles. Después de un período de latencia muy reducida, la fase de la multiplicación celular se extiende a lo largo de varios días con una tasa de multiplicación de 2 a 3. La población de células a continuación, se mantiene durante toda la duración de la segunda fermentación. Pero antes de llegar completamente al final de la misma, la población viva disminuye y por lo tanto se vuelve menos activa bajo la influencia de ciertos parámetros que son aún más limitantes, en particular, el contenido en alcohol y la presión del dióxido de carbono que aumentan con el avance de la segunda fermentación (Figura 2.5). La toma de espuma es una fermentación alcohólica extremadamente lenta, de 15 a 30 veces más lenta que una fermentación clásica. Lo fundamental de esta toma de espuma se desarrolla entre los 20 y 30 primeros días. La levadura fermenta en este periodo alrededor de 20 g/l de azúcar, mientras que en la primera fermentación se fermentan de 170 a 180 g/l entre los 6 y 12 primeros días según la temperatura. Se realiza en botella cerrada, sin agitación. La lenta producción de gas carbónico no favorece una correcta homogenización del líquido en la botella, lo que podría permitir que todas las levaduras estuvieran en contacto con el vino como sucede en las fermentaciones tumultuosas. En realidad es la generación de calor causada por esta fermentación, lo que provoca fenómenos de convección y permite la renovación del líquido en contacto con la levadura (Duteurtre, 2010).

*El oxígeno y el CO<sub>2</sub>.* El oxígeno esencial disuelto en el tiraje es consumido durante las primeras 24 horas, mientras que el crecimiento celular puede durar una docena de días. Una presión inicial de CO<sub>2</sub> en el tiraje de 0.2 bar puede reducir un 40% el crecimiento celular comparado con un vino sin nada de gas.

*Alcohol y pH.* Al inicio de la toma de espuma el contenido en alcohol está alrededor del 10-11% vol. El aumento de este contenido es del orden de 1.3 a 1.4 % vol. en la toma de espuma, lo que fortalece su efecto inhibitor sobre el metabolismo de las levaduras. Cuanto mayor sea el contenido de alcohol

en el vino base, más dificultades pueden aparecer para llegar con éxito al final de la toma de espuma. El pH es un parámetro donde el enólogo tiene menos margen de acción ya que está ligado a condiciones de añada. Por debajo de 2.9 la toma de espuma puede no llegar a completarse, sobre todo si otros parámetros como la temperatura y el  $\text{SO}_2$  están al límite.

*El  $\text{SO}_2$ .* Este aditivo presente en el vino se encuentra en forma libre o combinada. Las propiedades antisépticas están ligadas principalmente al  $\text{SO}_2$  libre, concretamente al  $\text{SO}_2$  molecular; el  $\text{HSO}_3^-$  sería mas inhibidor de la actividad de las levaduras (Figura 2.7).

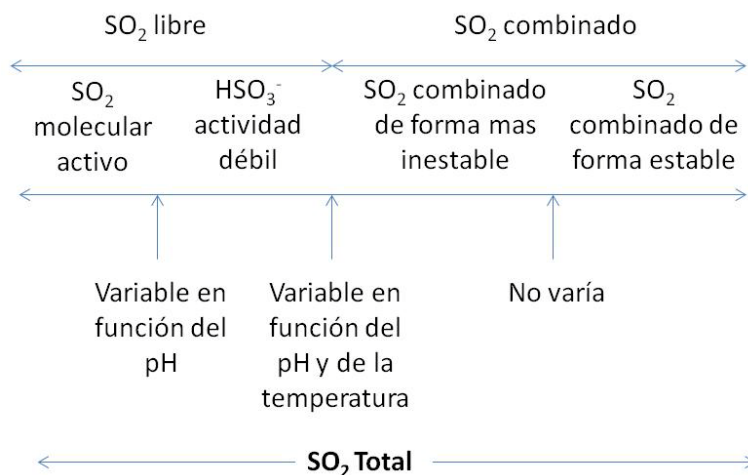


Figura 2.7: Diferentes estados del  $\text{SO}_2$  en el vino (Valade y Laurent, 1999).

Conviene conocer bien el nivel de  $\text{SO}_2$  en el vino de tiraje. Cuando hay un nivel de 10 mg/l de  $\text{SO}_2$  libre, el vino está correctamente protegido sin inhibición significativa de la actividad de las levaduras.

*Temperatura.* La temperatura en las cavas donde se realiza la segunda fermentación está generalmente comprendida entre los 10 y 15°C. Con temperaturas menores a 10°C, la toma de espuma es difícil de conducir, sobre todo si otros parámetros están también al límite. Con las temperaturas superiores a 20°C combinadas con un fuerte contenido en alcohol y un pH bajo, se produce una mortalidad muy rápida de las levaduras, lo que conlleva a tomas de espuma incompletas. Si se ha completado la toma de espuma, la conservación de estos vinos espumosos a altas temperaturas provoca un envejecimiento acelerado negativo que impide alcanzar la calidad esperada.

En un estudio realizado en las bodegas Freixenet (Figura 2.8) se ha comparado como incide la temperatura en la población de levaduras. Para una toma de espuma realizada a 23-25°C se observa un aumento muy rápido de población (3 millones de células viables en 5 días), que desciende también muy rápidamente; mientras que a 12-15 °C la población de células viables aumenta más lentamente, pero se mantiene en 3 millones hasta 30 días después del inicio de la toma de espuma

(Figura 2.8 a). El aumento de células inviables a temperaturas más altas comienza a partir de los 10 días de la toma de espuma, y para temperaturas más bajas a partir de los 35 días (Figura 2.8 b). A temperaturas altas las levaduras dejan de fermentar, manteniendo en el vino un azúcar residual de aproximadamente 5g (Figura 2.8 c).

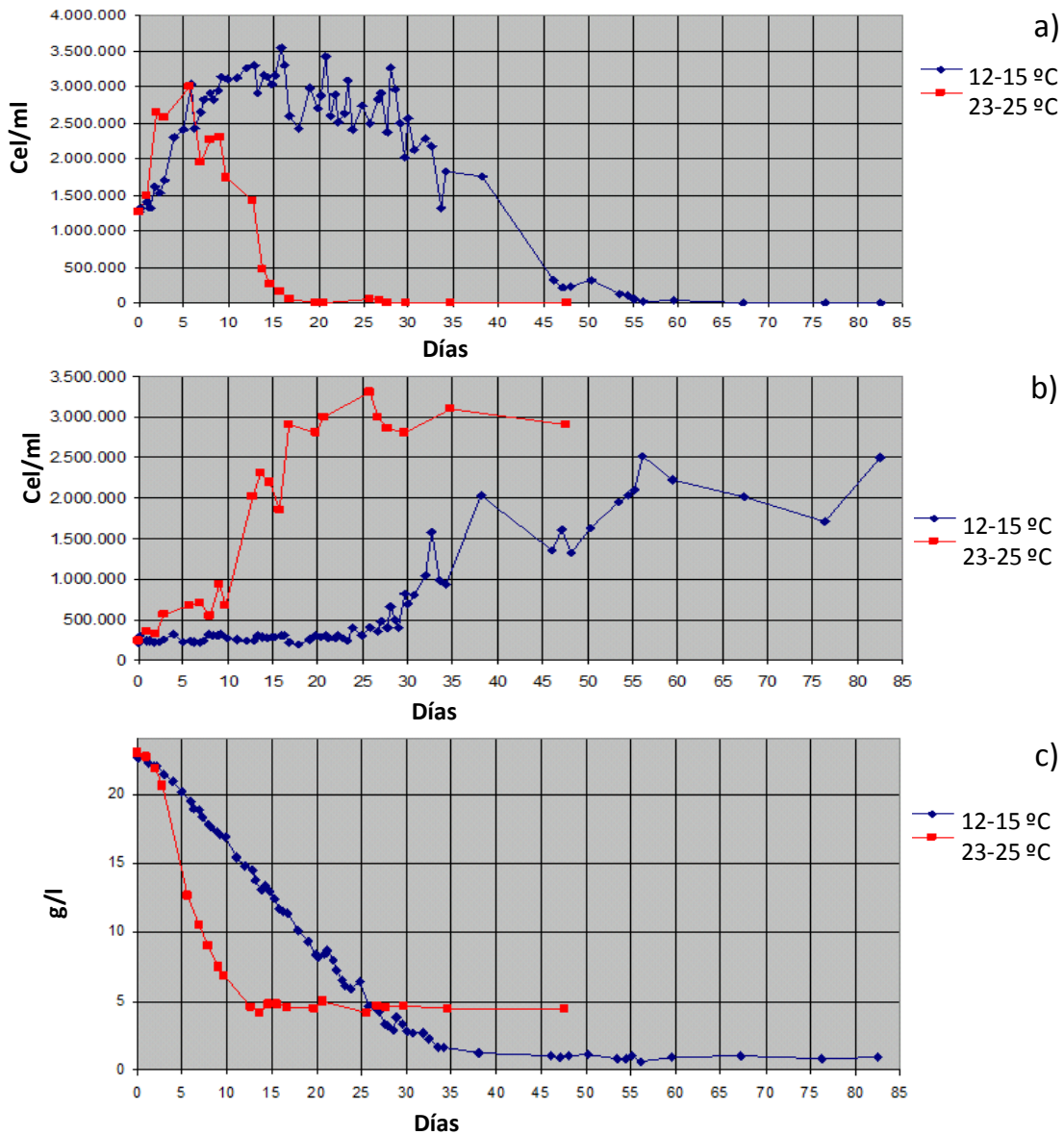


Figura 2.8: a) Contenido de células viables a diferentes temperaturas; b) Contenido de células inviables a diferentes temperaturas; c) Evolución del contenido de azúcar a diferentes temperaturas (datos cedidos por Freixenet S.A.).

### 2.3.3 Autofagia y lisis de las levaduras

Durante la fase estacionaria la levadura tiene que hacer frente a un entorno hostil y diferentes condiciones de estrés: un alto contenido de etanol, la incapacidad de las células para absorber los

nutrientes, y un alto nivel de CO<sub>2</sub>. Estos factores de estrés inducen una respuesta molecular y celular (Bauer y Pretorius, 2000): las proteínas receptoras específicas detectan esos cambios y activan vías metabólicas mediante señales de transducción, para producir una serie integrada de respuestas de adaptación y mantener la homeostasis intracelular, como cerrar ciertas vías metabólicas, movilizar nuevas fuentes de energía y acumular gotas de lípidos (*lipid droplets*) en el citoplasma (Cebollero y Reggiori, 2009; Werner-Washburne *et al.*, 1993; Sandager *et al.*, 2002). En este estado, la expresión génica reduce las tasas de transcripción y traducción (Werner-Washburne *et al.*, 1993). Esta disminución de traducción conduce a la acumulación de mRNAs en gránulos de ARN-proteína (RNP) (Buchan *et al.*, 2008). Además, se producen cambios en la maquinaria celular de los componentes internos, como el aumento en número de las mitocondrias y el cambio en su forma (Werner-Washburne *et al.*, 1993).

Una segunda respuesta celular es la inducción de la autofagia, un proceso de degradación también importante para el mantenimiento de la homeostasis celular, mediada a través de la vacuola, que permite el suministro de energía y la síntesis de los componentes esenciales para la supervivencia (Kraft *et al.*, 2009). Las deficiencias nutricionales tales como nitrógeno, en mayor grado, o una fuente de carbono, aminoácidos auxotróficos o ácidos nucleicos, en menor medida, también inducen la autofagia (Cebollero y Reggiori, 2009). Morfológicamente se pueden distinguir dos tipos de autofagia en *Saccharomyces cerevisiae*, cada uno es diferente por la ubicación y la naturaleza del proceso de secuestro. Macroautofagia se produce lejos de la vacuola, porciones de citoplasma incluyendo macromoléculas y orgánulos enteros son secuestrados dentro de vesículas de doble membrana, denominadas autofagosomas, para la descomposición y posterior reciclado en la vacuola. En la microautofagia el secuestro se produce en la superficie de la vacuola (Mijaljica *et al.*, 2007). Los procesos de micro y macroautofagia pueden ocurrir al mismo tiempo. Las células que mueren a menudo muestran características morfológicas de autofagia (por ejemplo, la acumulación de autofagosomas). Aunque la muerte celular suele ir acompañada de autofagia, sigue siendo controvertido si la autofagia promueve o previene la muerte celular. Durante la segunda fermentación, cuando las levaduras se encuentran en situaciones de hambre, se produce la disolución de orgánulos intracelulares, lo que lleva a la liberación de enzimas hidrolíticas de la vacuola al citoplasma. Se ha dicho que la autofagia contribuye al resultado de la autólisis en condiciones enológicas, y existe la hipótesis de que la autólisis podría verse afectada por el cambio en la tasa de autofagia. La autofagia puede acelerar la degradación enzimática de orgánulos, causando la liberación de compuestos que tienen una gran influencia en la calidad del vino espumoso. Por otro lado, defectos de la autofagia pueden acelerar la muerte de células, causando

una liberación más rápida de compuestos intracelulares de bajo peso molecular que influyen en las características organolépticas (Cebollero y Gonzalez, 2007).

### Muerte

Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse. El fundamento de esta definición es que si un microorganismo ha perdido la capacidad de dividirse no podrá formar una colonia sobre un medio de cultivo y no será posible detectar su presencia por los métodos microbiológicos tradicionales. Es decir, cuando no se produce aumento en el número de microorganismos no hay crecimiento. Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad metabólica que se traduzca, por ejemplo, en liberación de toxinas.

Las levaduras muertas pasan a formar parte de las llamadas lías, sobre todo de las denominadas finas. Las lías vínicas se definen legalmente como el residuo formado en el fondo del recipiente que contiene el vino después de la fermentación, durante el almacenamiento o después de tratamientos autorizados. También se incluye en esta definición el residuo obtenido por filtración o centrifugación del producto (DOUE L208 16/07/1982 reglamento UE nº337/79). Sin embargo, existe una gran diferencia entre las lías de primera fermentación y fangos de filtración respecto a las lías de la segunda fermentación. En el primer caso el residuo contiene levaduras muertas, tartratos y otras sales, y coloides inestables en un medio hidroalcohólico, mientras que en las lías de la segunda fermentación prevalecen las levaduras muertas y compuestos más o menos adsorbidos a sus paredes, como compuestos fenólicos y aromáticos entre otros.

### Autólisis

Según una definición del Diccionario Profesional del Vino (Serdio, 2015) la autólisis es la destrucción celular de las levaduras por sus propias enzimas. Desde el punto de vista enológico, la autólisis es un proceso lento en el que se produce una auto-digestión enzimática de los compuestos intracelulares de la levadura (péptidos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos) y biopolímeros de la pared celular (glucanos, manoproteínas). La ruptura de las membranas celulares y las modificaciones en la estructura de la pared celular, permite la liberación de los productos de degradación al medio extracelular. Según el tipo de vinificación la autólisis puede darse en condiciones aeróbicas y anaeróbicas como el caso de los vinos espumosos. Varios autores consideran que en los vinos espumosos la autólisis de la levadura no comienza hasta 2-4 meses después de la finalización de la segunda fermentación (Babayán y Bezrukov, 1985; Charpentier *et al.*, 1993; Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2001; Todd *et al.*, 2000; Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006).

Como consecuencia del proceso autolítico, ocurren cambios en la composición química del vino, y la influencia de los mismos en las características organolépticas, justifica el tiempo mínimo de crianza del cava (9 meses), y el largo proceso de envejecimiento de los cavas de alta gama (30 meses para los Gran reserva). Durante muchos años ha existido un gran interés en conocer el papel de las lías en la calidad organoléptica del vino espumoso. Muchos de los cambios químicos que suceden en el vino se han supuesto que están provocados por el contacto del vino con las levaduras muertas. La suposición se ha mantenido porque los cambios se explican fácilmente en una crianza biológica y por los cambios detectados en autólisis forzadas en sistemas controlados, que dan a entender que la levadura por la autólisis es capaz de conducir el cambio.

Con este interés se han realizado numerosos estudios recogidos en varias revisiones (Charpentier *et al.*, 1993; Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2001; Babayan y Bezrukov 1985; Alexandre y Guilloux-Benatier 2006) que se pueden agrupar por el tipo de metodología empleada para detectar o identificar la interacción:

- Cambios en la composición del vino espumoso a lo largo de la rima. Supone realizar análisis en el vino según dos modalidades:
  - Seguimiento del mismo vino
  - Muestreo amplio de vinos de similar envejecimiento

El inconveniente de estos estudios es que no se puede presuponer que los cambios ocurridos en el vino sean debidos sólo a la autólisis. En el caso del seguimiento del mismo vino, el tiempo de muestreo puede llegar a ser muy elevado.

- Autólisis forzada (inducida) en un medio controlado de las levaduras utilizadas en la segunda fermentación.
  - En una solución hidroalcohólica (en vino modelo)
  - En vino

Inconvenientes: al forzar la autólisis los cambios suceden muy rápido y de forma exageradamente intensa, de manera que no ha sido posible detectar muchos de esos cambios en rimas reales.

Aunque el proceso general de autólisis de la levadura puede ser válido para la mayoría de los procesos de autólisis, la natural es diferente de la inducida. El proceso de autólisis puede ser muy rápido, a partir de 48 h a 72 h, dependiendo del inductor. Existen inductores físicos (aumento de la temperatura, de congelación y descongelación alternativa, y la presión osmótica), inductores químicos (pH, detergentes y antibióticos), o inductores biológicos (aireación y falta de nutrientes). La autólisis natural, sin embargo, transcurre durante más tiempo, sobre todo en los vinos, en el que las

condiciones autolíticas (pH de 3 a 4, envejecimiento a temperatura de 15 ° C, y la presencia de etanol (12% v/v) están lejos de ser el ideal de 45 ° C a pH 5 (Alexander y Guilloux-Bernatier, 2006). Estas diferencias dan lugar a diferentes autolisados, y han sido el foco de los estudios sobre el proceso autolítico en vino (Charpentier y Feuillat, 1993; Connew, 1998).

Babayan *et al.*, (1981) proponen cuatro pasos en la autólisis de la levadura (Alexander y Guilloux-Bernatier, 2006):

- En primer lugar, se degradan las endoestructuras celulares liberando las proteasas vacuolares en el citoplasma.
- En segundo lugar, las proteasas liberadas son inhibidas inicialmente por inhibidores citoplasmáticos específicos, y se activan posteriormente cuando se degradan estos inhibidores.
- En tercer lugar, los componentes poliméricos intracelulares se hidrolizan, los productos de esta hidrólisis se acumulan en el espacio limitado por la pared celular.
- Por último, los productos hidrolíticos se liberan cuando sus masas moleculares son lo suficientemente bajas para cruzar los poros de la pared celular.

Los enzimas hidrolíticos juegan el papel más importante en la autólisis, siendo las proteasas los más estudiados de todos los enzimas implicados. Lurton *et al.* (1989) utilizaron inhibidores de proteasas específicas para demostrar que en condiciones ácidas, la proteasa A es la principal enzima envuelta en la proteólisis durante la autólisis en un sistema de vino modelo, a pesar de haber numerosas enzimas proteolíticas presentes en la levadura. Se sugirió que la actividad de la proteasa A, puede ser responsable del 80% del nitrógeno liberado durante la autólisis en condiciones óptimas. Alexandre *et al.* (2001), mediante el uso de un mutante  $\Delta\text{pep4}$  con la proteasa A eliminada, demostraron que la proteasa A era responsable del 60% del nitrógeno liberado durante la autólisis en el vino. Estos resultados sugieren que otras proteasas ácidas también pueden estar involucrados en el proceso proteolítico. Coherente con esto, Komano *et al.* (1999) y Olsen *et al.* (1999) identificaron otra proteasa ácida (proteasas Yapsin). Un estudio en vino mostró que la actividad proteolítica de la levadura aumentó seis veces después de agotarse el azúcar y que la actividad de la proteasa disminuyó cuando la autólisis de las células ya se había iniciado (Alexandre *et al.*, 2001). Esta actividad proteolítica también depende de la temperatura y el pH durante el envejecimiento (Sato *et al.*, 1997). En el vino espumoso, la actividad proteolítica disminuye durante fermentación activa en botella y en los meses posteriores, pero durante los nueve meses siguientes a la fermentación, la



actividad proteolítica intracelular aumenta considerablemente (Feuillat y Charpentier, 1982). La actividad proteolítica también puede variar dependiendo de la cepa de levadura (Leroy *et al.*, 1990).

Otros enzimas hidrolíticos son las glucanasas. La pared celular de la levadura se degrada durante la autólisis, pero pocos estudios han investigado las enzimas implicadas en este proceso durante la producción de vinos. En vinos tranquilos envejecidos sobre lías, se ha demostrado que son las glucanasas los enzimas involucrados en la degradación de la pared celular de la levadura (Arnold, 1972; Hien y Fleet, 1983). Las  $\beta$ -glucanasas, se clasifican como endo y exoglucanasas, hidrolizan los enlaces  $\beta$ -O-glucosídico de las cadenas de  $\beta$ -glucanos, lo que conduce a la liberación de glucosa, oligosacáridos y manoproteínas atrapadas en la pared celular o covalentemente unidos a  $\beta$ -(1,6) y  $\beta$ -(1,3) glucanos (Alexander, 2006). La cinética de la actividad  $\beta$ -glucanasa durante la autólisis y los parámetros enológicos que afectan a esta actividad son desconocidas en vino espumoso. La acción de estas enzimas ha sido deducida a partir de los compuestos liberados. Las paredes celulares de levadura liberan aminoácidos durante la autólisis. Esto refleja la actividad proteolítica que puede estar ocurriendo en la pared celular (Hien y Fleet, 1983). Teóricamente la degradación de la pared celular durante la autólisis permite liberar aminoácidos y macromoléculas. Charpentier y Freyssinet (1989) y Feuillat *et al.* (1989) mostraron que la degradación de la pared celular se podría resumir de la siguiente manera:

- En primer lugar se hidrolizan glucanos por glucanasas, liberando así manoproteínas atrapadas o unidas covalentemente a los glucanos.
- En segundo lugar, los glucanos se liberan ya sea debido a las actividades residuales de glucanasas de la pared celular o glucanasas solubilizadas en el medio.
- Por último, la fracción de proteína de las manoproteínas es degradada por proteolisis.

Recientemente se informó que añadiendo una preparación enzimática rica en  $\beta$ -glucanasa se incrementan las características del envejecimiento del vino espumoso, y también mejora las propiedades antioxidantes del vino (Rodríguez-Nogales *et al.*, 2012a, b).

Dada la importancia del fenómeno autolítico en la crianza biológica de los vinos espumosos, otros autores han intentado poner de manifiesto los cambios celulares de las levaduras muertas que quedan durante largo tiempo en contacto con el vino. Desde el punto de vista morfológico existen estudios previos que han visualizado modificaciones de la ultraestructura celular de las levaduras durante la crianza biológica de los vinos espumosos (Piton *et al.*, 1988). Otros autores han estudiado el fenómeno autolítico induciendo el proceso de autodegradación de las células, es decir, acelerando el proceso en un vino modelo. Sin embargo, las condiciones reales del vino espumoso (estrés sufrido

por la levadura y el tiempo de envejecimiento) son muy difíciles de reproducir en sistemas modelo acelerados, y los resultados de autólisis inducida no siempre son comparables con el comportamiento de las muestras reales (Martínez Rodríguez *et al.*, 2001). En estos estudios, los cambios estructurales y ultraestructurales que se produjeron en células de levadura durante la autólisis se compararon en un sistema de vino modelo y, en los vinos espumosos. Después de 24 h de incubación en un sistema modelo se encontró que las células de levadura habían perdido la mayoría de su contenido citoplasmático y tenían una gran vacuola, mientras que las levaduras de crianza de 12 meses todavía tenían la mayor parte de su contenido citoplasmático y una pequeña vacuola.

La autólisis de la levadura durante el envejecimiento en cava libera diferentes compuestos en el medio, lo cual modifica las propiedades físicas y organolépticas del vino espumoso.

Compuestos nitrogenados: Se piensa que la liberación de nitrógeno refleja la actividad autolítica de levadura, en particular la actividad proteolítica. Los péptidos son liberados al medio y luego se descomponen en aminoácidos. El cambio en las diversas fracciones de nitrógeno durante la fermentación y el envejecimiento del vino espumoso en botella ha sido estudiado por Moreno-Arribas *et al.* (1996). Entre los 3 y 9 meses después de la adición del tiraje, no se había observado ningún cambio en la concentración de aminoácidos libres, independientemente de la variedad de uva utilizada. La concentración de aminoácidos libres se incrementó después de 9 meses, y estos resultados han sido posteriormente confirmados (Nunez *et al.*, 2005). El contenido de péptidos fluctúa, alcanzando un máximo después de 12-15 meses de crianza sobre lías y disminuyendo a partir de entonces. Este comportamiento puede reflejar una liberación inicial de péptidos que posteriormente se descomponen.

La cantidad de péptidos liberados por autólisis de la levadura durante el envejecimiento del vino espumoso es variable y depende de la variedad de uva y del tiempo de envejecimiento (Moreno-Arribas *et al.*, 1998a). La naturaleza de los péptidos liberados también cambia con el envejecimiento, su longitud disminuyó con el aumento del tiempo de crianza (Martínez-Rodríguez y Polo, 2000; Moreno-Arribas *et al.*, 1998b). La composición de aminoácidos de los péptidos presentes en los vinos espumosos ha sido investigada por varios autores (Moreno-Arribas *et al.*, 1996; Moreno-Arribas *et al.*, 1998a, b; Martínez-Rodríguez y Polo, 2000; Martínez-Lapuente *et al.*, 2015). Los péptidos se originan principalmente de la descomposición de las proteínas de las levaduras en lugar de las proteínas del mosto. Martínez-Rodríguez y Polo (2000) observaron un aumento en los niveles de proteínas y de polipéptidos durante los primeros 3 meses, seguido por una disminución atribuida a la actividad de proteasa. Los contenidos en proteínas y péptidos aumentaron de nuevo después de 6 meses. El enriquecimiento de aminoácidos del medio puede mejorar el potencial aromático del vino

espumoso, ya que los aminoácidos son precursores de compuestos aromáticos, los cuales pueden generarse por la desaminación o descarboxilación de aminoácidos (Charpentier y Feuillat, 1993).

Las características de la espuma son una propiedad extremadamente importante del vino espumoso. Moreno-Arribas *et al.* (2000) sugirieron que la hidrofobicidad de los péptidos podría explicar las propiedades espumantes del vino espumoso. Unos años más tarde se descubrió que las características de la espuma se correlacionan positivamente con las concentraciones de la mayoría de los aminoácidos libres y proteínas, lo que confirma los resultados de Malvy *et al.* (1994) (Moreno-Arribas *et al.*, 1998; Martínez-Lapuente *et al.*, 2015; Pham *et al.*, 1995; Francioli *et al.*, 2003; Moreno-Arribas *et al.*, 2000). Sin embargo, no se encontró relación entre las características de la espuma y la concentración de péptidos del vino.

Las glucanasas y proteasas liberan polisacáridos de la pared celular de la levadura durante la autólisis en los vinos espumosos. Estas macromoléculas contienen principalmente glucosa (74%) y manosa (26%). Las concentraciones de polisacáridos en vinos son variables. En un estudio realizado por Charpentier (2000) se observó un aumento en el contenido de polisacáridos, de 366 mg/L en el vino base hasta 602 mg/L después de 9 meses de crianza. Su influencia en la calidad de la espuma también ha sido investigada (Brissonnet y Maujean, 1991). Los polisacáridos neutros son importantes por su efecto altamente positivo en la estabilidad de ésta (Moreno-Arribas *et al.*, 2000). Un reciente estudio (Martínez-Lapuente *et al.*, 2015) investigó el impacto de los polisacáridos en las propiedades espumantes a partir de variedades españolas (Verdejo, Macabeo/Viura, Malvasia, Albariño, Godello, Prieto Picudo, Tempranillo y Garnacha). Los polisacáridos (manoproteínas, polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa, homogalacturonanos, glucanos y ramnogalacturonanos tipo II) no se correlacionaron con la espumabilidad. Sin embargo, hubo correlaciones positivas entre todos los polisacáridos del vino y el tiempo de estabilidad de la espuma, a excepción de los ramnogalacturonanos tipo II.

Los lípidos son componentes importantes de los vinos espumosos, ya que son una fuente importante de compuestos del flavor y afectan a la estabilidad de la espuma (Forss, 1969). Los cambios en el contenido de lípidos del vino espumoso han sido el foco de varios estudios. El contenido de lípidos aumenta durante la segunda fermentación, y los cambios cualitativos se producen durante el envejecimiento en botella en contacto con las lías (Troton *et al.*, 1989; Piton *et al.*, 1988). La concentración de lípidos polares disminuye, mientras que la concentración de lípidos neutros aumenta (monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos) (Kemp *et al.*, 2015).

Ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos representan más del 10 % del peso seco de la levadura. ARN y ADN constituyen del 5 al 15% y del 0.1 al 1.5% del peso seco celular, respectivamente. Los estudios

sobre la degradación del ácido nucleico se han realizado en medio de cultivo (Zhao y Fleet, 2003, 2005). Zhao y Fleet (2003) informaron de que se degradó hasta 55% del ADN total durante la autólisis, y se liberaron 3'-5' desoxirribonucleótidos. Incluso en condiciones autolíticas óptimas, algunas partes del ADN son resistentes a la degradación. Sin embargo, aún se necesitan estudios de degradación del ADN en condiciones enológicas. Es de esperar que la presencia de etanol, el pH y la temperatura más baja den lugar a una degradación de ADN mucho menor (Alexander *et al.*, 2006). Más de 95% del contenido total de ácido nucleico dentro de las células de levadura es ADN. Zhao y Fleet (2005) sugirieron que su degradación es una reacción clave de la autólisis de la levadura. Ellos determinaron varias condiciones autolíticas y demostraron que hasta 95% de ADN celular se degrada, liberando principalmente, 3'-5' y 2' ribonucleótidos. Las condiciones para la formación de los dos nucleótidos potenciadores del sabor, 5'-AMP y 5'-GMP, son 50 °C a pH 7.0 y 40 °C a pH 4.0 respectivamente. Aunque estas condiciones óptimas están lejos de las de crianza de los vinos espumosos, puede existir degradación de ácidos nucleicos y liberación de nucleótidos al vino durante la autólisis, lo cual puede afectar a las propiedades organolépticas del vino (Courtis *et al.*, 1998). El enzima RNasa está activo durante la autólisis en espumosos de Champagne, pero los datos sobre el alcance de la degradación de ácidos nucleicos debe interpretarse con cautela, debido a que los ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, péptidos y otros compuestos en el vino pueden interferir con la medición de los nucleótidos (Leroy *et al.*, 1990; Kemp *et al.*, 2015). Se han identificado de manera inequívoca en el vino de Champagne envejecido sobre lías nucleótidos monofosfato (5'-UMP, 5'-GMP, y 5'-IMP) (Aussenac *et al.*, 2001; Charpentier *et al.*, 2005) donde la concentración de nucleótidos monofosfato osciló entre 50 y 500 g/L. Estos tienen un reconocido efecto organoléptico en los alimentos. Se puede esperar que su degradación tenga un papel relevante en el envejecimiento de los vinos, pero se necesitan más estudios para evaluar su impacto sobre el flavor (Abbas, 2006).

Compuestos volátiles. Se han identificado cadenas pesadas de acil-ésteres en vino espumoso y modelo (Molnar *et al.*, 1981). También se liberan durante la autólisis alcoholes terpénicos y alcoholes superiores como el genariol y  $\alpha$ -terpineol, citronelol y farnesol. Estos compuestos son percibidos por los catadores en concentraciones bajas, de 100 a 300  $\mu\text{g/L}$ . Molnar *et al.* (1981) ha sugerido que el farnesol puede contribuir enormemente a la calidad aromática del vino espumoso, y Loyaux *et al.* (1981) sugiere que el nerolidol hace una contribución similar en los vinos de Champagne. Aproximadamente 10 aldehídos han sido identificados en vinos espumosos (Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006). El 3-metil-butanal es el más abundante, representa el 40% de todos los aldehídos presentes, y pueden formarse a través de un mecanismo que implica la oxidación del alcohol isoamílico. La mayoría de los aldehídos están presentes a niveles cercanos o superiores al

umbral de detección de la nariz humana en soluciones acuosas, pero en solución etanólica y con CO<sub>2</sub> (vino espumoso) el umbral es desconocido.

En un estudio de Francioli *et al.* (2003) se caracterizaron los compuestos aromáticos volátiles liberados durante la autólisis en 221 cavas (clasificados en 4 grupos de acuerdo con el tiempo de envejecimiento), y el dietil succinato, fue identificado como marcador durante todo el envejecimiento. Los acetatos parece que decrecen durante el envejecimiento mientras que diacetil succinato, vitispirano y el 1,2-dimetil-1,1,6-trimetilnaftaleno (TDN) aumentan sus niveles con el tiempo. El hexanol y el 2-feniletanol fueron también liberados durante la autólisis. Compuestos como el vitispirano, el TDN y el dietil succinato pueden ser buenos marcadores y pueden discriminar entre espumosos jóvenes y espumosos envejecidos. También se ha informado de que algunos acetatos de alto peso molecular y sus ésteres etílico e isoamilo son compuestos aromáticos típicos de cavas jóvenes mientras que, vitispirano, dietil succinato, TDN, hexanol y acetato de etilo son compuestos típicos de cavas envejecidos durante un periodo prolongado (Riu-Aumatell *et al.*, 2006).

También se ha encontrado que la concentración de algunos compuestos aumenta con el envejecimiento en presencia de lías, especialmente el 5-hidroximetil-2-furfural (5-HMF), sintetizado a partir de la deshidratación de azúcar (principalmente fructosa) y formado a partir de etapas intermedias de las reacciones de Maillard (Bautista *et al.*, 2007; Serra-Cayuela *et al.*, 2013, Van Boekel *et al.*, 2006). El 5-HMF ha-sido descrito por contribuir con aromas de caramelo, mantequilla, mohosos, picante, animal, y aromas de jabón en vinos (Serra-Cayuela *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2012; Paravisini *et al.*, 2012). Sin embargo, el umbral de detección en los vinos espumosos y su aporte a la calidad permanece todavía por determinar. Recientemente se ha propuesto el 5-HMF como marcador de calidad relacionado con el pardeamiento más adecuado que el clásico A420, ya que es un compuesto que aumenta en todos los intervalos de temperaturas habituales, a diferencia del parámetro A420 que no sería útil a bajas temperaturas. Además, la medida de este compuesto es más sensible, precisa y no se ve afectado por la adición de sulfitos cuando éste es añadido con el licor de expedición. Por otra parte, en el período de rima el 5-HMF es capaz de separar con mayor eficiencia entre categorías de Cava (Serra-Cayuela *et al.*, 2014)

Benzenedimethanetiol, 2-furano metanetiol, y etil 3-mercaptopropionato se encontraron en concentraciones superiores a los umbrales de percepción en vinos con crianza, lo que sugiere un papel importante en el aroma de vinos de Champagne envejecidos (Tominaga *et al.*, 2006). Se vieron diferencias en la concentración fenólica de varias variedades de uva para vino espumoso. Sin embargo, la crianza con lías no afecta significativamente la composición fenólica, más bien, los

efectos de la viticultura, el año de vendimia, y la variedad de uva son mayoritariamente los responsables de las diferencias fenólicas en los vinos.

En conclusión, la autólisis de las levaduras se caracteriza por la degradación de macromoléculas celulares y la liberación al medio exterior de los metabolitos de degradación así como otros constituyentes celulares. Este proceso se correlaciona con un gradual incremento en la concentraciones de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos, ácidos grasos libres y manoproteínas (cuyo origen es la pared celular) en el vino, como cambios en la concentración de varios ésteres, alcoholes superiores, compuestos de carbonilo, terpenos y lactonas. Estos cambios influyen en el aroma del vino espumoso y en las propiedades espumantes (Parish y Fleet, 2013).

## 2.4 Referencias bibliográficas

Abbas, C.A., 2006. Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeasts. Ed. En Querol, A., Fleet, G. H., (Ed), *Yeasts in Food and Beverages* (pp 285-334 ). Berlin, Germany: Springer.

Aguilar-Uscanga, B., Francois, J.M., 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology* 37, 268-274.

Alexandre, H., Heintz, D., Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Charpentier, C., Feuillat, M., 2001. Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 235-40.

Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., 2006. Yeast autolysis in sparkling wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 119-127.

Arnold, W.N., 1972. The structure of the yeast cell wall. Solubilisation of a marker enzyme,  $\alpha$  fructofuranosidase, by the autolytic system. *The Journal of Biological Chemistry* 4, 1161-1169.

Aussenac, J., Chassagne, D., Claparol, C., Charpentier, M., Duteurtre, B., Feuillat, M., Charpentier, C., 2001. Purification method for the isolation of monophosphate nucleotides from Champagne wine and their identification by mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 907, 155-164.

Baba, M., Baba, N., Ohsumi, Y., Kanaya, K., Osumi, M., 1989. Three-dimensional analysis of morphogenesis induced by mating pheromone a factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science* 94, 207-216.

Babayan, T. L., Bezrukov, M. G., 1985. Autolysis in yeast. *Acta Biotechnologica* 129-136.

Babayan, T.L., Bezrukov, M.G., Latov, V.K., Belikov, V.M., Belavt-seva, E.M., Titova, E.F., 1981. Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: Morphological effects, rheological effects, and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. *Current Microbiology* 5, 163-168.

Backhaus, K., Heilmann, C.J., Sorgo, A.G., Purschke, G., de Koster, C.G., Klis, F.M., Heinisch, J.J., 2010. A systematic study of the cell wall composition of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 27, 647-660.

Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a review. *South Africa Journal of Enology and Viticulture* 21, 27-51.

Bautista, R., Fernandez, E., Falque, E., 2007. Effect of the contact with fermentation lees or commercial lees on the volatile composition of white wines. *European Food Research and Technology* 244, 405-413.

Bonal, F., 1995. *Dom Pérignon. Vérité et légende*, Langres: Guéniot.

Boone, C., Sommer, S.S., Hensel, A., Bussey, H., 1990. Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall  $\beta$ -glucan assembly. *Journal of Cell Biology* 110, 1833-1843.

Borrull, A., Poblet, M., Rozès, N., 2015. New insights into the capacity of commercial wine yeasts to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection. *Food Microbiology* 48, 41-8.

Brissonnet, F., Maujean, A., 1991. Identification of some foam active compounds in Champagne base wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 97-102.

Buxaderas S., López-Tamames, E., 2003. Wines Production of Sparkling Wines, in Caballero B, Trugo L and Finglas P (Ed), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp 6203-6209), London: Elsevier Science Ltd.

Buxaderas, S., López-Tamames, E., 2012. Sparkling wines: features and trends from tradition. *Advances in Food and Nutrition Research* 66, 1-45.

Buchan, J.R., Muhlrad, D., Parker, R., 2008. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 183, 441-455.

Cabib, E., Durán, A., 2005. Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *Journal of Biological Chemistry* 280, 9170-9179.

Cabib, E., 2009. Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1p and Crh2p attach chitin to both  $\beta(1-6)$ - and  $\beta(1-3)$ glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Eukaryotic Cell* 8, 1626-1636.

Cabib, E., Arroyo, J., 2013. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nature Reviews Microbiology* 11, 648-55.

Cebollero, E., Gonzalez, R., 2007. Autophagy: from basic research to its application in food biotechnology. *Biotechnology Advances* 25, 396-409.

Cebollero, E., Reggiori, F., 2009. Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793, 1413-1421.

Charpentier, C., Freyssinet, M., 1989. The mechanism of yeast autolysis in wine. *Yeast* 5, 181-186.

- Charpentier, C., Feuillat, F., 1993. Yeast autolysis. In Fleet, G. H., (Ed.), Wine. Microbiology and Biotechnology Harwood Academic (pp 243–264). Chur, Switzerland: Publishers.
- Charpentier, C., 2000. Yeast autolysis and yeast macromolecules? Their contribution to wine flavour and stability. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 271–275.
- Charpentier, C., Aussenac, J., Charpentier, M., Prome, J. C., Duteurtre, B., Feuillat, M., 2005. Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: kinetics and potential impact on flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3000-3007.
- Connew, S.J., 1998. Yeast autolysis: a review of current research. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 13, 31-64.
- Courtis, K., Todd, B., Zhao, J., 1998. The potential role of nucleotides in wine flavour. *Australian Grapegrower and Winemaker* 409, 51-53.
- Daban, M., 2005. Los espumosos del mundo: Factor variedad y fermentación. *ACE Revista de Enología* 57.
- De Nobel, J. G., Klis, F. M., Priem, J., Munnik, T., van den Ende. H., 1990 The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6, 491-499.
- De Nobel, J. G., Barnett J. A., 1991. Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast* 7, 313-323.
- Del Nobile, M.A., D’Amato, D., Altieri, C., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., 2003. Modeling the yeast Growth-Cycle in a model wine system. *Journal of Food Science* 68, 2080-2085.
- Díaz de Mendívil, J.M., Peris Balada, A., PláPayà, S., 1999. *Larousse de los vinos* (pp. 241–246) Barcelona: Larousse Editorial S.A.
- Duteurtre, B., 2010. *Le champagne, de la tradition à la science*. Paris: Francia Tec & Doc, Lavoisier DL.
- Dupres, V., Dufrêne, Y.F., Heinisch, J.J., 2010. Measuring cell wall thickness in living yeast cells using single molecular rulers. *ACS Nano* 4, 5498-5504.
- Feuillat, M., Charpentier, C., 1982. Autolysis of yeasts in Champagne. *American Journal of Enology and Viticulture* 33, 6–13.
- Feuillat, M., Freyssinet, M., Charpentier, C., 1989. L’élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne, II. Évolution des macromolécules (polysaccharides et protéines). *Vitis* 28, 161-176.
- Flanzy, C., Salgues, M., Bidan, P., Dubois, C., Moulin, J. P., Sablayrolles, J. M., 1999. “Oenology: Fondements scientifiques et technologiques”. Flanzy, C., (Ed.), *Technique et Documentation*, (pp. 497–516). Paris, France.
- Fleet, G. H., 1991. Cell walls, in A. H. Rose, and J. S. Harrison (Ed.), *The Yeasts*, (pp. 199–277) New York: Academic Press.
- Fleet, G.H., Heard, G.M., 1993. Yeast-growth during fermentation. In G.H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology* (pp. 27–54). Reading: Harwood Academic.



Fornairon-Bonnefond, C., Camarasa, C., Moutounet, M., Salmon, J. M., 2001. Etat des connaissances scientifiques actuelles sur le phénomène d'autolyse des levures et l'élevage des vins sur lies. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 35, 57-78.

Forss, D.A., 1969. Role of lipids in flavours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17, 681-685.

Francioli, S., Torrens, J., Riu-Aumatell, M., Lopez-Tamanez, E., Buxaderas, S., 2003. Volatile compounds by SPME-GC as age markers of sparkling wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 158-162.

Giralt i Raventós, E., 1998. Els inicis del cava: Mont-Ferrant. Agustí Vilaret i Centrich (1820-1903), Blanes, Caves Mont-Ferrant, 155 pàgines il·lustrades. [Dipòsit legal: 9269-98]

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274, 546- 567.

Gonzalez, M., De Groot, P.W.J., Klis, F.M., Lipke, P.N., 2010. Glycoconjugate structure and function in fungal cell walls, in A. P. Moran, O. Holst, P. J. Brennan, and M. von Itzstein (Ed), *Microbial Glycobiology. Structures, Relevance and Applications*, (pp. 169–183), New York: Academic Press/Elsevier.

Hagen, I., Ecker, M., Lagorce, A., Francois, J.M., Sestak, S., Rachel, R., Grossmann, G., Hauser, N.C., Hoheisel, J.D., Tanner, W., Strahl, S., 2004. Sed1p and Srl1p are required to compensate for cell wall instability in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in multiple GPI-anchored mannoproteins. *Molecular Microbiology* 52, 1413-1425.

Hartland, R. P., Vermeulen, C. A., Klis, F., M Sietsma, J. H., Wessels, J. G., 1994. The linkage of (1–3)-b-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1591-1599.

Hien, N.H. Fleet, G.H., 1983. Separation and characterisation of six (1 leads to 3)-β-glucanases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 156, 1204-1213.

Kang, M.S., Elango, N., Mattia, E., Au-Young, J., Robbins, P.W., Cabib, E., 1984. Isolation of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of an enzyme by entrapment in the reaction product. *Journal of Biological Chemistry* 259, 14966-14972.

Kapteyn, J.C., Van Den Ende, H., Klis, F.M., 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426, 373-383.

Kemp, B., Alexandre, H., Robillard, B., Marchal, R.J., 2015. Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 19-38.

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., 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185-202.

- Kollár, R., Petráková, E., Ashwell, G., Robbins, P.W., Cabib, E., 1995. Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1/3)-glucan. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 1170-1178.
- Kollár, R., Reinhold, B. B., Petráková, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., Cabib, E., 1997. Architecture of the yeast cell wall. b(1/6)-glucan interconnects mannoprotein, b(1/3)-glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry* 272, 17762-17775.
- Komano, H., Rockwell, N., Wang, G., Krafft, G., 1999. Purification and characterization of the yeast GPI-anchored, mono-basic aspartyl protease yapsin 2 (Mkc7p). *Journal of Biological Chemistry* 274, 24421-24437.
- Kopecká, M., Phaff, H.J., Fleet, G.H., 1974. Demonstration of a fibrillar component in the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical nature. *Journal of Cell Biology* 62, 66-76.
- Kraft, C., Reggiori, F., Peter, M., 2009. Selective types of autophagy in yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793, 1404-1412.
- Kuranda, M.J., Robbins, P.W., 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 266, 19758-19767.
- Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C., Ribereau-Gayon, P., 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 1246-1249.
- Latgé, J.P., 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* 66, 279-290.
- 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.
- Loyaux, D., Roger, S., Adda, J., 1981. The evolution of champagne volatiles during aging. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32, 1254-1258.
- Lurton, L., Segain, J.P., Feuillat, M., 1989. Etude de la protéolyse au cours de l'autolyse de levures en milieu acide. *Sciences des Aliments* 9, 111-124.
- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C.S., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C., 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 17593-17598.
- Madigan, M.T., Martinko, J. M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl D.A., Brock, T., 2015. *Brock Biology of Microorganisms*, New Jersey: Prentice-Hall.
- Magnelli, P., Cipollo, J.F., Abeijon, C.A., 2002. Refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and beta-1,6-glucan fine structure. *Analytical Biochemistry* 301, 136-150.

Malvy, J., Robillard, B., Duteurtre, B., 1994. Influence des protéines sur le comportement de la mousse des vins de Champagne. *Sciences des Aliments* 14, 87-98.

Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.A., Bjorndal, H., Lindberg, B., 1973. The structure of a b-1,6-glucan from yeast cell walls. *Biochemical Journal* 135, 31-36.

Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarána, B., Pérez- Magariño, S., 2015. Role of major wine constituents in the foam properties of white and rosé sparkling wines. *Food Chemistry* 174, 330-338.

Martinez-Rodriguez, A.J., Polo, M.C., 2000. Characterisation of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1081-1085.

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.

Martini, A., 1993. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research* 4, 165-176.

Mendes, B., Gonclaves, J., Camara, J., 2012. Effectiveness of high through-put miniaturised sorbent- and solid phase micro-extraction techniques combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a rapid screening of volatile and semi-volatile composition of wines- a comparative study. *Talanta*, 88, 79-94.

Mestre i Raventós, P., y Solé i Bordes, J., 1993. *Vinyes i vins : mil anys d'història II: Actes i Comunicacions del III Col·loqui d'Història Agraria sobre mil anys de producció, comerç i consum de vins i begudes alcohòliques als Països Catalans, febrer del 1990.* Coord. Emili Giralt. Capítulo: Les reglamentacions del cava i la seva relació amb la denominació D'Origen Penedès pag. 141-207. Entitat editora Universitat de Barcelona.

McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C.S., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C., 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 17593-17598.

Mijaljica, D., Prescott, M., Klionsky, D.J., Devenish, R.J., 2007. Autophagy and vacuole homeostasis: a case for selfdegradation? *Autophagy* 3, 417-421.

Molnar, I., Oura, E., Suomalainen, H., 1981. Study of the volatile substances produced during the autolysis of Champagne yeasts. *Acta Alimentaria* 10, 27-36.

Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Polo, M.C., 1996. Peptides in musts and wines. Changes during the manufacture of cavas (sparkling wines). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3783-3788.

Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Polo, M.C., Martin-Alvarez, P.J., 1998a. Changes in the amino acid composition of the different nitrogenous fractions during the aging of wine with yeasts *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4042-4051.

Moreno-Arribas, M.V., Bartolomé, B., Pueyo, E., Polo, M.C., 1998b. Isolation and characterisation of individual peptides from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3422-3425.

- Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Nieto, F.J., Martín-Alvarez, P.J., Polo, M.C., 2000. Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chemistry* 70, 309-317.
- Muñoz, J., Ávila, J., 2000. *Todos Los Vinos Del Mundo*. Barcelona, España: Planeta.
- Nunez, Y.P., Carrascosa, A.V., Gonzalez, R., Polo, M.C., Martínez-Rodríguez, A.J., 2005. Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a Champenoise method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7232-7237.
- Olsen, V., Cawley, N.X., Brandt, J., Egel-Mitani, M. Loh Y.P., 1999. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* yapsin 3, a new member of the yapsin family of aspartic proteases encoded by the YPS 3 gene. *Biochemistry Journal* 339, 407-411.
- Orlean, P., 2012. Architecture and Biosynthesis of the Yeast Cell Wall. In P. Pryciak and J. Thorner, (Ed.) *YeastBook. Cell Signaling & Development*. *Genetics* 192, 775-818
- Osumi, M., 1998. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* 29, 207-233.
- Ough, C.S., 1964. Fermentation rates of juice.I. Effects of temperature and composition on white juice fermentation rates. *American Journal of Enology and Viticulture* 15, 167-177.
- Paravisini, L., Gourrat-Pernin, K., Gouttefangeas, C., Moretton, C., Nigay, H., Dacremont, C., Guichard, E., 2012. Identification of compounds responsible for the odorant properties of aromatic caramel. *Flavour and Fragrance Journal* 27, 424-432.
- Parish, M.E., Fleet, G.H., 2013. Wine (pp 915-947).In Michael P. Doyle and Robert L. Buchanan (Ed.) *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*, Washington, DC: American Society For Microbiology.
- Peñín, J., 2008. *Historia del vino*. España: Espasa libros.
- Pham, T.T., Guichard, E., Schlich, P., Charpentier, C., 1995. Optimal conditions for the formation of sotolon from  $\alpha$ -cetobutyric acid in the French "Vin Jaune". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2616-2619.
- Pitarch, A., Nombela, C., Gil, C., 2008. Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. *Methods in molecular biology* 425, 217-239.
- Piton, F., 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.
- Pretorius, I.S., Curtin, C.D., Chambers, P.J., 2012. The winemaker's bug: From ancient wisdom to opening new vistas with frontier yeast science. *Bioengineered bugs* 3, 147-156.
- Riu-Aumatell, M., Bosch-Fusté, J., Lopez-Tamames, E., Buxaderas, S., 2006. Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. *Food Chemistry* 95, 237-242.

Roca, R., 2007. Antoni Agustí Vilaret, Mont-Ferrant i els orígens de la fabricació de vins espumosos a Catalunya. Quaderns d'història de l'enginyeria 8.

Rodríguez-Nogales, J.M., Fernández-Fernández, E., Gómez, M., Vila-Crespo, J., 2012 a. Antioxidant properties of sparkling wines produced with  $\beta$ -glucanase and commercial yeast preparations. Journal of Food Science 77, 1005-1010.

Rodríguez-Nogales, J.M., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., 2012 b. Effect of the addition of  $\beta$ -glucanase and commercial yeast preparations on the chemical and sensorial characteristics of traditional sparkling wine. European Food Research and Technology 235, 729-744.

Rozier, 1897-1903. Diccionario de Agricultura. Curso completo o diccionario universal de agricultura <http://www.fsanmillan.es/biblioteca/diccionario-de-agricultura-rozier-curso-completo-o-diccionario-universal-de-agricultura-1>

Sablayrolles, J.M., Barre, P., 1986. Evaluation des besoins en oxygen de fermentations alcooliques en conditions oenologiques simulees. Sciences des Aliments 6, 373-383.

Sablayrolles, J.M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.L., & Barre, P. (1996). Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering 82, 377-381.

Sandager, L., Gustavsson, M.H., Ståhl, U., Dahlqvist, A., Wiberg, E., Banas, A., Lenman, M., Ronne, H., Szymne, S., 2002. Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. The Journal of Biological Chemistry 277, 6478-6482.

Sato, M., Suzuki, Y., Hanamura, K., Katoh, I., Yagi, Y., Otsuka, K., 1997. Winemaking from the Koshu variety by the sur lie method: behavior of free amino acids and proteolytic activities in the wine. American Journal of Enology and Viticulture 48, 1-6.

Serdio, E., 2015. Diccionario profesional del vino. Una perspectiva española. España: Global marketing strategies.

Serra-Cayuela, A., Castellari, M., Bosch-Fuste, J., Riu-Aumatell, M., Buxaderas, S., Lopez-Tamames, E., 2013. Identification of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) in cava sparkling wines by LC-DAD-MS/MS and NMR spectrometry. Food Chemistry 141, 3373-3380.

Serra-Cayuela, A., Jourdes, M., Riu-Aumatell, M., Buxaderas, S., Teissedre, P.L., López-Tamames, E., 2014. Kinetics of browning, phenolics, and 5-hydroxymethylfurfural in commercial sparkling wines. J. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62, 1159-66.

Tai, S.L., Daran-Lapujade, P., Walsh, M.C., Pronk, J.T., Daran, J., 2007. Acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature: a chemostat-based transcriptome analysis. Molecular Biology of the Cell 18, 5100-5112.

Todd, B., Fleet, G.H., Henschke, P.A., 2000. Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. American Journal of Enology and Viticulture 51, 65-72.

Tominaga, T., Nicolass, Y., Frerot, E., Dubourdiou, D., 2006. Stereoisometric distribution of 3-mercaptopheaxan-1-ol and 3-mercatohexyl acetate in dry and sweet white wines made from *Vitis vinifera* (var. Sauvignon blanc and Semillon). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 4, 7251-7255.

Troton, D., Charpentier, M., Robillard, B., Calvayrac, R., Duteurtre, B., 1989. Evolution of the lipid contents of Champagne wine during the second fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture* 40, 175-182.

Valade, M., Laurent, M., 1999. *Le Vigneron Champenois* 6, 67.

Van Boekel, M.A. J. S., 2006. Formation of flavour compounds in the Maillard Reaction *Biotechnology Advances* 24, 230-233.

Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G.C., Singer, R.A., 1993. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* 57, 383-401.

Willey, J.M., 2009. *Microbiología*. España: Interamericana de España, cop.

Yamaguchi, M., Namiki, Y., Okada, H., Mori, Y., Furukawa, H., Wang, J., Ohkusu, M., Kawamoto, S., 2011. Structome of *Saccharomyces cerevisiae* determined by freeze-substitution and serial ultrathin-sectioning electron microscopy. *Journal of electron microscopy* (Tokyo) 60, 321-335.

Yin, Q.Y., de Groot, P.W., de Jong, L., Klis, F.M., De Koster, C.G., 2007. Mass spectrometric quantitation of covalently bound cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 7, 887-896.

Zamora, F., 2009. *Biochemistry of Alcoholic Fermentation*. In M. V., Moreno-Arribas, C. Polo, (Ed.) *Wine Chemistry and Biochemistry*, (pp 3-26). New York: Springer.

Zhao, J., Fleet, G.H., 2003. Degradation of DNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 175-182.

Zhao, J., Fleet, G.H., 2005. Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* produces predominantly ribonucleotides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32, 415-423.

Zlotnik, H., Fernandez, M.P., Bowers, B., Cabib, E., 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *Journal of Bacteriology* 159, 1018-1026.

<http://www.institutdelcava.com/>



# Capítulo 3



## 3. Metodología y plan de trabajo





### 3. Metodología y plan de trabajo

---

En función de los objetivos y del tipo de muestra utilizado, lías o vino, la parte experimental de este trabajo comprende dos partes: la primera (primer objetivo) es la correspondiente al análisis de las lías de la segunda fermentación con el tiempo; y la segunda parte (segundo objetivo) corresponde al estudio en los vinos de posibles indicadores químicos de la crianza biológica. Por esta razón se han utilizado dos tipos de muestras. Para describir la ultraestructura y las propiedades superficiales de las células muertas, se han separado las lías de tres series de cavas a lo largo de su crianza. Mientras que para el análisis de posibles indicadores químicos del grado autolítico de las lías, se han utilizados los mismos cavas anteriores después de separarlos de las células muertas; o bien vinos de diferentes cavas en rima o comerciales con periodos de crianza conocidos.

Así pues, el estudio de los cambios ultraestructurales y morfológicos de las levaduras de segunda fermentación a lo largo de la rima se ha subdividido en dos apartados que responden a dos tipos de metodologías:

1. Descripción detallada de la ultraestructura de las lías mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM).
2. Descripción y análisis de las propiedades superficiales (topografía y elasticidad) de las lías a lo largo de su envejecimiento mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

Asimismo, para el estudio de posibles indicadores químicos en el vino sobre el estado autolítico de las levaduras, se han seleccionado dos posibles indicadores del tiempo de crianza o del estado autolítico de las lías. El primero son los catabolitos derivados de la degradación del ARN, puesto que algunos autores afirman que el ARN sufre hidrólisis enzimática durante la autólisis. El segundo grupo de indicadores son de naturaleza indol, como la melatonina e isómeros y otros indoles relacionados con su metabolismo. Según algunos autores, este tipo de moléculas y en particular la melatonina y sus isómeros, proceden especialmente de la fermentación alcohólica. Así pues, teniendo en cuenta que el cava es un vino sometido a dos procesos fermentativos, probablemente tendrá mayor contenido de estos compuestos que otros vinos. Esta parte se ha dividido en dos apartados: uno correspondiente a la determinación de los nucleósidos y otro, para el análisis de los indoles tipo melatonina. En ambos casos se ha utilizado la misma técnica instrumental para la identificación y cuantificación de los compuestos a estudiar: cromatografía líquida de muy alta resolución asociada a espectrometría de masas (UHPLC-MS-MS):

1. Análisis del contenido y evolución de 7 catabolitos de los cavas, provenientes del ARN de las levaduras, durante la crianza biológica.
2. Análisis del contenido y evolución de 9 indoles en cavas en función del periodo de crianza. En este caso, además, se ha puesto a punto y validado un método analítico utilizando el UHPLC-MS-MS.

### **3.1 Plan de Trabajo: cambios estructurales, morfológicos y de las propiedades superficiales de las lías**

El estudio de los cambios estructurales, morfológicos y de las propiedades superficiales de las lías a lo largo de la crianza del cava, ha supuesto la recogida de las lías o sedimento de la segunda fermentación que se deposita en las botellas durante la fase de rima. El estado de las lías a diferentes tiempos de rima se ha comparado con la estructura de las células vivas de la misma cepa de levadura utilizada en la segunda fermentación.

#### **3.1.1 Muestreo**

Se han utilizado las lías de tres series de cavas elaborados a escala industrial (A, B y C) en las Bodegas Freixenet S.A. Estos cavas se diferencian en el tipo de vino base y cupage, pero en la segunda fermentación se ha añadido siempre la misma cepa de levadura (Figura 3.1). A fin de tener en cuenta la evolución de las células muertas con el tiempo y constatar los cambios ultraestructurales, las lías se han separado del vino transcurrido 1 mes desde el tiraje, cuando se supone que ha finalizado la segunda fermentación, a los 3 meses, cuando las células se comprobó que ya no eran viables, a los 6 y 9 meses, cuando se supone que pueden encontrarse los primeros indicios del proceso autolítico, y a lo largo de una prolongada crianza (13, 17, 21, 30, 39 y 48) (Figura 3.1). Las lías se recogen en cada punto de muestreo por triplicado puesto que corresponden a las tres series de cavas: A, B y C. De esta forma, los cambios que se observen deben ocurrir en las tres series de cavas puesto que la cepa de levadura es la misma. Además, en cada punto de muestreo y para cada serie se analizaron 3 botellas ya que siempre puede haber una variabilidad debida al proceso fermentativo. En total se recogen 10 tipos de lías en función del tiempo (1, 3, 6, 9, 13, 17, 21, 30, 39, y 48 meses de crianza) por tres series de cavas, mas una del pie de cuba, 30 muestras en total porque del cava C no se recogió la muestra de 48 meses.

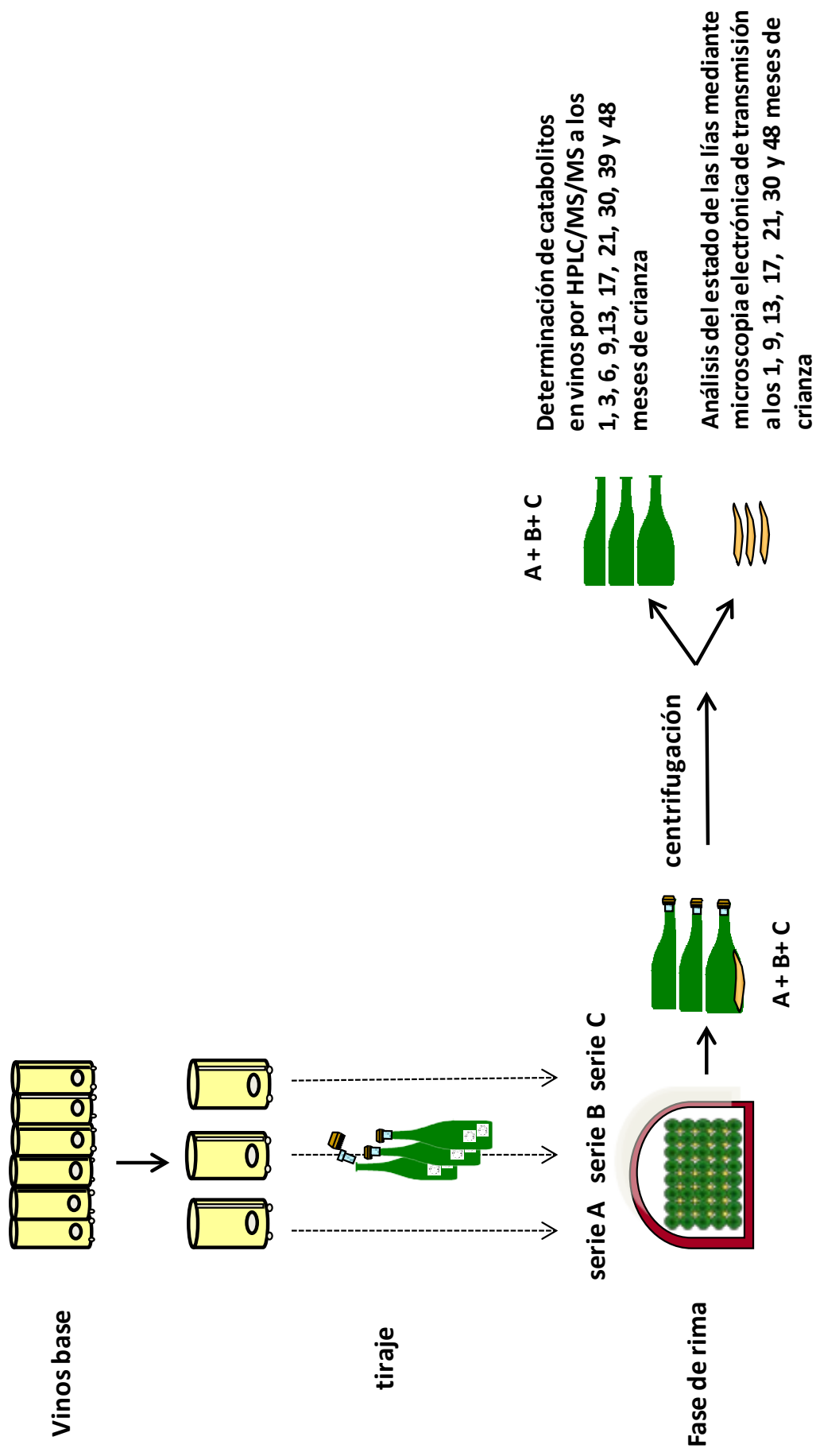


Figura 3.1: Muestreo del estudio de los cambios ultraestructurales y morfológicos de las lías.

Sin embargo no todos los análisis se aplicaron a los 10 tipos de muestras. Las lías de los primeros meses de la crianza biológica (1, 3, 6 y 9 meses) se utilizaron para comprobar la conclusión de la segunda fermentación y de la fase estacionaria, la muerte celular y la ausencia de viabilidad como requisitos previos a la autólisis. De esta forma se obtuvieron unas ciertas garantías de que a los 9 meses pudieran detectarse por observación al microscopio electrónico, indicios de plasmólisis y alteraciones de la pared y de la membrana celular.

### **3.1.2 Procedimientos analíticos**

Para monitorizar y profundizar en el conocimiento de las variaciones morfológicas sufridas por la levadura durante el proceso de autólisis, se ha utilizado como método descriptivo la microscopía electrónica de transmisión (TEM), y como método cuantitativo la microscopía de fuerza atómica (AFM).

#### **3.1.2.1 Obtención del pelet de las lías**

Para cada punto de muestreo y para cada uno de los tipos de cava (A, B y C), se aislaron las lías de tres botellas (750 ml /botella) por centrifugación a 8350 x g durante 15 min a 4 °C usando una centrífuga Centrikon T-124 (Kontron Instruments, Cumbernauld, UK); los pelets se lavaron tres veces con 30 mL de NaCl 0.9% (Panreac, Barcelona, Spain) siguiendo las indicaciones de Leroy *et al.* (1990). Finalmente, las lías se conservaron en frío hasta su procesamiento (menos de 24 horas).

#### **3.1.2.2 Operaciones preparatorias y observación con TEM**

En este estudio se ha utilizado la técnica del corte fino para la preparación de las muestras y su posterior observación al Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM). Este proceso se inicia con la muestra hidratada y finaliza cuando la misma, libre de agua y preservada, es inmersa en una matriz de resina plástica. Ésta penetra en el interior de la célula sustituyendo al agua y le confiere suficiente firmeza para hacer posible la obtención de secciones (cortes) finas (50-120 nm). Los cortes obtenidos serán posteriormente contrastados y observados al TEM. El procedimiento completo comprende: la preparación de las muestras (fijación, deshidratación, infiltración e inclusión), obtención de los cortes ultrafinos (Ultramicrotomía), conseguir contraste para los cortes ultrafinos y, por último, la visualización por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

#### Preparación de las muestras

Más en detalle este proceso comprende los siguientes tratamientos principales: Fijación, Deshidratación, Infiltración e Inclusión.

### i. Fijación

La finalidad del proceso de fijación es la de preservar la ultraestructura biológica. El fijador debe ser capaz de detener el proceso de degradación autolítico durante el tiempo de la fijación. Además debe proteger a la muestra de posibles alteraciones durante los procesos de inclusión, corte y observación al microscopio electrónico. Pero por otro lado los fijadores, sobre todo los fijadores químicos, introducen artefactos durante el proceso de preparación de la muestra. En nuestro caso se ha utilizado un tipo de fijación física y no química: *High Pressure Freezing* (HPF) con crioinmovilización (Moor, 1987). La ventaja de este método es que la formación cristalina del hielo es inhibida por altas presiones. HPF es el único método que permite la vitrificación de muestras hasta  $1\text{mm}^3$ . A 2100 bar, el agua es 1500 veces más viscosa que a presión atmosférica, lo que reduce drásticamente el crecimiento de cristales. No hace falta crioprotectores que también pueden introducir artefactos.

Para la preparación de la muestra los pellets de levadura fueron seleccionados bajo un estereomicroscopio y transferidos a unos pocillos o *planchettes* de 1.5 mm diámetro y 200  $\mu\text{m}$  de profundidad e inmediatamente crioinmovilizados usando el equipo Leica EMPact HPF (Leica, Vienna, Austria). Posteriormente se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

### ii. Deshidratación

La deshidratación es el proceso de sustitución del agua de la célula por un líquido que actúa como solvente entre el medio celular acuoso y la resina de inclusión (hidrofóbica). Los agentes de deshidratación más usados son el etanol y la acetona.

Para la preparación de la muestra se realizó la criosustitución durante 3 días a  $-90^\circ\text{C}$  en acetona anhidra que contenía 2% de tetraóxido de osmio y 0.1% de acetato de uranilo a  $-90^\circ\text{C}$  durante 72 horas. Posteriormente fue calentada a una velocidad de  $5^\circ\text{C}$  por hora hasta llegar a temperatura ambiente utilizando un equipo EM AFS (Leica, Vienna, Austria).

El tetróxido de osmio reacciona inicialmente con moléculas lipídicas. Probablemente las insaturaciones de los ácidos grasos son oxidados por el tetraóxido de osmio, el cual, a su vez, es reducido a osmio metálico formando un precipitado opaco que añade densidad y contraste al tejido a observar (Bozzola y Russell, 1999).

### iii. Infiltración

Generalmente se hace necesario el reemplazo del agente deshidratante por un compuesto intermediario miscible con la resina que se utilizará para la inclusión. La infiltración de la resina al interior de la muestra se realiza aumentando gradualmente su concentración. Las resinas epóxicas

poseen, como ventaja principal, una alta estabilidad a la irradiación de electrones y, en general, están formadas por los mismos componentes: una mezcla de resina (monómero), endurecedor (mezcla de anhídridos ácidos) y acelerador (poli-amina).

Después de enjuagar varias veces la acetona, las muestras fueron infiltradas con resina Epon durante 2 días.

#### *iv. Inclusion*

Es la sustitución de la mezcla resina/compuesto intermediario, por resina pura que polimerizará bajo ciertas condiciones, proporcionando a la muestra el soporte físico necesario para la obtención de cortes finos (60-90 nm). En este caso la polimerización se realizó a 60°C durante 48h.

#### Ultramicrotomía

Es el procedimiento de obtención de secciones ultrafinas a partir de una muestra previamente incluida en resina con el fin de observarlas al TEM. Para obtener los cortes finos se han efectuado las siguientes operaciones usando el ultramicrotomo:

- i. - Recortar (*trimming*) el bloque en forma de pirámide truncada.
- ii. – Obtener cortes gruesos (0,1-0,5  $\mu\text{m}$  aprox.) para confirmar la calidad de la inclusión y seleccionar la región donde se obtendrán los cortes finos.
- iii. - Obtener los cortes finos.
- iv. - Recoger los cortes en rejillas preparadas con membrana de soporte.

Los cortes ultrafinos de 50-60 nm se obtuvieron utilizando un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT y se montaron sobre rejillas de cobre *Formvar-coated*.

#### Contraste de los cortes.

La fase previa a la observación de las secciones al TEM, consiste en conferir contraste a los cortes obtenidos. Para esto se utilizan soluciones de sales de metales pesados las cuales contienen iones de alto número atómico, es decir con un importante número de electrones y protones capaces de desviar el haz de electrones incidente sobre la muestra y con cierta afinidad por componentes específicos de la misma.

Los cortes fueron teñidos con acetato de uranilo al 2% en agua, y citrato de plomo. Estos dos compuestos son llamados teñidores generales o no específicos debido a su capacidad de reaccionar con diferentes componentes celulares.

El modo de acción de estos contrastantes no se conoce con exactitud, se cree que los iones uranilo reaccionan fuertemente con los grupos amino y fosfato contenidos en los ácidos nucleicos y en proteínas, las cuales se tiñen de modo intenso. Asimismo, los iones de plomo se enlazan a componentes cargados negativamente tales como los grupos hidroxilo y a las áreas donde previamente se enlazó el osmio. Los grupos fosfato pueden estar igualmente implicados en este fenómeno (Bozzola y Russell, 1992).

### Visualización

Los cortes ultrafinos se observaron mediante el microscopio electrónico de transmisión *Tecnai Spirit electron microscope* (FEI Co, Hillsboro, OR) con un voltaje de aceleración de 120 kV en los Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

#### **3.1.2.3 Observación y cuantificación de los cambios morfológicos mediante AFM**

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) es una herramienta eficaz para obtener imágenes de cambios en la topografía de la superficie con resolución nanométrica (Dufrêne, 2003) debidos a la autólisis de las células de levadura. El AFM también puede proporcionar información cuantitativa de las propiedades nanomecánicas locales de la muestra como la elasticidad (Gaboriaud y Dufrêne, 2007) que complementan la información cualitativa obtenida por TEM.

Una de las principales ventajas respecto a otras técnicas de caracterización superficial a nivel micro y nanométrico (p.ej. microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión) es que el AFM es una técnica no destructiva que puede operar en prácticamente cualquier ambiente incluyendo aire, líquido y vacío. Otra gran ventaja es que en la mayoría de los casos las muestras no precisan ser tratadas previamente, el único requerimiento es la inmovilización sobre una superficie nanométricamente plana.

El AFM muestrea la superficie de una muestra mediante una punta adherida a una barra (*cantilever*) que se dobla cuando la punta hace contacto con la muestra. La flexión del cantiléver se mide a través de un detector al mismo tiempo que se efectúa un barrido sobre la superficie de la muestra (Figura 3.2). Dado que todo esto ocurre dentro de unas dimensiones muy pequeñas el barrido ocurre a gran velocidad. El movimiento de barrido lo realiza un escáner piezo-eléctrico, y la interacción



punta/muestra se monitoriza reflejando un láser en la parte trasera de la palanca, que se recoge en un detector fotodiodo (Figura 3.2).

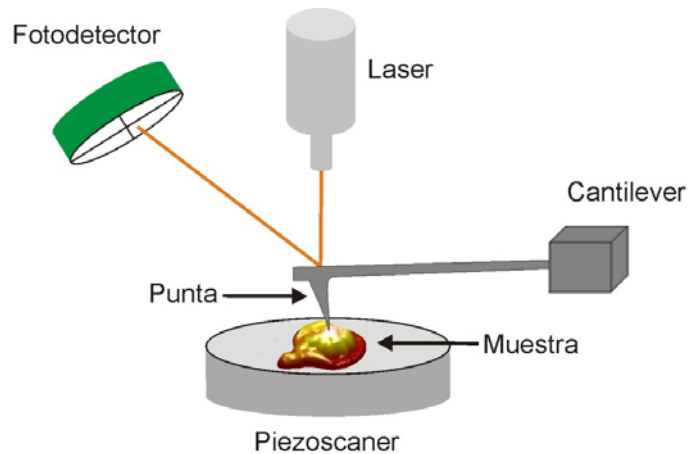


Figura 3.2: Esquema de un microscopio de fuerza atómica (AFM).

El AFM es capaz de proporcionar imágenes topográficas en 3 dimensiones de la superficie de moléculas y células pudiendo llegar a una resolución en  $z$  de 1 Å.

En este trabajo se han obtenidos los primeros resultados de los cambios topográficos, y de elasticidad de las levaduras a lo largo de la rima mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

#### Preparación de la muestra

El *pelet* de levadura se diluyó en un tampón (150mM NaCl, pH ajustado a 7.4 con HEPES) hasta que la disolución se volvió prácticamente transparente. Se agitó y sonicó durante 30 segundos. 50  $\mu$ l de la suspensión de las lías se depositaron sobre una superficie de grafito (HOPG) recién cortado y se dejaron reposar durante 10 minutos. Después las muestras se secaron con una corriente de nitrógeno y se pegaron en un disco metálico que se montó en el soporte de AFM.

Durante el estudio de muestras biológicas, es importante que la muestra se encuentre adherida al sustrato y que esta adhesión sea suficientemente fuerte como para evitar el desprendimiento de la muestra por el barrido de la punta, y simultáneamente que esta fijación no le cause alteraciones significativas. Por esta razón, primero se ensayó si era mejor la realización de medidas en aire con punta VistaProbes (constante de muelle nominal 40nN/nm) o en medio acuoso (solución salina) con punta SNL-10 (Bruker) (constante de muelle nominal 0.35nN/nm) trabajando el AFM en modo *tapping*.

### Visualización y cuantificación

Posteriormente todas las mediciones se realizaron en aire con Peak Force QNM (Bruker) como modo de trabajo del AFM Multimodo 8 unido a un Nanoscope V electronics (Bruker). Este modo se ha usado tanto para la formación de imágenes topográficas como para la realización de medidas nanomecánicas de las levaduras. Peak Force QNM minimiza las interacciones sonda-muestra mientras se forman las imágenes, hecho que permite una deformación inferior de la muestra y una señal topográfica más fiable. Además, permite un control preciso de la fuerza vertical ejercida sobre la muestra durante la realización de los experimentos nanomecánicos (curvas de fuerza), que se traduce en resultados cuantitativos en el régimen de deformación elástica. Otra ventaja de este modo en comparación con los de imagen clásicos, especialmente del modo de contacto, es que no hay fuerzas de fricción que provoquen un efecto de arrastre, que es el responsable del movimiento de la levadura durante el barrido.

Para la utilización del modo Peak Force QNM la sonda de AFM se puso en contacto con la superficie de la muestra hasta ejercer una cierta fuerza vertical, que fue controlada por el usuario o automáticamente por el software. Después de esto, la muestra volvió a la posición inicial. Este proceso, se realizó a una frecuencia de 2 kHz. La punta escaneó la superficie de la muestra y mantuvo constante la fuerza vertical ejercida sobre la muestra. Todos los resultados nanomecánicos presentados en este estudio se realizaron a una fuerza vertical máxima de 5nN, que resultó ser la adecuada con el fin de probar la deformación elástica de las células de levadura. Además de la obtención de la señal topográfica, este modo también permitió extraer el módulo de Young-s de la muestra y obtener un mapa en tiempo real para este valor. El módulo de Young, también llamado módulo de elasticidad, es un parámetro característico de cada material que caracteriza su comportamiento según la dirección en la que se aplica una fuerza. A fin de obtener resultados cuantitativos, la sonda de AFM se calibró individualmente (sensibilidad, la constante de muelle y el radio del ápice). La constante del resorte de los cantilevers se calibró mediante el método de *thermal noise* incorporado en el software. Se utilizó una punta SNL-10 (Bruker), constante nominal 0.35nN/nm). El punto de contacto para obtener el valor del módulo de Young-s fue determinado a partir de la aplicación del modelo de Derjaguin Muller Toporov (DMT).

### **3.2 Plan de trabajo: indicadores químicos del estado autolítico de las levaduras**

En la segunda parte de este estudio se ha aplicado la metodología de cromatografía líquida de muy alta eficacia acoplada a la espectrometría de masas-masas (UHPLC-MS-MS). Se ha escogido esta

técnica porque además de facilitar la separación de los analitos es muy eficaz en la identificación y cuantificación.

### 3.2.1 Muestreo

Los cavas utilizados para determinar la evolución de los nucleósidos a lo largo de la rima coinciden con las botellas separadas para el estudio de las lías (Figura 3.1). Por lo tanto, en cada punto de muestreo durante la crianza del cava (1, 3, 6, 9,13, 17, 21, 30, 39 y 48 meses), después de aislar las lías por centrifugación, el vino sobrenadante se ha utilizado para la determinación de las purinas y nucleósidos (Figura 3.3). No obstante, para garantizar que el contacto del vino con las lías es el único responsable de los cambios que puedan acontecer en el contenido de los nucleósidos, en el mes 9 de rima, se degüellan una parte de las muestras y aparecen unas nuevas series de cavas que se almacenan paralelamente a las series en rima, pero que ya no contienen lías (Figura 3.3). Así pues, a partir del mes 9 de rima, en cada punto de muestreo, y para los cavas (A y B), tenemos la misma muestra que ha estado todo el tiempo en contacto con las lías y la muestra sin lías. Estas últimas pueden considerarse como muestras comerciales de cava. La muestra de 13 meses de crianza biológica coincide en tiempo con la muestra comercial de 4 meses de almacenamiento después de los 9 meses de crianza biológica (9+4), la de 17 meses de crianza con la de 8 meses de almacenamiento (9+8), la de 21 meses con cava comercial de 12 meses (9+12), la de 30 meses de crianza con la de 21 meses de almacenamiento (9+21) y la de 48 meses de rima con la de 39 meses de vida comercial (9+39) (Figura 3.3).

Para la determinación de los índoles se ha utilizado otro muestreo puesto que las muestras anteriores no se resguardaron de la acción de la luz. En este caso se ha utilizado un amplio muestreo de cavas con diversos orígenes. La estrategia ha sido contraria a la anterior, es decir, si la autólisis provoca cambios en el contenido de los índoles, probablemente estos cambios se deben sólo al tiempo de autólisis, pero serán independientes de la cepa de levadura y del tipo de vino (Figura 3.4). Por esta razón se han recogido cavas de tres bodegas diferentes:

Freixenet, Segura Viudas y Castellblanch. Cada bodega ha proporcionado muestras de dos calidades diferentes y tiempos de crianza distintos (Figura 3.4). Estos cavas se diferencian en el tipo de vino base y en la cepa de levadura. En total 24 muestras de cava con tiempo de crianza perfectamente conocido. Por otra parte se han comprado 63 cavas comerciales, de los cuales se conoce aproximadamente la crianza a la que se han sometido por su calidad (cava joven, entre 9 y 14 meses, cava reserva entre 15 y 29 meses y cava gran reserva, más de 30 meses). Sin embargo, dada la falta de datos fiables del contenido de los índoles en vinos según la bibliografía consultada, también se ha incluido el análisis de 5 vinos base.

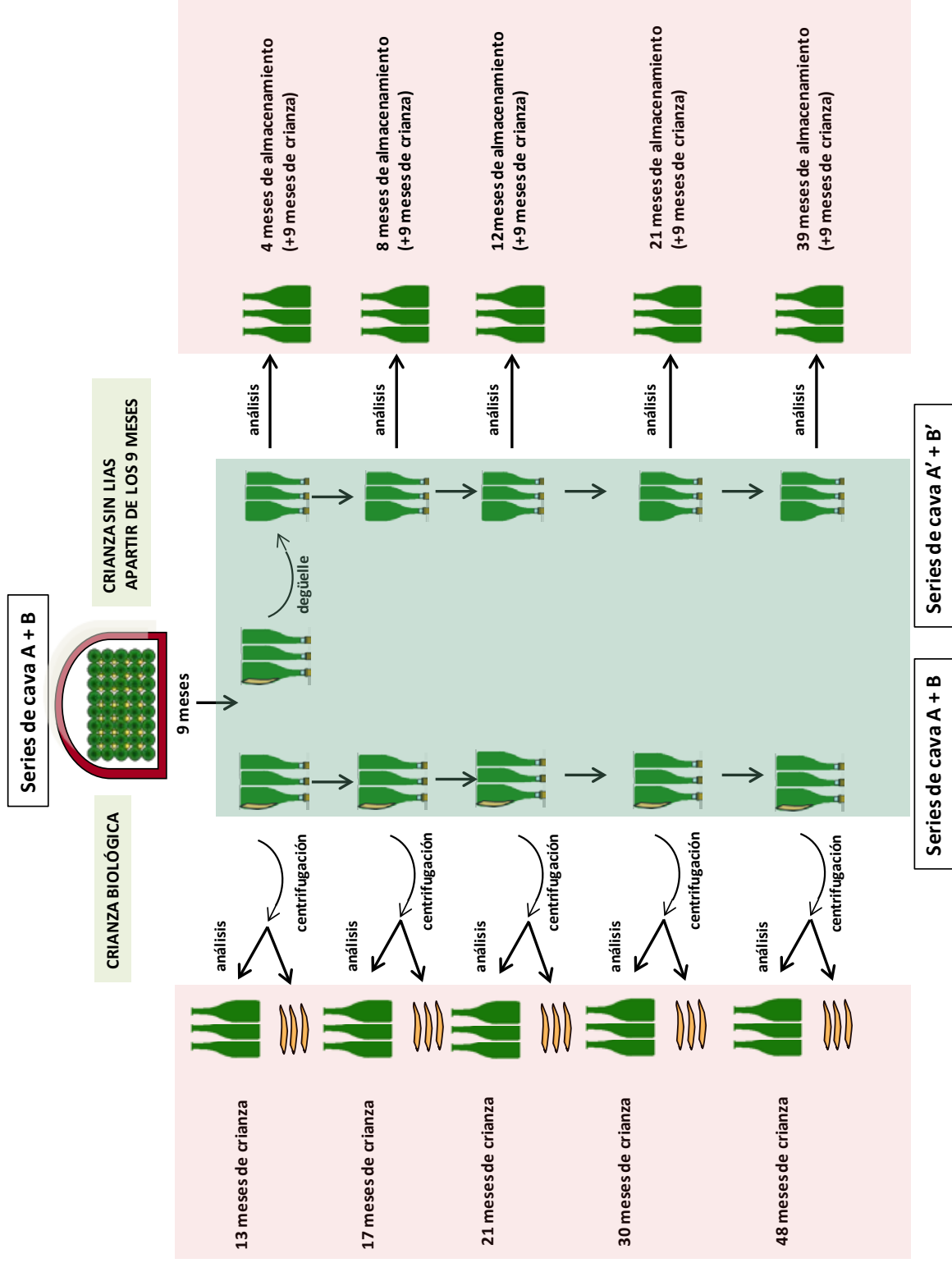
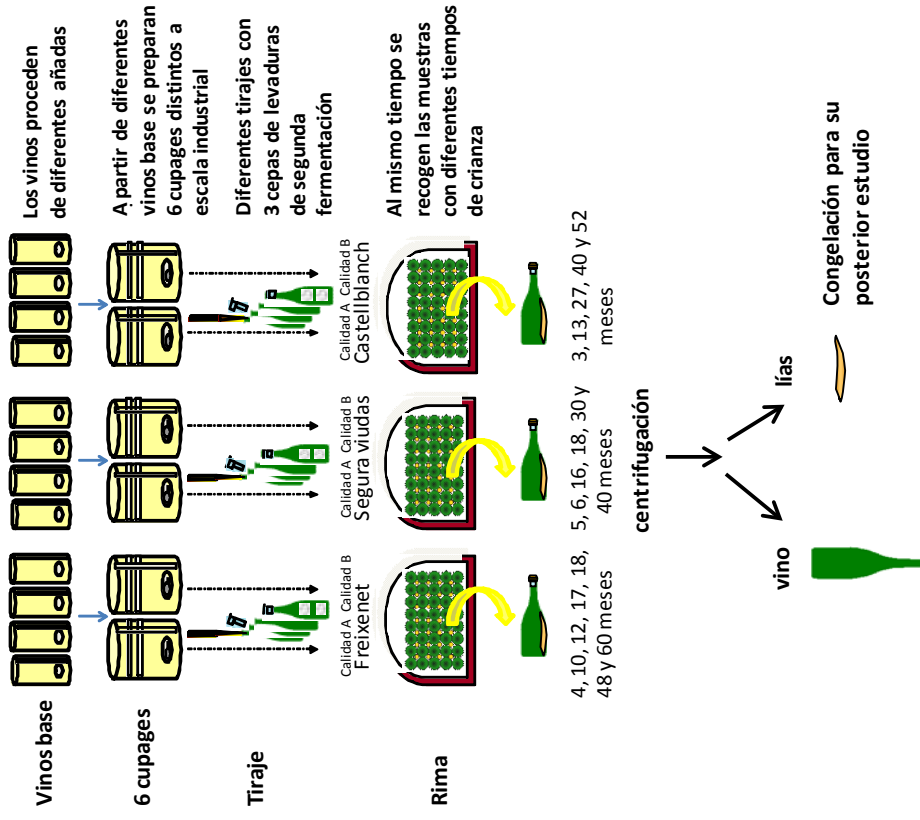


Figura 3.3: Muestreo para determinar la evolución de los nucleosidos a lo largo de la crianza.

**Muestras recogidas en bodega: tiempo de crianza exacto**



**Muestras compradas en el comercio: tiempo de crianza aproximado**



↓  
Análisis por UPLC MS/MS

3.4: Muestreo para la determinación de indoles en cavas.

### 3.2.2 UPLC MS/MS

La técnica UHPLC ha permitido, desde que surgieron los primeros equipos comerciales, un análisis más rápido y con mayor resolución que con las columnas convencionales. Permite aplicar una presión superior a los 500 bar, y el uso de columnas con una medida de partícula inferior a los 2  $\mu\text{m}$ .

Para nuestro estudio se ha utilizado un equipo Acquity Ultra-Performance™ liquid chromatography system (UHPLC) equipado con un sistema de bomba binaria (Waters, Milford, MA).

*Bomba y fase móvil:* Se ha utilizado un sistema de bomba binario. Las fases móviles se prepararon diariamente. Para el análisis de los catabolitos se llevó a cabo una elución isocrática (fase móvil constante) con acetonitrilo (ACN)/agua/ácido fórmico (5:94.9:0.1, v/v/v) con un caudal de 0.140 mL/min. Para el análisis de los índoles se llevó a cabo una elución en gradiente (cambia la composición de la fase móvil a lo largo del tiempo del análisis). El gradiente se llevó a cabo a partir de 95% de la fase móvil A (5: 94.9: 0.1 v/v/v acetonitrilo: agua: ácido fórmico) y un 5% de la fase móvil B (95: 4.9: 0.1 v/v/v acetonitrilo: agua: ácido fórmico) hasta llegar a un 25% de A en 8 minutos, con una velocidad de flujo de 0.125 mL/min.

*Inyección de la muestra* El volumen inyectado fue de 2  $\mu\text{L}$  y el inyector y los viales de la muestra se mantuvieron a 4 °C para el estudio de los catabolitos, mientras que para los índoles se inyectó un volumen de 8 $\mu\text{L}$  y las muestras se mantuvieron a 10 °C.

*Columna:* Se ha utilizado la columna cromatográfica BEH C18 Shield column (150 mm  $\times$  1.0 mm id) con un tamaño de partícula de 1.7  $\mu\text{m}$  (Waters, Milford, MA), a 40°C en el caso de los catabolitos de ARN y a 30°C en el caso de los índoles.

#### 3.2.2.1 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/z$ ). Estos equipos pueden ser utilizados tanto para análisis cualitativos como cuantitativos de diversas sustancias. La información estructural que ofrecen, junto con el tiempo de retención, permiten la identificación y la cuantificación de los compuestos comparando la información obtenida con patrones.

El acoplamiento de una columna cromatográfica a un espectrómetro de masas ha tenido que resolver varios problemas de compatibilidad mediante interfases como es el enorme contraste

que existe entre los volúmenes relativamente grandes de disolvente de la primera y los requerimientos de vacío de la última. Uno de los interfases que ha logrado un mayor éxito analítico es el interfaz API (*Atmospheric Pressure Ionization*) que engloba a todas las técnicas en la que los iones se forman a presión atmosférica. La API es una técnica de ionización blanda (producen relativamente poca excitación de los iones, de modo que, tiene lugar poca fragmentación, y los espectros son sencillos) que, al actuar a presión atmosférica, y no en alto vacío como es lo habitual en otras técnicas, consigue un altísimo rendimiento. Como interfase para HPLC, acepta todo el flujo procedente de un cromatógrafo líquido de alta presión convencional, de 1 a 4 mL/min, lo que incide favorablemente sobre la sensibilidad del proceso LC-MS. Dentro de las más recientes técnicas de API una de las modalidades básicas de interfase es la interfase de electrospray ESI que ha sido la utilizada en nuestro trabajo.

En la ionización ESI la muestra en solución se hace pasar por un capilar (electrodo) que está sometido a una diferencia de potencial de 1 a 5kV respecto al segundo capilar (electrodo auxiliar, *counter electrode*). Los iones de la muestra son conducidos por el efecto del campo eléctrico hasta el extremo del capilar, donde la muestra líquida forma un cono llamado cono de Taylor. Los iones, todos cargados con la misma polaridad, se acumulan en la superficie de la muestra líquida hasta que la fuerza de repulsión es más grande que la tensión superficial del líquido, momento en que multitud de pequeñas gotas (aprox 1  $\mu\text{m}$ ) altamente cargadas con iones, salen emitidas en forma de aerosol o spray. Muchos aparatos comerciales utilizan un flujo coaxial de nitrógeno para mejorar la formación del spray (gas de nebulización) cuando se trabaja con flujos de muestra líquida. El spray es conducido mediante el campo eléctrico hacia el segundo capilar que está al vacío. Una cortina de gas que arrastra las moléculas neutras y el ángulo en que están dispuestos los electrodos permiten que sólo entren las moléculas cargadas que están siendo arrastradas por el campo eléctrico. Una vez dentro del segundo electrodo o capilar, las gotas pierden volumen por desintegración y desolvatación, hasta que finalmente los analitos quedan ionizados en fase gaseosa. El segundo capilar se puede calentar eventualmente para facilitar la evaporación del solvente.

Para la separación de estos iones generados con diversas relaciones  $m/z$  existen diferentes métodos y analizadores. El tipo de analizador utilizado en nuestro estudio ha sido de triple cuadrupolo (TQ). Un cuadrupolo consta de cuatro rodillos circulares dispuestos en paralelo dos a dos en torno de un eje central. A cada uno de los rodillos se le aplica una corriente continua (DC) de forma que los rodillos opuestos presenten una misma polaridad: uno con voltaje positivo y el otro con voltaje negativo. Mediante la aplicación de dos campos eléctricos DC y un potencial de radiofrecuencia (RF), los iones que entran en el cuadrupolo comienzan a oscilar

en un plano perpendicular a la longitud de los rodillos, de forma que para una combinación de DC y RF dada, sólo los iones con una determinada relación  $m/z$  presentarán una trayectoria estable, podrán atravesar el cuadrupolo y llegar al detector. En el TQ el primer cuadrupolo Q1 y el tercero Q3 funcionan como filtro de masas y el segundo cuadrupolo Q2 funciona como celda de colisión (Figura 3.5).

Los TQ cuando operan en modo scan proporcionan una información espectral muy precisa sobre la identidad del producto, y en modo SIM (modo de selección de ión) proporcionan una excelente sensibilidad con una alta especificidad, lo que posibilita el análisis cuantitativo. Los diferentes modos de adquisición de las corrientes iónicas son: Barrido completo (full scan), Barrido de ion(es) seleccionado(s) (SIM, *Selected Ion Monitoring*), Barrido de ion-fragmento (*Product ion scan*), Barrido de ion-precursor (*Parent ion scan*), Barrido de fragmento neutro (*Constant neutral loss scan*), Monitoreo de reacción múltiple (*Multiple reaction monitoring*) (Figura 3.5).

### 3.2.2.2 Procedimiento

#### i Interfase

*Dispositivo de introducción de muestra.* En nuestro caso está acoplado *on-line* a un sistema cromatográfico UHPLC donde los analitos de la muestra han estado previamente separados.

*Ionización de la muestra.*

La fuente de ionización utilizada ha sido ZSpray electrospray (ESI) que ha operado en modo positivo para todos los indoles y la adenosina y en modo negativo para el resto de catabolitos (el haz de iones es positivo o negativo en función del voltaje aplicado al capilar).

Para la ionización de los catabolitos y los indoles la temperatura de la fuente se fijó en 130 °C. El voltaje del capilar se fijó en -2.5 kV y la temperatura de desolvatación se fijó en 350 °C. El flujo del gas del cono (nitrógeno) fue 25 L/h y para el gas de colisión (argón) el caudal fue 0.1 mL/min.



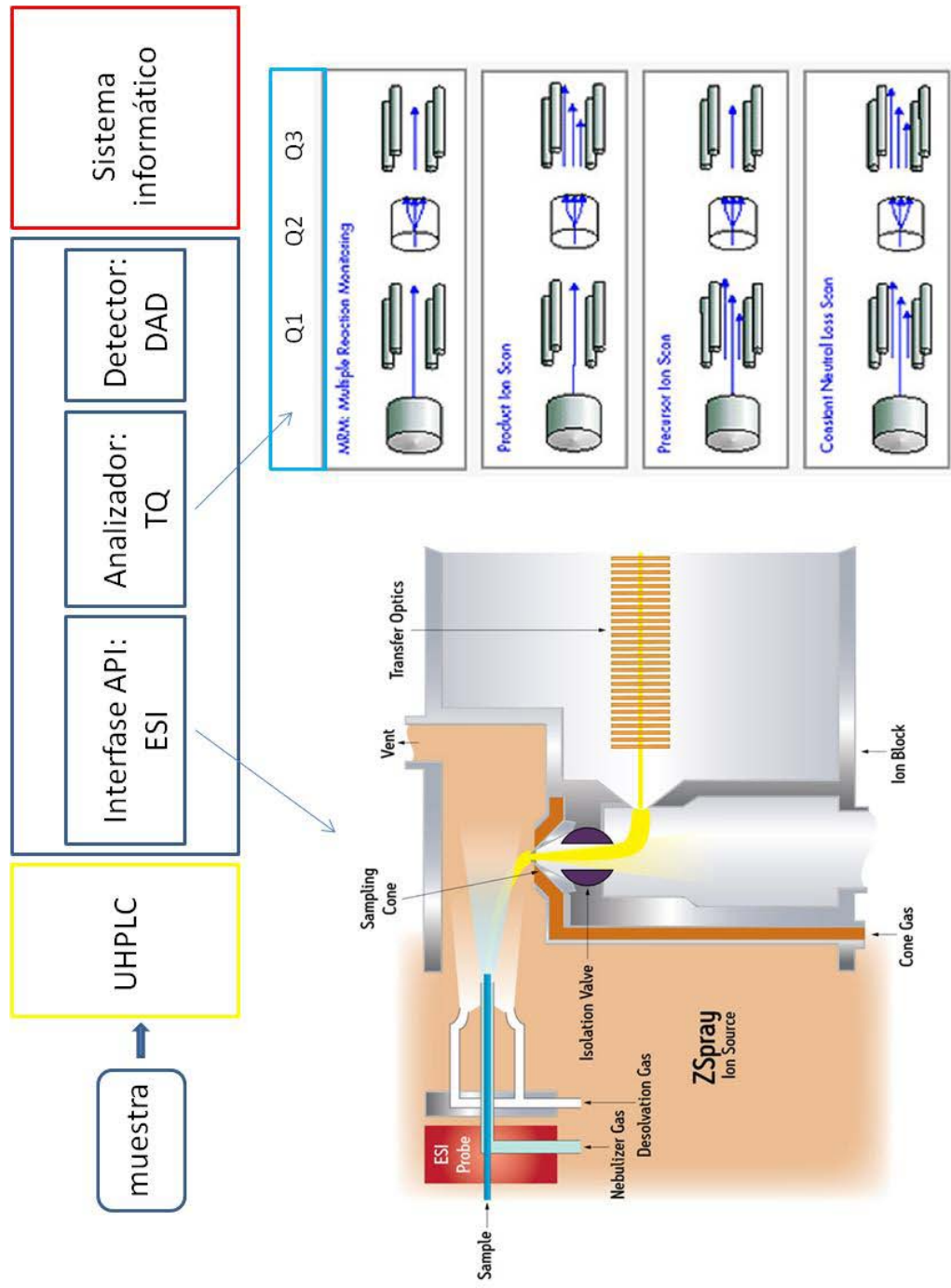


Figura 3.5: Esquema del equipo LC-API-MS.

## ii Analizador de masas

Para la cuantificación de índoles se ha utilizado el modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). También se realizaron experimentos MS/MS en modo Daughter Ions para estudiar los patrones de fragmentación de iones moleculares. Las condiciones MRM de transición se han optimizado con el "Autotune Wizard Software" mediante la infusión de soluciones estándar (10 mg/L) de cada compuesto. Dos transiciones MRM específicas de los iones moleculares desprotonadas fueron monitoreadas para cada compuesto (ion cuantificador y un ión cualitativo). Los índoles fueron identificados comparando su tiempo de retención y las transiciones MS/MS con los obtenidos a partir de soluciones estándar puros.

Adquisición e integración de datos fueron controlados por software MassLynx™ (versión 4.0).

## iii Detector

Los iones analizados al pasar por la superficie del detector crean una señal que se transmite eléctricamente para crear los espectros de masa. La detección se llevó a cabo mediante el uso de una red de diodos (DAD) acoplado en serie con el TQD.

### **3.3 Referencias bibliográficas**

Bozzola, J. J., Russell, L. D., 1999. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Jones & Bartlett Publishers.

Dufrêne, Y.F., 2003. Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology. *Current Opinion in Microbiology* 6, 317-23.

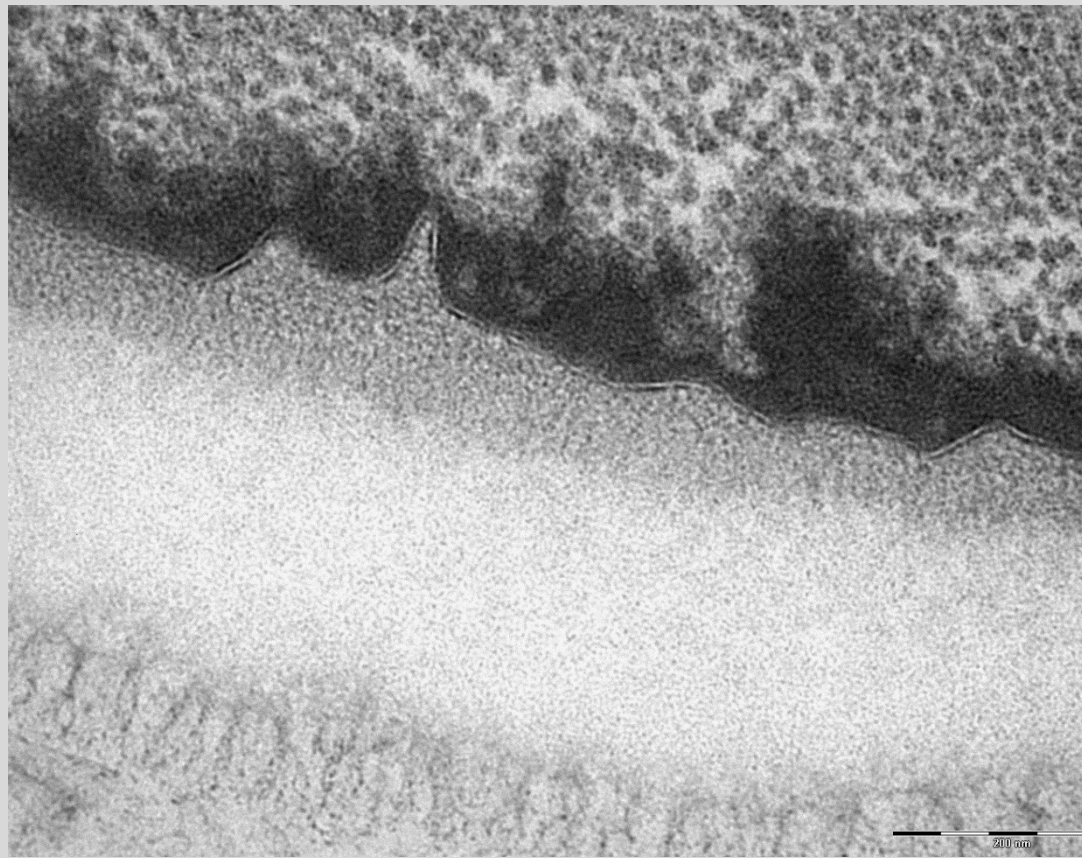
Gaboriaud, F., Dufrêne, Y.F., 2007. Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 54, 10-9.

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.

Moor, H., 1987. Theory and practice of high-pressure freezing. In Steinbrecht R. A., Zierold K., (Ed.), *Cryo-techniques in Biological Electron Microscopy*, (pp 175-191) Berlín, Alemania: Springer.



# Capítulo 4



## 4. Resultados y discusión



## 4. Resultados y discusión

---

Este capítulo se ha ordenado siguiendo el mismo modelo del apartado 3 correspondiente a la metodología y Plan de Trabajo, el cual a su vez responde a los dos objetivos planteados en el trabajo:

1. Caracterizar los cambios ultraestructurales y morfológicos de las lías durante la larga crianza biológica de los cavas.
2. Definir posibles indicadores químicos en el vino que se relacionen con el tiempo de crianza y con el grado de degradación de las lías y, que se puedan utilizar para controlar objetivamente el envejecimiento de los cavas.

Los resultados del primer objetivo se encuentran en el apartado 4.1. Las observaciones correspondientes a los cambios ultraestructurales y morfológicos de las lías se encuentran en la publicación del *FEMS Yeast Research* de 2012 (apartado 4.1.2), mientras que los datos cuantitativos de las propiedades superficiales de las lías se exponen en el apartado 4.1.3.

Los resultados del segundo objetivo están distribuidos entre el apartado 4.2 y 4.3. Primero se trata el análisis y la evolución durante la crianza del cava de los catabolitos de ARN, puesto que las muestras de vino son las mismas que las utilizadas en el estudio de los cambios morfológicos y ultraestructurales de las lías (Figuras 3.1 y 3.3). Además, estos resultados también han sido publicados, en este caso en la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* en 2013 (apartado 4.2.2). Los otros indicadores incluidos en el trabajo, los indoles, debido a su fotosensibilidad y que las muestras anteriores no se habían protegido de la luz, han requerido otro muestreo (Figura 3.4). Por otra parte, debido a las contradicciones de los pocos autores que han determinado en vinos melatonina y sus isómeros, así como otros metabolitos relacionados con su metabolismo, y a la propuesta de diversos métodos de análisis (apartado 4.3.2), primero se ha puesto a punto un método fiable para su determinación (publicación enviada, apartado 4.3.3.1) y después se ha aplicado a muestras de crianza conocida (apartado 4.3.3.2). Además, dada la novedad de la melatonina en Enología, se ha incluido un apartado (4.3.1) donde se exponen el origen y las funciones, así como las posibles vías metabólicas a fin de esclarecer los metabolitos relacionados.

## **4.1 Cambios ultraestructurales de las lías del cava durante el envejecimiento en condiciones enológicas reales**

Estos cambios se han abordado desde dos vertientes, por un lado se ha aplicado la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) a fin de describir los cambios observados en las células muertas de las levaduras a lo largo de la crianza; mientras que la microscopía de fuerza atómica (AFM) ha permitido relacionar los cambios de la ultraestructura celular con propiedades superficiales de las lías como la topografía y la elasticidad. El apartado recoge todos los datos obtenidos, los de la microscopía electrónica de transmisión que ya están publicados (*FEMS Yeast Research, 2012*) y cuyo resumen se encuentra en el apartado 4.1.1, y los de la aplicación de la AFM que están comprendidos en el apartado 4.1.3.

### **4.1.1 Resumen**

**Tudela, R.,** Gallardo-Chacon, J.J., Rius, N., López-Tamames, E., Buxaderas, S., 2012. Ultrastructural changes of sparkling wine lees during long-term aging in real enological conditions. *FEMS Yeast Research*, 12, 466-476.

El objetivo de este estudio es profundizar en el conocimiento de los cambios ultraestructurales que sufren las lías de segunda fermentación en contacto con el cava durante la crianza. Para alcanzar este objetivo se han elaborado tres series de cava a escala industrial, cuya crianza ha tenido lugar en condiciones enológicas reales en las Bodegas Freixenet. Estos tres cavas se diferencian en el tipo de vino base con el que han sido elaborados, pero la cepa de levaduras utilizada para la toma de espuma ha sido la misma.

Las levaduras, con diferentes tiempos de envejecimiento (hasta 48 meses), se han fijado y visualizado utilizando la técnica de criofijación por alta presión (*High Pressure Freezing, HPF*), seguida de criosustitución (*Freeze-substitution, FS*) en combinación con microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se ha observado que a lo largo del envejecimiento la pared celular de las lías ha perdido la estratificación que se visualizó en las levaduras del pie de cuba (una capa interior amorfa electrotransparente a los electrones y una capa exterior fibrosa electrodensa a los electrones). Concretamente a los 9 meses, el desprendimiento completo de la membrana plasmática, acompañado de la plasmólisis de las células, permitió observar que la capa interna de la pared celular también consistía en dos capas diferentes: una capa microfibrosa que se extendían hacia el espacio periplásmico y una matriz amorfa. A 18 meses de crianza, el material microfibroso de la pared celular

aparece más difuso y la zona media amorfa del interior de la pared parece estar degradada. A partir de los 30 meses en adelante, la pared celular se ha convertido en una estructura desordenada de fibras electrodensa a los electrones. A pesar de estos cambios, la pared celular de las levaduras se mantuvo sin romperse hasta los 48 meses de envejecimiento del vino. Sin embargo sí que se observó por primera vez en las lías la rotura de la membrana celular. También aumentó el tamaño del espacio periplásmico como consecuencia de la plasmólisis celular y una progresiva desorganización y vaciado del contenido citoplásmico durante el envejecimiento. Se detectó evidencia morfológica de macroautofagia y por primera vez de microautofagia en condiciones enológicas.

#### Aportaciones más relevantes

- Se detectó por primera vez evidencia morfológica de microautofagia en *S. cerevisiae* en condiciones enológicas.
- La estructura estratificada de la pared celular desaparece a lo largo del tiempo de crianza. La zona media amorfa del interior de la pared se va degradando a partir de los 18 meses de envejecimiento y el material microfibrroso aparece más difuso. A partir de los 30 meses en adelante, la pared de la célula se presenta como una estructura enmarañada de fibras, aunque se mantiene sin roturas a lo largo de los 48 meses de crianza. Sin embargo, sí se observaron roturas en la membrana plasmática.
- Debido a la autólisis las lías presentan una gran pérdida y desorganización de los contenidos intracelulares que aumenta a lo largo del envejecimiento.





# Ultrastructural changes of sparkling wine lees during long-term aging in real enological conditions

Rebeca Tudela<sup>1</sup>, Joan J. Gallardo-Chacón<sup>2</sup>, Núria Rius<sup>3</sup>, Elvira López-Tamames<sup>1</sup> & Susana Buxaderas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Nutrició i Bromatologia, Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments (XaRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Institut Universitaire de la Vigne et du Vin 'Jules Guyot', EA 581 EMMA, Université de Bourgogne, Dijon, France; and <sup>3</sup>Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

**Correspondence:** Núria Rius, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 402 4497; fax: +34 93 402 4498; e-mail: nrius@ub.edu

Received 16 August 2011; revised 20 December 2011; accepted 5 March 2012. Final version published online 2 April 2012.

DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00800.x

Editor: Isak Pretorius

## Keywords

*Saccharomyces cerevisiae*; sparkling wine; yeast lees; ultrastructure; autolysis; autophagy.

## Abstract

Ultrastructural changes of lees of three series of sparkling wines produced using the traditional method during long-term aging (4 years) were assessed by high-pressure freezing in combination with transmission electron microscopy. The stratified structure of the cell wall disappeared throughout aging. After 18 months, the microfibrinous material of the cell wall appeared more diffuse and the amorphous midzone of the inner wall layer was progressively degraded. From 30 months onward, the cell wall consisted of a tangled structure of fibers. In spite of these changes, the cell wall of yeasts remained unbroken at 48 months of wine aging. Cell membrane breakage was observed for the first time in lees of *Saccharomyces cerevisiae*. An increase in the thickness of the periplasmic space owing to plasmolysis and of the number of cells with less cytoplasmic content was observed during aging. Morphological evidence of microautophagy was detected for the first time in *S. cerevisiae* in enological conditions.

## Introduction

Sparkling wines are distinguished from other wines because they undergo two fermentation processes: grapes must ferment to produce wine and then, after the addition of the *tirage liquor*, the wine itself is fermented. They also undergo biological aging which consists of leaving the lees of the second fermentation in contact with the sparkling wine in the same bottle or tank where the fermentation is carried out (Official Journal of the European Union L 148/47). Biological aging duration varies, but for quality sparkling wines of European origin (e.g. Champagne in France, Cava in Spain, Sekt in Germany, and Franciacorta, Asti, and Prosecco in Italy) it usually takes anywhere from a few months to several years. In the case of Cava, the minimum aging period is 9 months, with 15 months for the Reserve and 30 months for the Great Reserve. Biological aging gives to these wines particular organoleptic characteristics owing to their contact with the lees. It is assumed that the sensorial profile acquired by these wines is because of the autolytic process of cells dur-

ing aging (Torrens *et al.*, 2010). Many researchers have tried to connect the changes observed in the sparkling wine during aging with autolysis by analyzing the evolution of many compounds in the wine over time. When an increase was observed in the content of cell compounds, such as proteins, peptides, amino acids, fatty acids, polysaccharides, etc., during aging, it was suggested that the cells had released these compounds into the wine as a result of cellular self-destruction (Feuillat & Charpentier, 1982; Moreno-Arribas *et al.*, 1996; Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2002; Gallart *et al.*, 2002; Charpentier *et al.*, 2005; Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2008; Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009). Other compositional changes were postulated as a result of the activity of enzymes released by the dead cells (Leroy *et al.*, 1990; Alexandre *et al.*, 2001).

Although induced autolysis is widely used (Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2002; Zhao & Fleet, 2003, 2005; Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006), few studies focusing on autolysis have been made during the evolution of sparkling wine fermented and aged in the bottle, and under real bio-

logical aging conditions, temperature often below 15 °C and under a carbon dioxide pressure of 6 atmospheres (Piton *et al.*, 1988; Leroy *et al.*, 1990; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2001). These biological aging conditions of sparkling wines are far from the optimal conditions of yeast autolysis (pH 5.0, and temperature 45 °C) (Charpentier, 2010).

In the last 20 years, enological additives have been developed based on inactive dry yeast with technological and sensorial purposes (Poza-Bayón *et al.*, 2009a, b). The development of these products has advanced the knowledge of the structural composition of the wall and other cellular organelles, as well as many of the structural changes suffered by the dead yeast cells when autolysis was induced. However, most of these studies were carried out in model wines where lees were subjected to accelerated autolysis. Such induced autolysis was not comparable with the natural autolysis that occurs during the biological aging of sparkling wines, as has been reported by Martínez-Rodríguez *et al.* (2001).

There is a single published study on the structural changes of the second fermentation lees of a bottle-fermented sparkling wine during long-term aging. Piton *et al.* (1988) used thin-section electron microscopy to observe the structural changes of lees from some champagne bottles with different aging. These authors observed that most aged lees have a thinner wall than younger dead cells and that even in one 7-year-old sample the cell wall of the lees remained unbroken.

The aim of this study was to demonstrate the evolution of structural changes and cellular degradation of lees during long-term aging in real enological conditions. For this purpose, high-pressure freezing (HPF) in combination with transmission electron microscopy (TEM) was used to monitoring the ultrastructural changes of lees of three series of sparkling wines produced with the same *Saccharomyces cerevisiae* strain and aged for 4 years in bottles.

## Materials and methods

### Sampling

Three sparkling wines series from three different blends were produced on an industrial scale at Freixenet S.A. winery using the traditional method. The three base wines were bottled after the addition of the same '*liqueur de tirage*'. This liqueur is composed of  $1\text{--}2 \times 10^6$  yeast cells mL<sup>-1</sup> (yeast starter), 500 g L<sup>-1</sup> of sucrose, 0.1–0.2 g L<sup>-1</sup> of bentonite, and ammonium phosphate (50 mL hL<sup>-1</sup>). Taking into account that approximately 40–42 mL of '*liqueur de tirage*'/750 mL bottle is added, each bottle receives between 20 and 21 g of sucrose (Flanzy *et al.*, 1999). The *S. cerevisiae* F11 strain belongs to the private collection of Freixenet S.A. winery. Cava series (500 bottles of 750 mL × 3 series)

were stored in the cellar for 48 months during the second fermentation '*prise de mousse*' and aging. Three bottles of each series were taken at 1, 9, 13, 18, 21, 30, and 48 months after bottling. These sampling points were selected according to representative aging periods of Cava categories: (1) Cava (≥ 9 months), (2) Reserve (≥ 15 months), and (3) Great Reserve (≥ 30 months). In addition, a yeast starter sample for the second fermentation was collected as a reference to recognize the ultrastructures of living cells (time 0).

### Isolation of lees

The lees were prepared as follows: the content of three bottles (750 mL each) was centrifuged at 8350 g for 15 min at 4 °C using a Centrikon T-124 centrifuge (Kontron Instruments, Cumbernauld, UK); the pellet was washed three times with 30 mL of NaCl 0.9% (Panreac, Barcelona, Spain) (Leroy *et al.*, 1990).

### Transmission electron microscopy

Lees pellets were selected under a stereomicroscope and transferred to 1.5 mm diameter and 200-µm deep planchettes and immediately cryoimmobilized using a Leica EM-Pact high-pressure freezer (Leica, Vienna, Austria), and then stored in liquid nitrogen until further use (Nevot *et al.*, 2006). After rapid freezing, specimens were freeze-substituted in anhydrous acetone containing 2% osmium tetroxide and 0.1% uranyl acetate at –90 °C for 3 days. They were gradually warmed to room temperature at a temperature progression rate of 5 °C h<sup>-1</sup>. After several acetone rinses, the samples were embedded in epon resin. The epon was then polymerized for 48 h at 60 °C (Walther & Ziegler, 2002). Ultrathin sections were cut using a Leica Ultracut UCT ultra microtome, mounted on formvar-coated copper grids and poststained with 2% uranyl acetate in water and lead citrate (Bozzola & Russell, 1999). The ultrathin sections were observed with a Tecnai Spirit electron microscope (FEI Co, Hillsboro, OR) at an accelerating voltage of 120 kV. On average, 10 overview and approximately 55–65 detailed electron micrographs for each sample point were taken.

Identification of yeast organelles and structure has been carried out on the basis of the TEM recognition studies on living cells reported by Wright (2000), Walther & Ziegler (2002), Giddings (2003), Osumi *et al.* (2006), and Yamaguchi *et al.* (2011).

## Results and discussion

HPF in combination with TEM was used to study the ultrastructural changes in yeast cells along with sparkling wine aging on lees. Cryofixation by HPF preserves cell

ultrastructure close to the normal living state because the intrinsic cell water turns into vitreous ice and the cell content is rapidly and efficiently immobilized (Studer *et al.*, 2008).

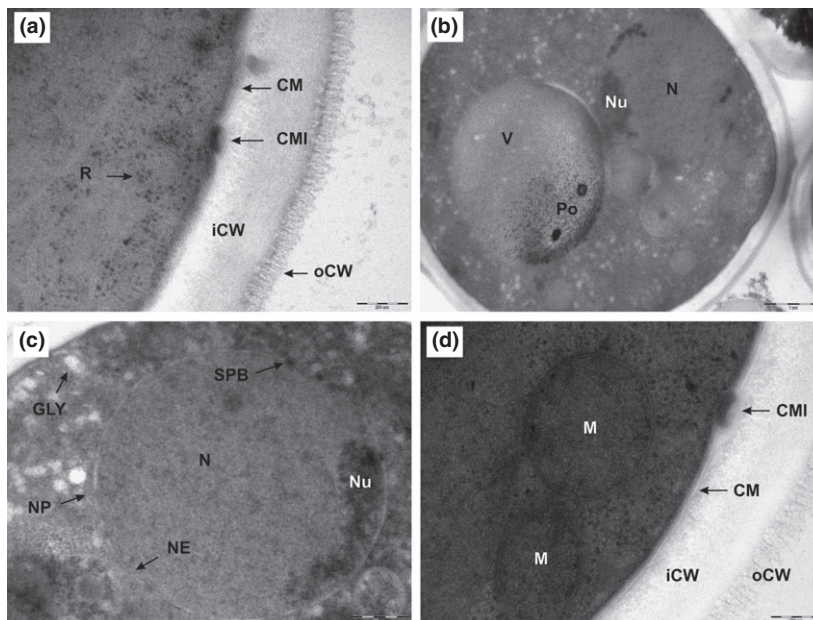
No differences were observed among the lees of the three series of cava (data not shown), although the base wines were different.

The ultrastructure of the *S. cerevisiae* strain used in this study is shown in Fig. 1 (time 0). The cell wall consisted of an amorphous electron-transparent inner layer (iCW) and an electron-dense outer layer (oCW) (Fig. 1a and d) (Walther & Ziegler, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2011). Branched  $\beta$ 1,3-glucan chains containing  $\beta$ 1,6-linked glucose residues could be part of the amorphous layer (AL). The outer layer is observed as an accumulated microfibrillar material that extends into the medium. It consists predominantly of mannoproteins. Enzymes and other proteins are physically entrapped in the wall (Kopecká *et al.*, 1974; Cid *et al.*, 1995; Lipke & Ovalle, 1998; Klis *et al.*, 2002, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2011). Figure 1b and c reveal the nucleus (N), nucleolus (Nu), nuclear pore (NP), spindle pole body (SPB), and the nuclear envelope (NE) (Wright, 2000; Walther & Ziegler, 2002; Osumi *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2011). Ribosomes (R) (Fig. 1a) (Osumi *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2011), a large vacuole (V) with polyphosphate aggregates (Po) (Fig. 1b), glycogen granules (GLY) (Fig. 1c) (Osumi,

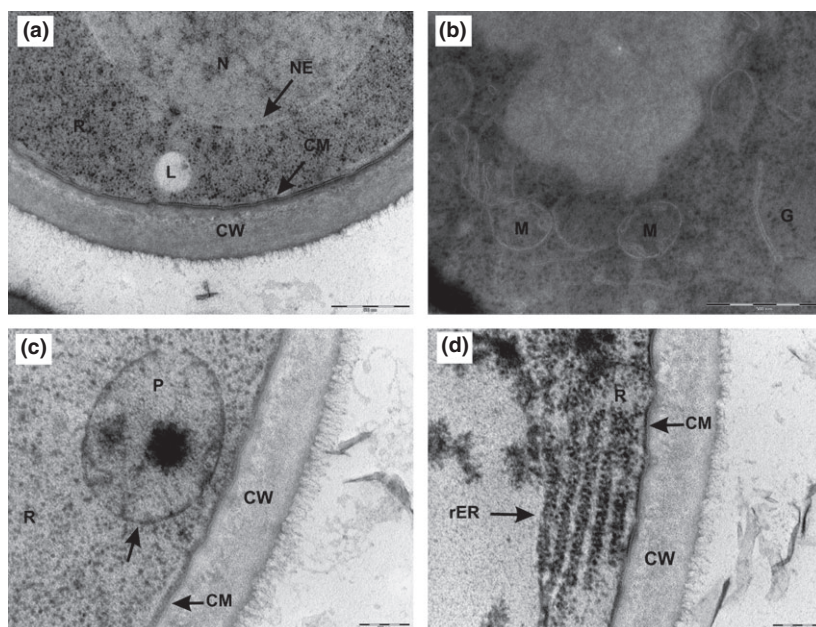
1998), and mitochondria (M), cytoplasmic membrane (CM) and invagination of cell membrane (CMI) (Fig. 1a and d) can also be observed (Walther & Ziegler, 2002; Giddings, 2003; Osumi *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2011).

### Ultrastructure of yeasts during second fermentation

Figure 2 shows ultrathin sections of *S. cerevisiae* harvested after 1 month of fermentation in the bottle. Yeast cells at this stage are similar in appearance to yeast starter cells (Fig. 1). No signs of autolysis were observed. The cell wall maintained its two-layer structure attached to the CM, and both the NE and the CM were visible (Fig. 2a, c and d) (Wright, 2000; Walther & Ziegler, 2002; Osumi *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2011). Many cytoplasmic organelles can be discerned; ribosomes (R) (Fig. 2a, c and d) (Osumi *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2011); mitochondria (M) with very few cristae, typical of yeasts in anaerobiosis (Piton *et al.*, 1988), and the bilayer structure of the membrane comprising yeast Golgi cisternae (G) (Fig. 2b); a lipid body (L) (Fig. 2a); a peroxisome (P) (Fig. 2c); and many endoplasmic reticulum structures with many ribosomes (rER) (Fig. 2d) (Giddings, 2003; Osumi *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2011).



**Fig. 1.** TEM images of *Saccharomyces cerevisiae* cells cryofixed by HPF. Note that cell structures were well preserved in a natural state. Bars: (a) 200 nm, (b) 1  $\mu$ m, (c) 500 nm, and (d) 200 nm. CM, cell membrane; CMI, cell membrane invaginations; CW, cell wall; iCW, inner cell wall; oCW, outer cell wall; cyt, cytosol; rER, rough endoplasmic reticulum; G, Golgi apparatus; Gly, glycogen granule; L, lipid droplet; M, mitochondrion; N, nucleus; NE, nuclear envelope; NP, nuclear porus; Nu, nucleolus; P, peroxisome, Po, polyphosphate; PS, periplasmic space; R, ribosome; SPB, spindle pole body; V, vacuole; ve, vesicle.



**Fig. 2.** Ultrathin sections at high magnification of *Saccharomyces cerevisiae* lees after 1 month of bottling. Bilayered structure of cytoplasmic (CM), nuclear envelope (NE), mitochondrion (M), and Golgi (G) membranes is well distinguished. Bars: (a and b) 500 nm, (c and d) 200 nm.

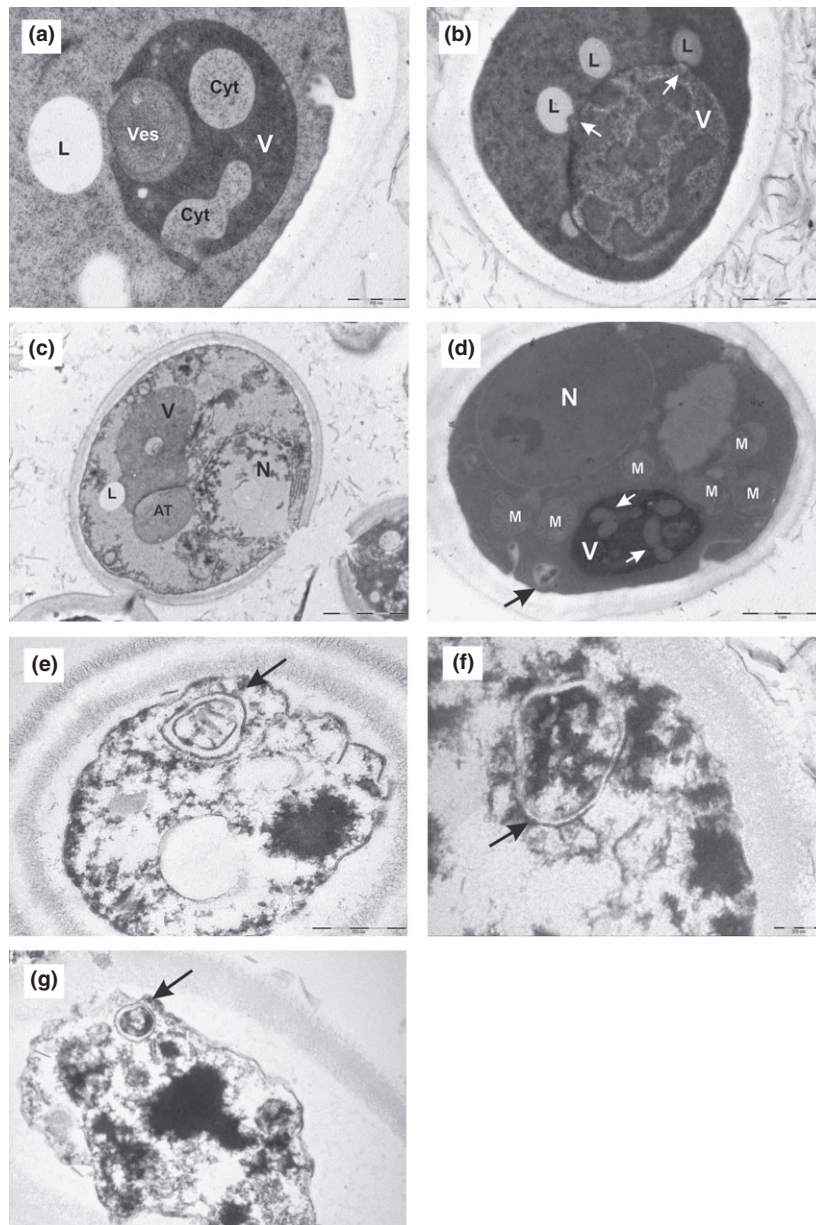
### Autophagy of yeasts

Evidence of microautophagy and macroautophagy was detected in sparkling wine lees (Fig. 3). In cells harvested at 1 month of bottling, we were able to observe a large vacuole (V) that formed arm-like extensions of its membrane engulfing a vesicle (ves) (Fig. 3a) and lipid bodies (L) (Fig. 3c). Fusion and concomitant sealing of this growing membrane will result in the incorporation of the vesicle and the lipid body into the vacuole. This microautophagic process has been described for peroxisome degradation in *Pichia pastoris* (Mijaljica *et al.*, 2007; Kraft *et al.*, 2009). Figure 3a also showed a nonselective autophagy process by which bulk cytosol (cyt) was taken up by tubular invaginations of the vacuole. Lipid bodies (L) were also assimilated by arm-like protrusions (Fig. 3b, arrows) of the vacuole surface. A similar microautophagic process was postulated by Kraft *et al.* (2009) to take up large cytosol components in starved *S. cerevisiae* cells in laboratory conditions. Figure 3c shows a yeast cell whose vacuole has formed an autophagic tube (AT). Vacuolar invaginations in nitrogen-starved *S. cerevisiae* cells were visualized with the viability dye FM 4-64 under a confocal laser scanning microscope by Mijaljica *et al.* (2007). These authors observed that membrane vacuolar invaginations formed AT that disappeared within one hour of labeling with FM 4-64, leaving a diffuse stain in the vacuole. They suggested that an ‘inverse-budding’ reaction of the AT maybe related to the regulation of vacuolar

membrane homeostasis. We propose that the vacuole of the cell shown in Fig. 3c was undergoing a similar microautophagic process to control its own homeostasis. To our knowledge we showed here, for the first time, morphological evidence of industrial *S. cerevisiae* undergoing microautophagy during real sparkling wine aging.

An autophagosome near the vacuole (Fig. 3d, black arrow) and autophagic bodies were observed inside the vacuoles of *S. cerevisiae* cells (Fig. 3d, white arrows), confirming the findings of Cebollero & Gonzalez (2006) that macroautophagy was also induced during the second fermentation of wine in a closed bottle. Samples taken after 1 month of bottling were filled with living cells that were undergoing autophagy but not yet autolysis. Our results agree well with those reported by Cebollero & Gonzalez (2006) that autophagy takes place before autolysis. The detection of a single and reminiscent autophagosome in the cytoplasm of cells at 13, 21, and 30 months of aging (Fig. 3e, f and g, respectively) could be owing to the resistance of bilayered membranes to degradation (see Evolution of cell cytoplasm lees).

After 1 month of bottled fermentation, *S. cerevisiae* had reached the stationary phase (data provided by Freixenet S.A.), and the growth arrest is the consequence of depletion of nutrients and high levels of ethanol (Bauer & Pretorius, 2000). At this stage, different autophagy processes might be induced to control cellular homeostasis and to contribute to the outcome of autolysis in enological conditions.

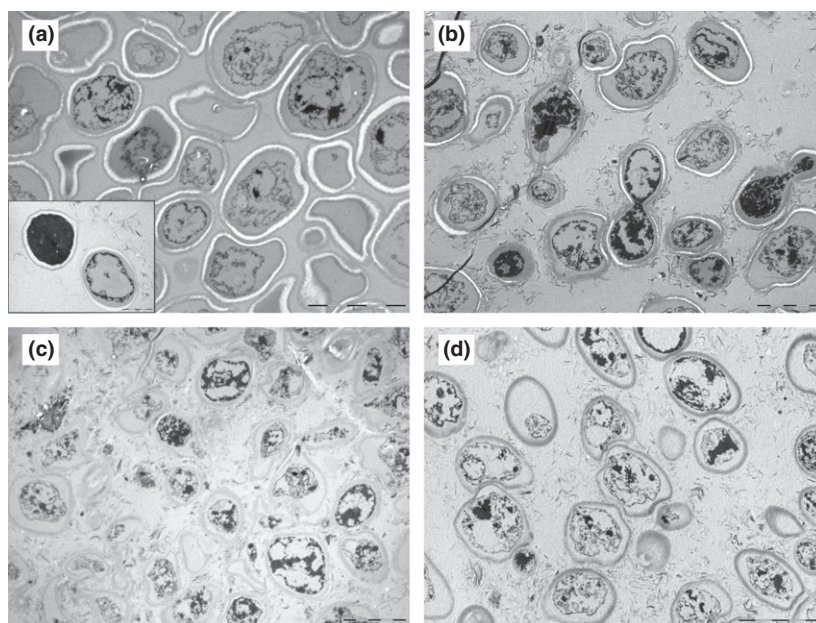


**Fig. 3.** Micrographs of lees showing different types of autophagy. (a–d) cells harvested after 1 month of fermentation. (a and b) Microautophagy: the sequestration event occurs at the surface of the vacuole (see text for explanation); (c) vacuole self-degradation by forming an AT; (d) the yeast vacuole contains many autophagic bodies (white arrows), an autophagosome (black arrow) is observed in the cytoplasm of the cell; and (e–g) dead cells harvested at 13 months (e), 21 months (f), and 30 months (g) of aging with an autophagosome (arrows). Bars: (a) 500 nm, (b) 1  $\mu$ m, (c) 2  $\mu$ m, (d) 1  $\mu$ m, (e) 500 nm, (f) 200 nm, (g) 500 nm.

### Autolysis of yeasts

Lees samples harvested at 9, 18, 30, and 48 months after bottling are shown in Fig. 4a, b, c and d, respectively. From the ninth month onward, most of the cells were plasmolysed; a double CM completely detached from the cell wall was observed (Fig. 4). Although samples were collected after 9 months of bottling to make sure that

cells were undergoing autolysis (Charpentier & Feuillat, 1993; Todd *et al.*, 2000), we detected some cells that apparently had not yet begun. Figure 4a insert shows two yeast cells of the same preparation taken at 9 months. One of them (left) is not yet plasmolysed. Yeast autolysis is a slow process associated with cell death, and involves intracellular hydrolytic enzymes that act to release cytoplasmic and cell wall compounds into the wine (Babayan



**Fig. 4.** Low magnification view of ultrathin sections of sparkling wine lees harvested at 9 months (a), 18 months (b), 30 months (c), and 48 months (d) of aging. (a, insert) a completely intact cell was detected after 9 months of aging. Bars: (a–d) 5  $\mu\text{m}$ , (a, inside) 2  $\mu\text{m}$ .

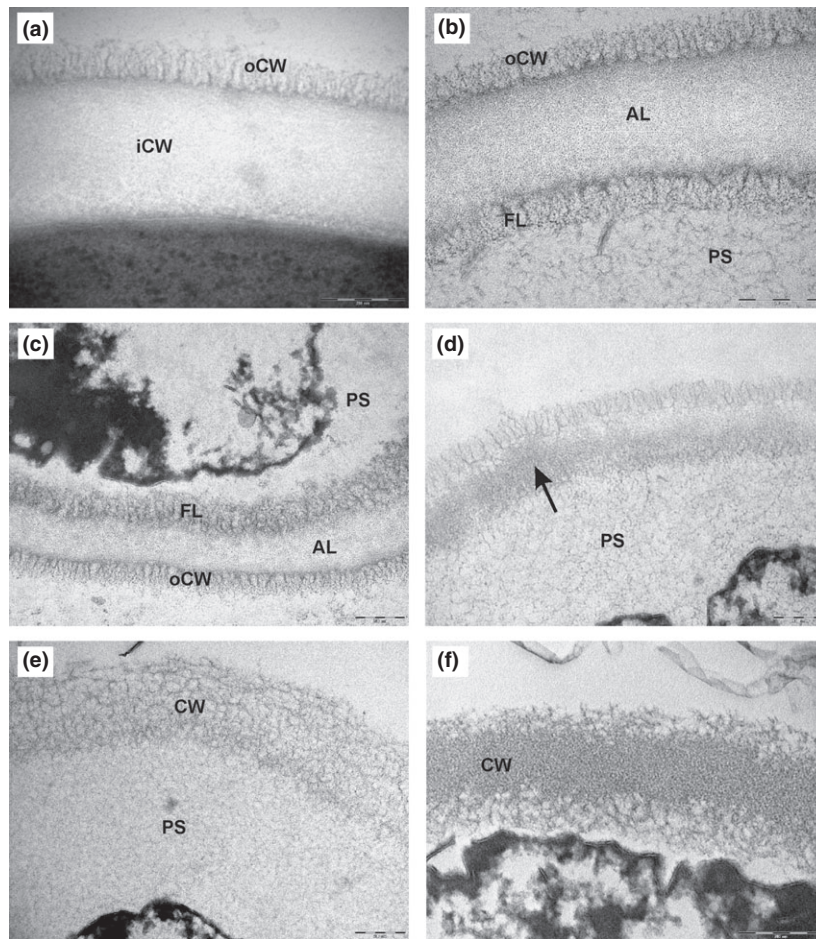
& Bezrukov, 1985). The low temperature at which the aging process in the bottle takes place causes a low death rate and low enzymatic reaction rates, explaining the slowness of the yeast autolysis. Changes in the cell wall were more homogeneous within cells of the same age than the degradation of cytoplasmic material, as can be seen in Fig. 4.

### Evolution of the cell walls

Figure 5 shows micrographs (200 nm of magnification) of thin sections of yeasts cells after 1, 9, 13, 18, 30, and 48 months of aging. These micrographs confirmed that the cell wall of the yeasts remained unbroken throughout autolysis. As stated above (Ultrastructure of yeasts during second fermentation) after 1 month of bottling, the cell wall maintained its two-layer structure consisting of an amorphous inner layer (iCW) and a fibrous outer layer (oCW) (Fig. 5a). At 9 months, the complete detachment of the CM accompanying the plasmolysis of the cells enabled the identification of the stratified structure of the *S. cerevisiae* cell wall (Fig. 5b). The HPF technique used in this study improved the quality of the micrographs enabling us to observe that the inner layer of the cell wall (iCW) also consisted of two different layers: a microfibrillar layer (FL) and an AL. The fibrous layer (FL) was formed of a homogeneous structure of very tight electron-dense microfibers that extended to the periplasmic space (PS). The midzone of the cell wall was observed as an

amorphous matrix (AL). The outer cell wall layer (oCW) in cells of samples taken at 9 and 13 months of bottling presented the same microfibrillar structure as the yeast starter (Fig. 5b and c), and disappeared throughout aging (Fig. 5e and f). After being bottled for 18 months the microfibrillar material of the cell wall appeared more diffuse and the midzone seemed to be degraded, making both fibrous layers fuse (Fig. 5d, black arrow). From the 30th month onward, the walls consisted of a tangled structure of electron-dense fibers (Fig. 5e and f). It was also possible to distinguish dark spots in the walls of cells at 48 months of aging (Fig. 5f). Based on the wall structure schemes proposed by Lipke & Ovalle (1998) and Osumi (1998) and on the fact that uranyl ions react strongly with phosphate and amino groups (Bozzola & Russell, 1999), we believe that these electron-dense spots could be protein deposits.

Given our results we think that cell wall degradation during autolysis in real conditions could be summarized as follows: (1) the amorphous midzone is progressively degraded (Fig. 5), probably due to the activity of glucanases that hydrolyzed glucans, thus releasing mannoproteins such as flocculation proteins (Bony *et al.*, 1997; Klis *et al.*, 2002); (2) residual activities of glucanases released glucans (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006), provoking the inner layer to lose its microfibrillar continuous structure (Fig. 5d, e and f); (3) at long-term aging (Great Reserve Cava), the inner and the outer layer of the cell wall formed a tangled structure of fibers which could be



**Fig. 5.** High magnification of ultrathin sections of *Saccharomyces cerevisiae* lees walls harvested at 1 month (a), 9 months (b), 13 months (c), 18 months (d), 30 months (e), and 48 months (f) of aging. Bars: 200 nm.

composed of  $\beta$ 1,3-glucans associated with proteins (Figs 5e, f and 6e, f, g). In spite of these changes, *S. cerevisiae* cells maintained their integrity throughout the 48 months of wine aging. Our results were comparable to the depletion of the cell wall observed in simulated (Hernawan & Fleet, 1995) and real sparkling wine conditions (Piton *et al.*, 1988), and related to the decrease in the hydrophobicity of wine lees and in cell surface proteins (Vichi *et al.*, 2010), which were associated with the release of yeast cell wall mannoproteins.

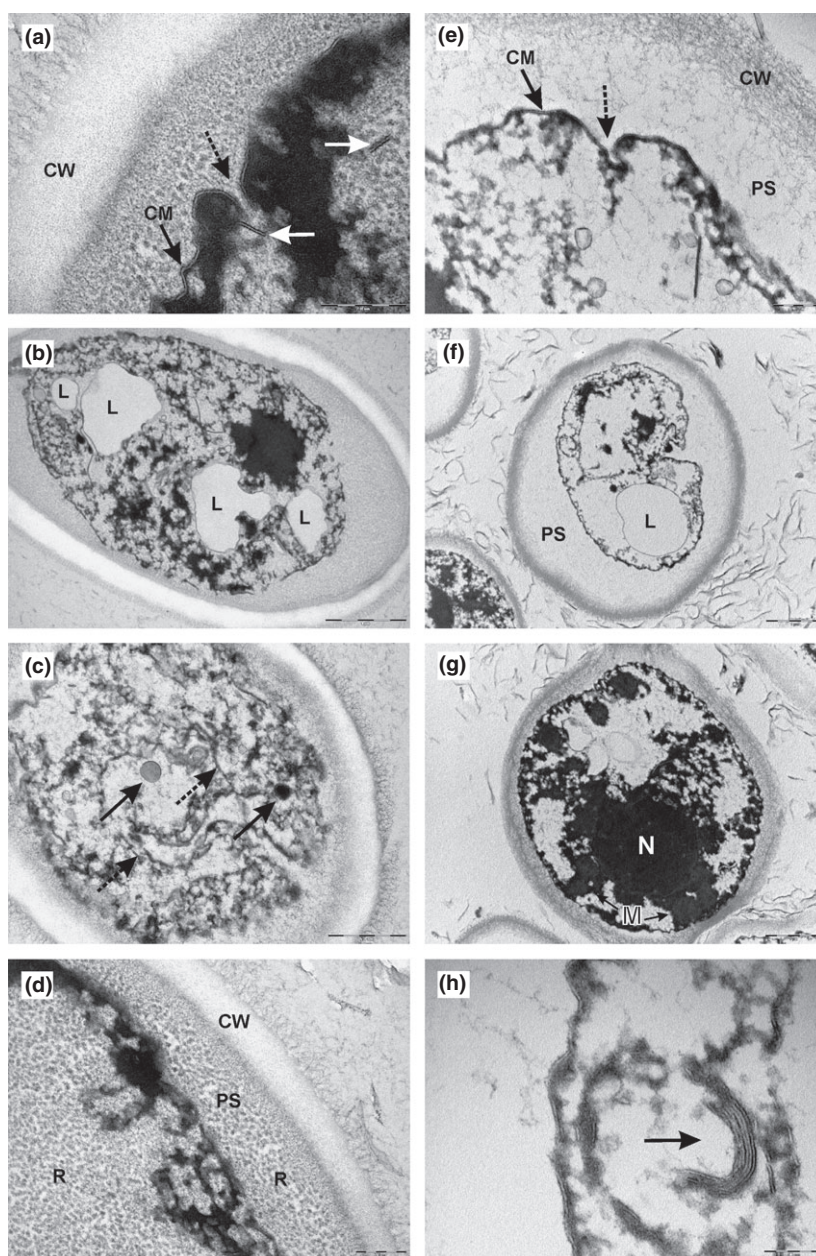
Our results improve on the work of Piton *et al.* (1988) on the cell wall of lees after long aging periods in enological conditions. These authors worked on champagne bottle-fermented samples and observed that the disappearance of the internal layer is complete after 6 months of bottling. However, in the current study, we observed the changes in the cell wall's internal layer after 18 months (Reserve sparkling wine) (Fig. 5d, e and f). This discrepancy in time could be owing to the yeast

strain and/or to the TEM procedure. We have studied the autolysis of lees samples of bottles from three different wine blends produced with the same yeast strain for 4 years, which allowed us to determine the sequence of cell wall degradation throughout the aging process.

### Evolution of cell cytoplasm lees

Samples collected during wine aging consisted of lees at different stages of cytoplasmic degradation (Figs 4 and 6). Differences between cells in their cytoplasmic content were also reported by Hernawan & Fleet (1995) in cells undergoing autolysis in model solutions and by Martínez-Rodríguez *et al.* (2001) in one 12-month-old bottle of sparkling wine. Individual cells in an asynchronous batch culture, such as in sparkling wine bottles, differ in many variables related to the complexity of the yeast cell cycle. Differences within individual cells in their phase in the cell division cycle, their genealogical age, their size, and in





**Fig. 6.** Ultrathin sections of *Saccharomyces cerevisiae* lees showing different stages of autolysis after 9 months (a–d) and 48 months (e–f) of aging. Cells from the same sample showed different degrees of autolysis (see text for explanation). Bars: (a) 200 nm, (b) 1  $\mu$ m, (c) 500 nm, (d) 200 nm, (e) 200 nm, (f) 1  $\mu$ m, (g) 1  $\mu$ m, (h) 100 nm.

clonal variability (Porro *et al.*, 2009; Portell *et al.*, 2011) may yield the cell morphology distribution of the aging lees. In addition, stationary-phase cultures of *S. cerevisiae* include both quiescent and nonquiescent cells (Allen *et al.*, 2006), increasing the complexity of the yeast population of lees. Thus, we were not able to establish a time sequence of cytoplasmic autolysis during aging as we did for cell wall degradation.

In general, owing to plasmolysis, the thickness of the periplasmic space (PS) increased with time. Furthermore, although the CM formed deep invaginations and some breakages of the membrane were also observed, the double-layered ultrastructure was preserved throughout aging period (Fig. 6a and e). Although *S. cerevisiae* responds to ethanol stress by increasing fatty acyl chain length and the proportion of unsaturated fatty acids and sterols in

the plasma membrane (Bauer & Pretorius, 2000; Walker & Van Dijck, 2006), one of the major consequences of yeast cell exposure to high levels of ethanol is the disruption of membrane structural integrity (Walker & Van Dijck, 2006). This is in agreement with our observation of plasma membrane (CM) invaginations and breakages after 9 months of aging (Fig. 6a and e dashed arrows). It has been reported that plasma membrane degradation starts after 3 to 6 months, with lipids being released into the medium (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006), but little is known about the fate of the plasma membrane during autolysis in sparkling wine aging on lees. Experiments in a model wine system showed that no phospholipids were released into the medium (Hernawan & Fleet, 1995; Pueyo *et al.*, 2000), which could suggest that the plasma membrane is degraded inside the cell. Fragments of double-layered membranes from the plasma membrane or from organelles such as mitochondria, the nucleus, or autophagosomes were observed in the cytoplasm of the cell (Fig. 6c, dashed arrows). Our micrographs may indicate that the first step of plasma membrane degradation during aging on lees is the production of small fragments that remain inside the cell (Fig. 6a). These fragments of bilayered membranes would then be digested.

Autolysis was accompanied by extensive loss and disorganization of the intracellular contents (Figs 4 and 6) (Hernawan & Fleet, 1995; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2001). Nonelectron-dense lipid droplets could be observed in lees from 9 months (Fig. 6b) to 48 months (Fig. 6f) of wine aging. Degradation of the cytoplasm content was already observed at 9 months, as vesicles with different material could be detected (Fig. 6c, solid arrows) and ribosomes (R) were present in the periplasmic space (Fig. 6d). However, the nucleus and mitochondria were observed in some cells 48 months old (Fig. 6g). Figure 6h (arrow) shows some double-membrane organelles, but owing to the degradation process it was not possible to discern if they belonged to the Golgi system or the endoplasmic reticulum (Giddings, 2003; Osumi *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2011). Our results showed that cytoplasmic degradation was a process that extended for at least 4 years. Cell depletion, nevertheless, was not complete after 48 months in the bottle (Figs 4d and 6f, g). These are in agreement with the results reported by Leroy *et al.* (1990) and Moreno-Arribas *et al.* (1998) that there is still autolytic activity in yeasts after 60 and 31 months of aging in wine, respectively. These authors based their conclusions on the analysis of the products released into the wine. In addition, a great increase of intracellular proteolytic activity was reported in sparkling wine (Feuillat & Charpentier, 1982) and in champagne (Leroy *et al.*, 1990) during the aging process. Moreover, an increase in the

concentration of nucleic acid materials (Leroy *et al.*, 1990) and in the concentration of the most representative nucleotides (Zhao & Fleet, 2003, 2005; Charpentier *et al.*, 2005) was observed in champagnes, which could indicate the degradation of organelles such as the nucleus, mitochondria, and ribosomes, and subsequent degradation to nucleotides (Fig. 6). Our TEM images may agree with analytical data obtained by several authors, among others Leroy *et al.* (1990), Charpentier *et al.* (2005), and Moreno-Arribas *et al.* (1996), which described compositional changes in sparkling wine during aging.

This is the first time that high-resolution TEM images have been obtained, which provides evidence of several morphological changes in the ultrastructure of *S. cerevisiae* lees throughout real long-term aging. Most of the studies on yeast autolysis have focused on the chemical analysis of wine, but few of them have studied the cytological changes of yeasts during aging. Many of the changes observed in our work could explain the evolution of the compositional and sensorial characteristics of sparkling wines reported by previous authors. Finally, our results suggest that autophagy is involved in the autolytic process. Moreover, different types of autophagy were observed in lees in real enological conditions. Further research should be conducted to understand the role of microautophagy and macroautophagy in the autolysis of lees in sparkling wine during aging.

## Acknowledgements

This study was supported by the Spanish *Ministerio de Ciencia y Tecnología*, project AGL2008-03392, by the *Generalitat de Catalunya*, project SGR2009-606, and by XaRTA (Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments; ajuts de valorització de la recerca), and through a MEC grant to the PhD student J.J. G-C. We are grateful to Freixenet S.A. wineries for sampling. We appreciate Carmen López-Iglesias laboratory assistance in TEM preparations at the Scientific Technical Center at the University of Barcelona.

## References

- Alexandre H & Guilloux-Benatier M (2006) Yeast autolysis in sparkling wine – a review. *Aust J Grape Wine Res* **12**: 119–127.
- Alexandre H, Heintz D, Chassagne D, Guilloux-Benatier M, Charpentier C & Feuillat M (2001) Protease A activity and nitrogen fractions during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **26**: 235–240.
- Allen C, Büttner S, Aragon AD *et al.* (2006) Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *J Cell Biol* **174**: 89–100.

- Babayan TL & Bezrukov MG (1985) Autolysis in yeast. *Acta Biotechnol* **5**: 129–136.
- Bauer FF & Pretorius IS (2000) Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a review. *S Afr J Enol Vitic* **21**: 27–51.
- Bony M, Thines-Sempoux D, Barre P & Blondin B (1997) Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J Bacteriol* **179**: 4929–4936.
- Bozzola JJ & Russell LD (1999) Specimen staining and contrast methods for transmission electron microscopy. *Electron Microscopy: principles and techniques for biologists. The Jones and Bartlett series in biology*, pp. 120–147. Jones & Bartlett Publishers, Boston, MA.
- Cebollero E & Gonzalez R (2006) Induction of autophagy by second-fermentation yeasts during elaboration of sparkling wines. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4121–4127.
- Charpentier C (2010) Ageing on lees (*sur lies*) and the use of speciality inactive yeasts during wine fermentation. *Managing Wine Quality: Oenology and Wine Quality, Vol. 2* (Reynolds AG, ed), pp. 164–187. Whoodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.
- Charpentier C & Feuillat M (1993) Yeast autolysis. *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet GH, ed), pp. 225–242. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Charpentier C, Aussenac J, Charpentier M, Prome J-C, Duteurtre B & Feuillat M (2005) Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: kinetics and potential impact on flavor. *J Agric Food Chem* **53**: 3000–3007.
- Cid VJ, Durán A, Del Rey F, Snyder MP, Nombela C & Sánchez M (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **59**: 345–386.
- Feuillat M & Charpentier C (1982) Autolysis of yeasts in champagne. *Am J Enol Viticult* **33**: 6–13.
- Flanzy C, Salgues M, Bidan P, Dubois C, Moulin JP & Sablayrolles JM (1999) Sparkling wine vinification. *Oenology: Fondements scientifiques et technologiques* (Flanzy C, ed), pp. 497–516. Technique et Documentation, Paris, France.
- Fornairon-Bonnefond C, Camarasa C, Moutounet M & Salmon JM (2002) New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: a bibliographic review. *J Int Sci Vigne Vin* **36**: 49–69.
- Gallart M, López-Tamames E, Suberbiola G & Buxaderas S (2002) Influence of fatty acids on wine foaming. *J Agric Food Chem* **50**: 7042–7045.
- Giddings TH (2003) Freeze-substitution protocols for improved visualization of membranes in high-pressure frozen samples. *J Microsc* **212**: 53–61.
- Hernawan T & Fleet G (1995) Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. *J Ind Microbiol* **14**: 440–450.
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K & Brul S (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 239–256.
- Klis FM, Boorsma A & De Groot PWJ (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2**: 185–202.
- Kopecká M, Phaff HJ & Fleet GH (1974) Demonstration of a fibrillar component in the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical nature. *J Cell Biol* **62**: 66–76.
- Kraft C, Reggiori F & Peter M (2009) Selective types of autophagy in yeasts. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 1404–1412.
- Leroy MJ, Charpentier M, Duteurtre B, Feuillat M & Charpentier C (1990) Yeast autolysis during champagne aging. *Am J Enol Viticult* **41**: 21–28.
- Lipke PN & Ovalle R (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* **180**: 3735–3740.
- Martínez-Rodríguez AJ & Pueyo E (2009) Sparkling wines and yeast autolysis. *Wine Chemistry and Biochemistry* (Moreno-Arribas MV & Polo MC, eds), pp. 61–80. Springer, Heidelberg.
- Martínez-Rodríguez AJ, Polo MC & Carrascosa AV (2001) Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *Int J Food Microbiol* **71**: 45–51.
- Mijaljica D, Prescott M, Klionsky DJ & Devenish RJ (2007) Autophagy and vacuole homeostasis: a case for self-degradation? *Autophagy* **3**: 417–421.
- Moreno-Arribas V, Pueyo E & Polo MC (1996) Peptides in musts and wines. Changes during the manufacture of cava (sparkling wines). *J Agric Food Chem* **44**: 3783–3788.
- Moreno-Arribas V, Pueyo E, Polo MC & Martínez-Alvarez PJ (1998) Changes in the amino acid composition of the different nitrogenous fractions during the aging of wine with yeasts. *J Agric Food Chem* **46**: 4042–4051.
- Nevot M, Deroncelle V, López-Iglesias C, Bozal N, Guinea J & Mercade E (2006) Ultrastructural análisis of the extracellular matter secreted by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF3. *Microb Ecol* **51**: 501–507.
- Osumi M (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* **29**: 207–233.
- Osumi M, Konomi M, Sugawara T, Takagi T & Baba M (2006) 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 Microsc* **55**: 75–88.
- Pérez-Serradilla J & Luque de Castro MD (2008) Role of lees in wine production: a review. *Food Chem* **111**: 447–456.
- Piton F, Charpentier M & Troton D (1988) Cell wall and lipid changes in *Saccharomyces cerevisiae* during aging of champagne wine. *Am J Enol Viticult* **39**: 221–226.
- Porro D, Vai M, Vanoni M, Alberghina L & Hatzis C (2009) Analysis and modeling of growing budding yeast populations at the single cell level. *Cytometry A* **75A**: 114–120.
- Portell X, Ginovart M, Carvo R, Gras A & Vives-Rego J (2011) Population analysis of a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast in a batch culture by electric particle analysis,

- light diffraction and flow cytometry. *FEMS Yeast Res* **11**: 18–28.
- Pozo-Bayón MA, Andújar-Ortiz I & Moreno-Arribas MV (2009a) Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Res Int* **42**: 754–761.
- Pozo-Bayón MA, Andújar-Ortiz I & Moreno-Arribas MV (2009b) Volatile profile and potential of inactive dry yeast-based winemaking additives to modify the volatile composition of wines. *J Sci Food Agric* **89**: 1665–1673.
- Pueyo E, Martínez-Rodríguez A, Polo MC, Santa-María G & Bartolome B (2000) Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. *J Agric Food Chem* **48**: 116–122.
- Studer D, Humbel BM & Chiquet M (2008) Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem Cell Biol* **130**: 877–889.
- Todd BEN, Fleet GH & Henschke PA (2000) Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. *Am J Enol Viticult* **51**: 65–72.
- Torrens J, Riu-Aumatell M, Vichi S, López-Tamames E & Buxaderas S (2010) Assessment of volatile and sensory profiles between base and sparkling wines. *J Agric Food Chem* **58**: 2455–2461.
- Vichi S, Gallardo-Chacón JJ, Pradelles R, Chassagne D, López-Tamames E & Buxaderas S (2010) Surface properties of *Saccharomyces cerevisiae* lees during sparkling wine ageing and their effect on flocculation. *Int J Food Microbiol* **140**: 125–130.
- Walker GM & Van Dijck P (2006) Physiological and molecular responses of yeasts to the environment. *Yeasts in Food and Beverages. The Yeast Handbook, vol. 2* (Querol A & Fleet GH, eds), pp. 111–152. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Walther P & Ziegler A (2002) Freeze substitution of high-pressure frozen samples: the visibility of biological membranes is improved when substitution medium contains water. *J Microsc* **208**: 3–10.
- Wright R (2000) Transmission electron microscopy of yeast. *Microsc ResTech* **51**: 496–510.
- Yamaguchi M, Namiki Y, Okada H, Mori Y, Furukawa H, Wang J, Ohkusu M & Kawamoto S (2011) Structure of *Saccharomyces cerevisiae* determined by freeze-substitution and serial ultrathin-sectioning electron microscopy. *J Electron Microsc* **60**: 337–351.
- Zhao J & Fleet GH (2003) Degradation of DNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **30**: 175–182.
- Zhao J & Fleet GH (2005) Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* produces predominantly ribonucleotides. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**: 415–423.



### 4.1.3 Datos de la aplicación de AFM

La modificación de la morfología y la ultraestructura de las lías a lo largo de la rima, ha sido estudiada mediante microscopía electrónica de barrido a baja temperatura (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2001) y de transmisión (Pitón *et al.*, 1988; véase también apartados 4.1.1 y 4.1.2). La microscopía de fuerza atómica (AFM) también puede ser una herramienta adecuada para visualizar directamente y cuantificar los cambios físicos, morfológicos y estructurales que pueden tener lugar en la superficie celular de la levadura (Dufrêne *et al.*, 2003; Gaboriaud y Dufrêne, 2007). La ventaja de este microscopio sobre los otros, es que el AFM puede funcionar en condiciones ambientales sin ningún tratamiento previo sobre la muestra y tiene además una mayor resolución. El microscopio de fuerzas atómicas (AFM) permite realizar imágenes topográficas a un amplio rango de materiales incluyendo materiales biológicos y cuantificar diferentes propiedades mecánicas, tales como el módulo de Young del material (E) entre otras. El AFM utiliza las interacciones que se producen entre una sonda de tamaño nanométrico y la muestra situada sobre un sustrato sólido, obteniéndose imágenes de alta resolución topográfica. El perfil de altura a lo largo de cada línea de exploración se adquiere y se utiliza para reconstruir la imagen 3D del relieve de la superficie. De hecho, el AFM se puede utilizar como un indentador capaz de aplicar fuerzas en el rango de decenas de piconewtons en áreas tan pequeñas como nanómetros cuadrados. La técnica de indentación empleando un AFM se conoce como espectroscopia de fuerzas (Force Spectroscopy, FS). El Modo de Espectroscopía de Fuerzas da información sobre la adhesión y la deformación plástica que experimenta la muestra al estar sometido a una fuerza. La FS consiste en adquirir una curva de fuerza en función del movimiento del piezoeléctrico en el eje vertical, perpendicular a la muestra (z) que aproxima la punta a la muestra y permite su análisis en un punto determinado (Figura 4.1). Las principales ventajas que presenta esta técnica son: i) inmediatamente antes y después de la adquisición de la curva, se puede obtener una imagen de alta resolución y ii) la carga aplicada puede ser del orden de los nN ( $10^{-9}$  N) o pN ( $10^{-12}$  N). Por consiguiente se puede determinar de forma correcta el E del material, ya que se pueden obtener curvas totalmente elásticas sin producir deformaciones permanentes en el material.

Clásicamente el AFM ofrece dos modos de trabajo para sondear muestras biológicas: modo de contacto y modo *tapping*. En el modo de contacto, la punta hace un barrido sobre la muestra para obtener imágenes de alta resolución de su superficie en términos de altura. La topografía de la muestra se mide mediante la detección de cambios en la deflexión de la punta, como una función de posición sobre la superficie (Liu y Wang, 2010). Sin embargo, cuando se aplica a muestras blandas deformables, las imágenes topográficas resultantes se correlacionan poco con las variaciones en la altura, debido a que la punta del AFM deforma la superficie durante la exploración. El modo *tapping* permite realizar imágenes de muestras blandas con una muy buena resolución (Milhiet *et al.*, 2011).

En este modo (*tapping*), se utiliza un *cantilever* (barra) muy rígido, que oscila cerca de su frecuencia de resonancia durante la exploración, sin estar en contacto con la muestra. El cambio en la amplitud de la oscilación durante la exploración informa sobre la topografía de la superficie. En consecuencia, las fuerzas laterales entre la punta y la muestra pueden ser significativamente reducidas, lo que en principio, evita los artefactos de deformación asociados con la formación de imágenes en el modo de contacto (Chopinnet *et al.*, 2013).

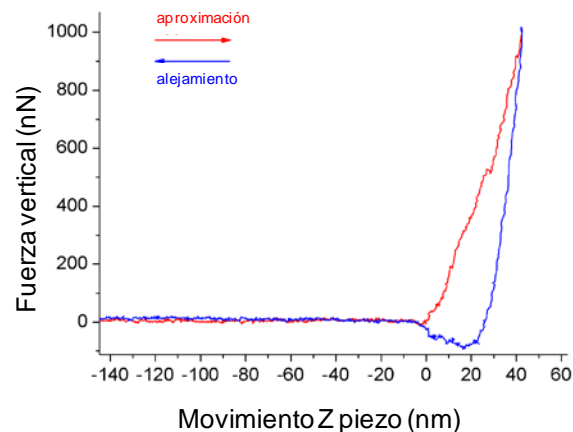


Figura 4.1: Curva de fuerza realizada en la parte superior de una levadura depositada sobre grafito y fotografiada en aire. La posición de movimiento Z piezo = 0nm corresponde al contacto entre la sonda del AFM y la levadura. La muestra se comprime hasta una cierta fuerza vertical (línea roja); entonces, el movimiento se invierte (línea azul) hasta que se pierde el contacto. En la región de contacto varios parámetros mecánicos pueden medirse cuantitativamente.

#### Propiedades biomecánicas de la pared celular de *Sacharomyces cerevisiae*

La pared celular de las levaduras es una estructura dinámica, cuya arquitectura molecular se remodela de forma continua durante los procesos de crecimiento y morfogénicos (Levin, 2005). También se somete a la remodelación en respuesta al estrés ambiental, tales como el etanol y el estrés oxidativo (Gibson *et al.*, 2007; Canetta *et al.*, 2006, 2009), térmico y osmótico (Kobayashi *et al.*, 1990; Yeh *et al.*, 1996; Zhao *et al.* 2009; Pillet *et al.*, 2014), y en respuesta a los fármacos antifúngicos tales como la alicina o caspofungina (Kim *et al.*, 2011; El-Kirat-Chatel *et al.*, 2013). Estos procesos de remodelación están organizados por un mecanismo denominado “rescate de la pared celular” que se basa en una combinación de varias vías de señalización (Levin, 2005, 2011). Estas modificaciones bioquímicas identificadas hasta ahora durante los diferentes estreses fueron: i) Deposición masiva de quitina que tiene lugar en las paredes laterales de las células madre y de las células hija en crecimiento, ii) un aumento del reticulado (*cross-linkage*) entre la quitina y los  $\beta$ -1,3-glucanos y iii) La aparición de nuevos vínculos entre las proteínas de la pared celular y la quitina a través del  $\beta$ -1,6-glucano (Cabib *et al.*, 2005; Valdivieso *et al.*, 2000). En conjunto, estos mecanismos

de reparación de la pared celular se han considerado como un medio para combatir el debilitamiento de la pared celular causada por el estrés (Klis *et al.*, 2006; Lesage *et al.*, 2006).

Entre los estreses ambientales que las levaduras pueden experimentar en condiciones enológicas, la toxicidad del etanol es el principal, especialmente durante el proceso de fermentación. Un nivel de etanol estresante (4-6% v/v) puede hacer disminuir la tasa de crecimiento de la levadura y su viabilidad celular inhibiendo varios sistemas para el transporte de nutrientes (Alexandre y Charpentier, 1998), reduciendo su actividad metabólica, y en casos extremos, acabando en muerte celular (Martini *et al.*, 2004). También provoca un aumento de la rugosidad de su superficie celular y una pérdida de volumen (Canetta *et al.*, 2006).

Las propiedades nanomecánicas de la pared celular de la levadura no pueden atribuirse a un componente específico de la propia pared. Mediante el uso de diversos mutantes de la pared celular alterados en los niveles de  $\beta$ -glucanos, mananos y quitina o en los enlaces cruzados entre quitina y  $\beta$ -glucano, se encontró que estas propiedades dependían principalmente de su organización molecular intrínseca, jugando un papel importante en la elasticidad de la pared celular los enlaces cruzados de la quitina y del  $\beta$ -glucano (Dague *et al.*, 2010). La elasticidad, cuantificada por el módulo de Young en unidades de MPa, es más alta en la cicatriz de gemación que en otras partes de la célula madre (Touhami *et al.*, 2003; Alsteens *et al.*, 2008), lo que sugiere que la quitina, que es más abundante en este sitio, tiene un papel importante en la elasticidad de la célula. Una conclusión similar se llegó recientemente a partir del estudio de la levadura *C. albicans* expuesta al fármaco antifúngico, caspofungina. Se encontró que los niveles de quitina aumentaron proporcionalmente con el aumento de la dosis de caspofungina administrada a las células de *C. albicans*, y esta proporcionalidad se reflejó en un aumento del módulo de Young en estas células de levadura (Formosa *et al.*, 2013).

El objetivo de este trabajo es probar si mediante la microscopía de fuerza atómica (AFM) se pueden visualizar los cambios topográficos y cuantificar las posibles variaciones en la elasticidad de las levaduras a lo largo de la rima, teniendo en cuenta que las células de *Saccharomyces* añadidas con el pie de cuba en el tiraje están sometidas al estrés de la presión de CO<sub>2</sub> y al contenido en etanol del vino base.

#### **4.1.3.1 Resultados**

##### Pruebas preliminares

Previamente, se realizaron pruebas para determinar qué medio (aire o acuoso) era el más adecuado para visualizar y cuantificar los cambios en las muestras de lías (Figura 4.2).



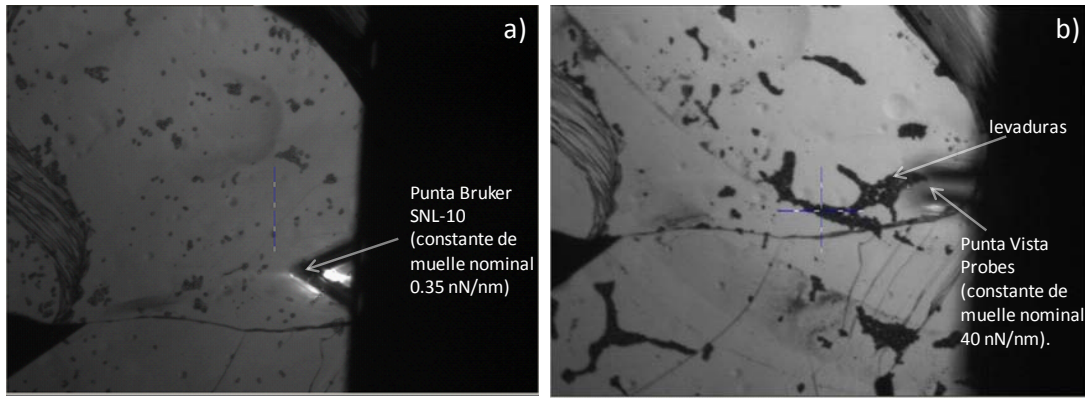


Figura 4.2: a) AFM trabajando en modo *Tapping* en buffer salino, b) AFM trabajando en modo *Tapping* en presencia de aire.

En la Figura 4.2a (medio acuoso) se observa que aunque las levaduras están sobre la superficie y son fácilmente localizables, no es posible realizar imágenes ya que no están adheridas al sustrato y se mueven debido al paso de la punta. Por el contrario, en la Figura 4.2b (medio aire) se observa como las células de las levaduras forman una especie de collares sobre la superficie y quedan adheridas al sustrato. A partir de aquí se decidió realizar todas las medidas en aire.

En la Figura 4.3 se observa la forma ovoide de la célula de levadura de doce meses de crianza (Figura 4.3A). Las micrografías de alta resolución muestran el relieve de la pared celular donde no se aprecian roturas ni presencia de poros (Figuras 4.3B y C).

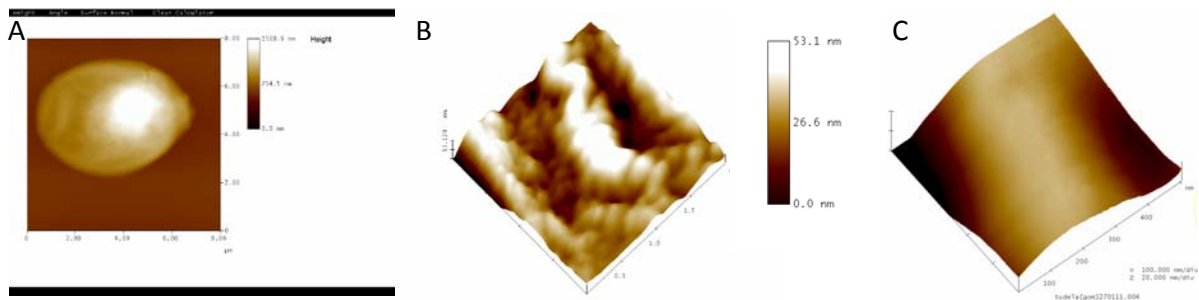


Figura 4.3: A) Micrografía de una levadura de cava con 12 meses de crianza; B) Detalle en alta resolución de la pared celular de la levadura de la imagen anterior; C) Imagen topográfica de 0.5X0.5 micras, zoom de la anterior.

Para caracterizar la respuesta elástica de la levadura en su conjunto se realizaron experimentos de indentación aplicando deformaciones grandes (cientos de nanómetros) sobre la muestra.

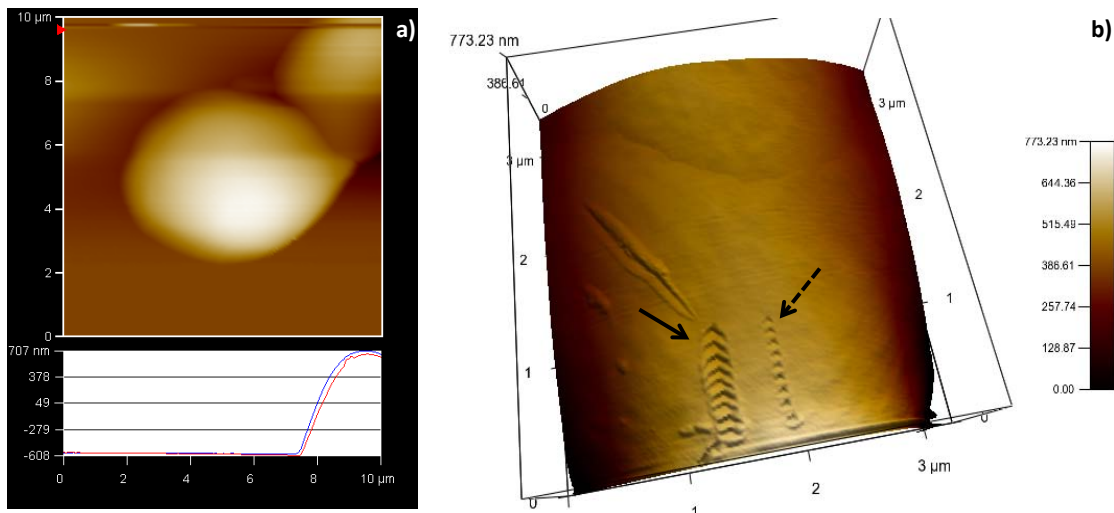


Figura 4.4: a) Imagen topográfica 10x10 micras de la levadura donde se realizaron las indentaciones; b) Nanohuella de indentación en la superficie de una levadura del pie de cuba, la flecha continua es la huella de una fuerza vertical de  $8\mu\text{N}$  y la flecha discontinua de una fuerza vertical de  $3\mu\text{N}$ .

La Figura 4.4a muestra la imagen topográfica de la levadura del pie de cuba donde se van a realizar las pruebas. En la Figura 4.4b (flecha continua) se observan las indentaciones realizadas con una fuerza vertical de  $8\mu\text{N}$ . Estas indentaciones han rebasado el límite elástico porque han dejado huella en la levadura. Esta fuerza creó una deformación permanente de la muestra de alrededor de  $150\text{nm}$ . Las indentaciones con una fuerza vertical de  $3\mu\text{N}$  también crearon pequeñas deformaciones (alrededor de  $8\text{nm}$ ) en la muestra (Figura 4.4b, flecha discontinua) por lo que se decidió reducir aún más la fuerza vertical, hasta  $1\mu\text{N}$  (datos no mostrados).

Comparando la elasticidad global de las levaduras del pie de cuba y las de 9 meses de envejecimiento (Figura 4.5), las primeras muestran un pico muy claro alrededor de los  $5\text{GPa}$  mientras que la muestra envejecida no muestra un pico, sino que da valores mucho más dispersos. Esto puede indicar que la estructura se vuelve menos homogénea.

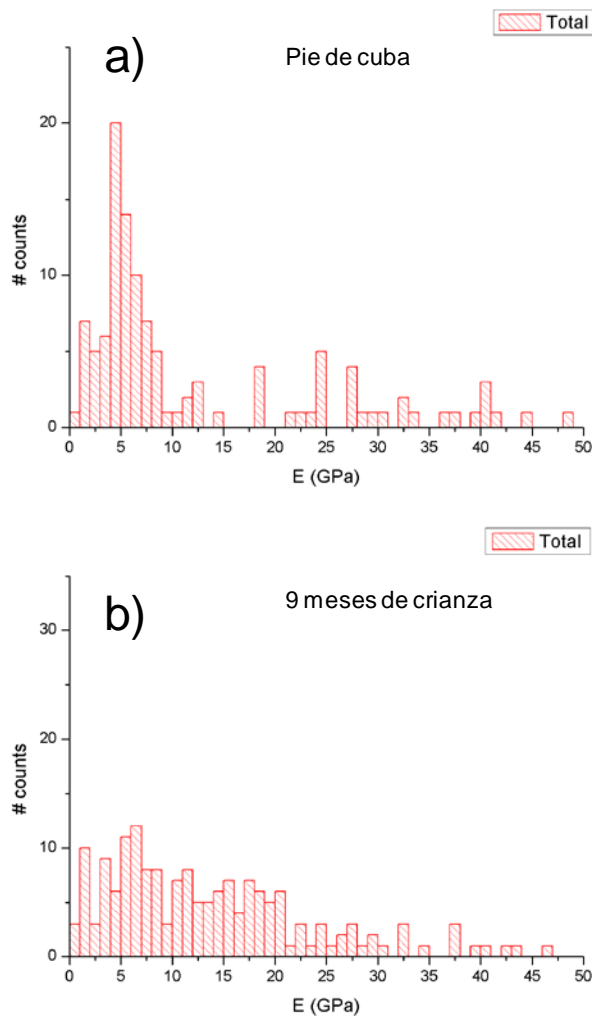


Figura 4.5: a) Histograma de distribución de diversas medidas de elasticidad ( $n > 500$ ) realizadas en varias posiciones sobre varias levaduras de 0 meses ( $n=3$ ); b) Histograma de distribución de diversas medidas de elasticidad sobre muestras de 9 meses ( $n=3$ ).

#### Cambios en la topografía y elasticidad de la pared de las levaduras durante la crianza

En la Figura 4.6 se visualiza la topografía de varias levaduras individuales obtenidas con diferentes tiempos de crianza (5, 9 y 48 meses de crianza). Debido a la gran curvatura de éstas, el borde de las células que se presentan en la Figura 4.6 está rodeado por una estructura artefactual resultante del contacto entre la sonda del AFM y la muestra. En estas regiones, la indentación de la punta en las células de levadura no se realiza de forma perpendicular, provocando así resultados nanomecánicos no fiables y artefactos topográficos. Por esta razón, todos los resultados resumidos en este estudio corresponden a curvas de fuerza realizadas en la parte superior plana de la levadura (ver Figura 4.7). La superficie es notablemente más homogénea y aparentemente más lisa en las levaduras más jóvenes (Figura 4.6A, B) y las de 9 meses de crianza (Figura. 4.6C, D) que en las células de 48 meses de crianza (Figura 4.6E, F). Estas últimas presentan una superficie celular arrugada y una morfología

más áspera. En las muestras de 9 meses y 48 meses se observan dos tipos de morfologías. Las Figuras 4.6C y 4.6E muestran lías que presentan una forma muy parecida a las lías con menos tiempo de envejecimiento. Sin embargo, las Figuras 4.6D y 4.6F muestran lías con el mismo tiempo de envejecimiento pero con una forma aplanada y con menos volumen, menos turgente. Posiblemente esto es debido al vaciado citoplasmático y a la rotura de la membrana plasmática que visualizamos mediante TEM en el estudio previo, como consecuencia de la autólisis. En general, las imágenes de AFM han revelado alteraciones de la superficie celular que aumentan a medida que las levaduras tienen más tiempo de envejecimiento. La superficie posiblemente se vuelve más rugosa entre los meses 9 y 48 debido también a la lenta autólisis descrita previamente en el estudio de Martínez-Rodríguez *et al.* (2001). También puede ser debido a una continuada acción del etanol que altera la superficie de la pared celular, lo que ha sido demostrado en células vivas por Canetta *et al.* (2006). En ese estudio previo, al cabo de 1 hora de exposición a etanol al 10 % (v/v), la forma de la levadura se volvió irregular y se produjo un encogimiento celular. Cuando las levaduras fueron expuestas a un 30% (v/v) de etanol durante 1 h, la rugosidad de la superficie de la célula aumentó muy rápidamente, mientras que el volumen celular se redujo drásticamente.

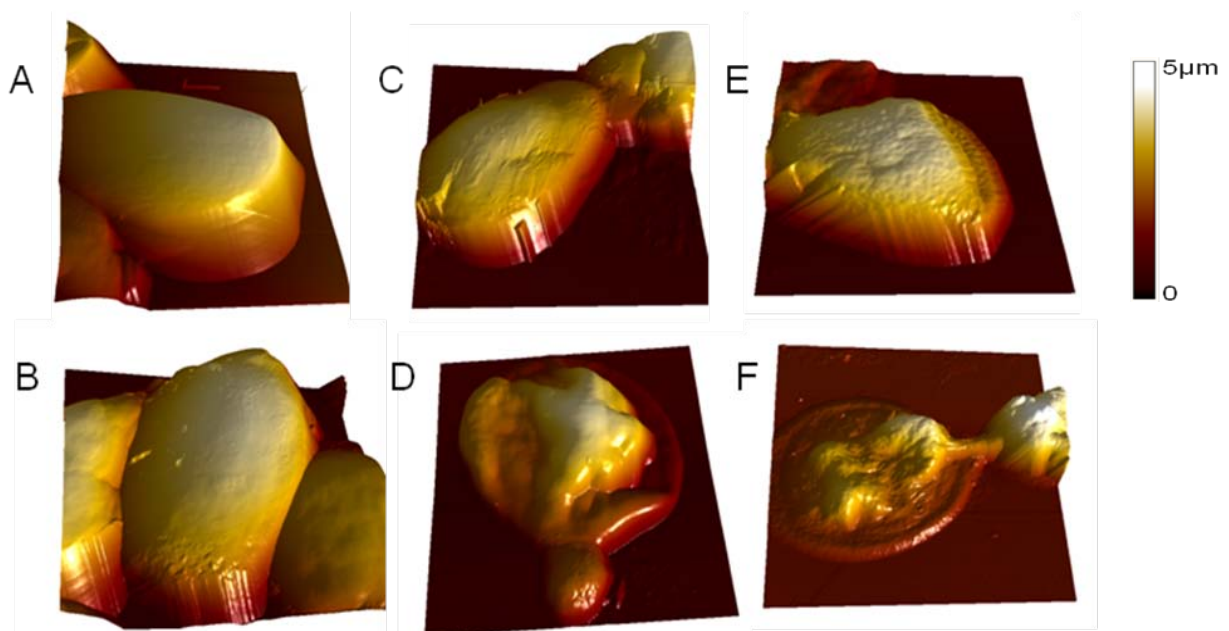


Figura 4.6. Imágenes 3D de AFM ( $7 \times 7 \mu\text{m}^2$ ) de (A) levaduras del pie de cuba (B) levaduras de 5 meses de crianza, (C, D) levaduras de 9 meses de crianza (E, F) levaduras de 48 meses de crianza.

El módulo de Young es un parámetro mecánico utilizado ampliamente para estudiar las propiedades elásticas de los materiales. En nuestro caso se utilizó para calcular los cambios de elasticidad de la pared celular a lo largo de la crianza, como se describe en el capítulo de metodología y plan de

trabajo (apartado 3.1.2.3). Las curvas de fuerza fueron procesadas de forma individual por medio del modelo de Hertz y los resultados derivados del módulo de Young (E) están representados en dos histogramas (Figura 4.7b).

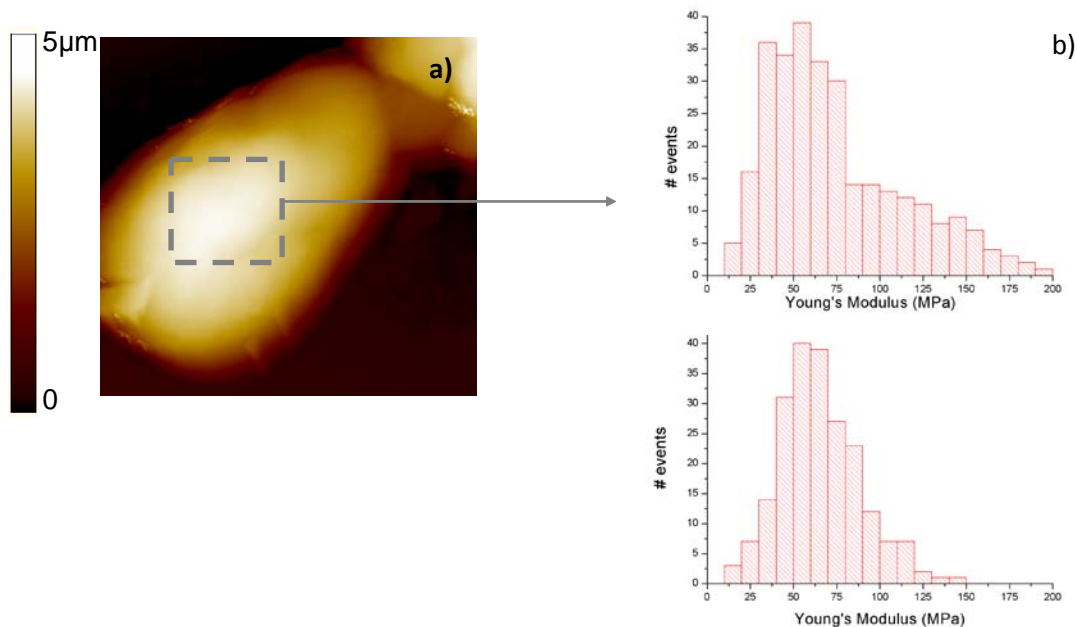


Figura 4.7: Imagen topográfica obtenida mediante AFM de una célula de levadura (a). En la parte marcada con un recuadro fue donde se realizaron las medidas. En la parte (b) de la figura, el histograma superior representa las medidas del Módulo de Young de las levaduras de 9 meses ( $n=7$ ) y el histograma inferior son las medidas de las levaduras de 48 meses de crianza ( $n=8$ ).

El promedio obtenido del módulo de Young fue de  $75.6 \pm 42.6$  MPa ( $>3.500$  mediciones) para las levaduras de 9 meses y  $65.3 \pm 23.1$  MPa para las levaduras de 48 meses ( $>4.000$  medidas). Aun siendo las dos distribuciones bastante heterogéneas, en el histograma de 9 meses existen valores más altos de elasticidad que en el histograma de las levaduras de 48 meses. Las dos poblaciones presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). La pared celular de las células de 9 meses es más rígida que las de las levaduras de 48 meses: los materiales con un módulo de elasticidad más alto son más rígidos y no se deforman tan fácilmente, en comparación con materiales con un módulo de elasticidad menor.

También se observan algunas lías que parecen estar unidas entre sí (Figura 4.8). Una posible explicación a estas uniones entre células es que se active una respuesta celular cuando los nutrientes son limitados, pero aún no estén completamente agotados durante la fase estacionaria de la fermentación (Bauer y Pretorius, 2000); las células podrían haber quedado unidas como una respuesta fisiológica que permitiera la búsqueda de nutrientes o también como respuesta a un

medio ambiente estresante (Zaragoza y Gancedo, 2000). Estas uniones se conservan a lo largo del envejecimiento y, según nuestro conocimiento es la primera vez que se visualizan por AFM.

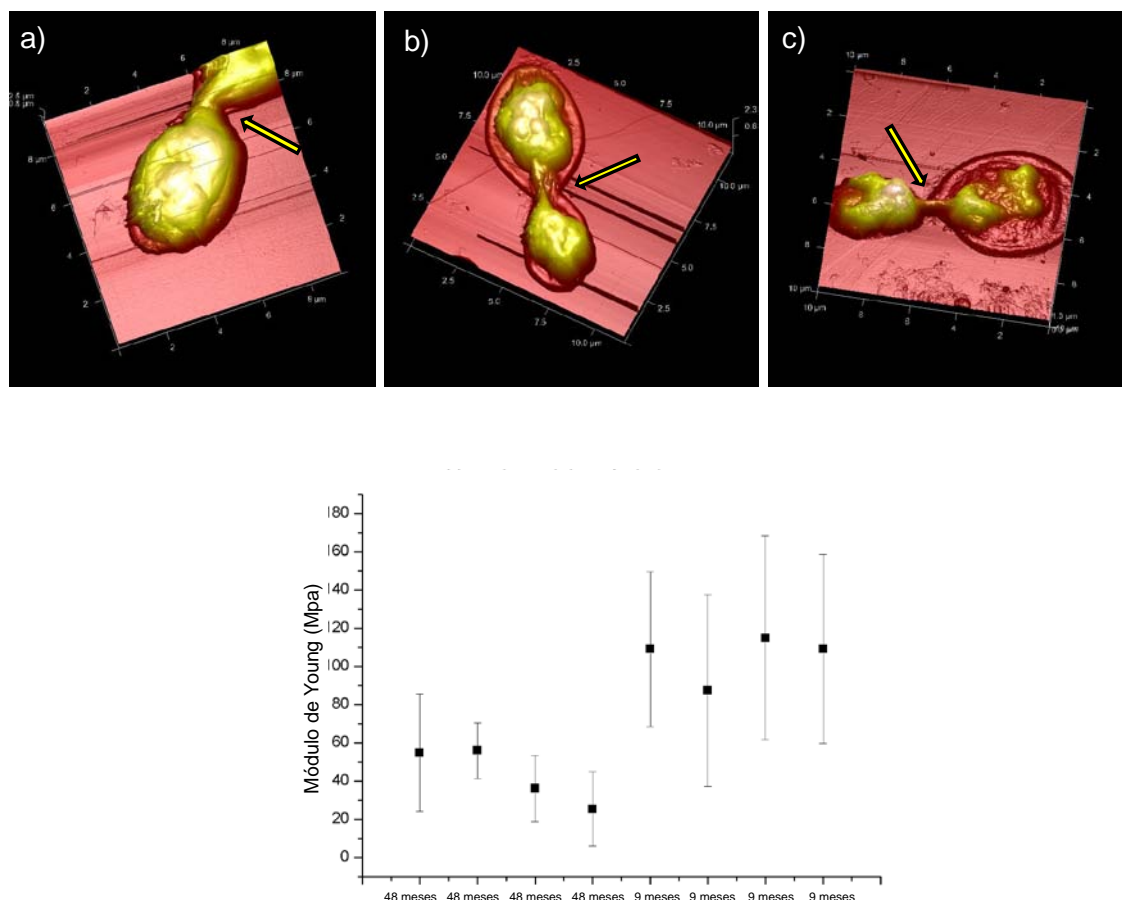


Figura 4.8: En la parte superior de la figura se muestran las imágenes topográficas obtenidas mediante AFM de las levaduras y sus uniones (flecha amarilla): a) y b) levadura de 9 meses; c) levadura de 48 meses. En la parte inferior se representa un histograma con las medidas del Módulo de Young realizadas en las uniones de las levaduras.

El promedio obtenido del módulo de Young en las uniones entre levaduras ha sido de  $105.3 \pm 47.4$  (>2.000 mediciones) MPa para las células de 9 meses ( $n=4$ ) y  $44.1 \pm 24.9$  MPa (>2.000 medidas) para las lías de 48 meses ( $n=4$ ) (Figura 4.8, parte inferior).

Los estudios realizados de AFM en levaduras obtienen valores alrededor de 0,2 a 1,6 MPa (Bui *et al.*, 2008; Dague *et al.*, 2010; Lanero *et al.*, 2006; Pelling *et al.*, 2004; Touhami *et al.*, 2003), mientras que los estudios de micromanipulación obtienen valores de alrededor de 100 -200 MPa (Chaudhari *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2000a, b; Stenson *et al.*, 2009, 2011). Para dar cabida a ambos resultados (de AFM y de micromanipulación,) en 2013 se desarrolló un modelo de doble capa, teniendo en cuenta la composición bioquímica de la pared celular de la levadura en la que la capa externa es suave y

compuesta de manoproteínas, y la capa interior es rígida y en su mayoría fibras  $\beta$  1,3- de quitina y glucano (Mercadé-Prieto *et al.*, 2013). Este modelo sugiere que los experimentos de AFM con penetradores afilados proporcionan estimaciones razonables del módulo elástico de la capa externa solamente, mientras que los datos micromanipulación proporcionan información de la rigidez total de la pared. En nuestro estudio se ha utilizado la medida de elasticidad y la topografía como método de comparación entre lías de diferente tiempo de envejecimiento y nuestros resultados son más acordes con los obtenidos por micromanipulación. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que nuestra metodología trata la levadura como un material (lías) y no como un ser vivo. Sí que sería interesante para estudios futuros utilizar el modelo de doble capa (Mercadé-Prieto *et al.*, 2013) para poder cuantificar los cambios previos que se deben producir en las levaduras, debido al estrés generalizado que sufre desde el inicio de la segunda fermentación hasta su muerte.

En términos generales, los resultados de la elasticidad muestran que las levaduras de 9 meses son más heterogéneas debido probablemente a que la autólisis no actúa por igual en todas las células, aunque en el mes 48 las mediciones se homogenizan. Esto podría confirmar la degradación de la pared celular observada mediante TEM. La pared celular se vuelve menos rígida, ya que, mientras que el grosor de la pared celular depende principalmente de su composición, la elasticidad es dependiente en gran medida de su arquitectura molecular y, más concretamente, de las reticulaciones entre la quitina y los  $\beta$ -glucanos (Dague, 2010). La disminución de la rigidez con el tiempo también se ha observado en las uniones entre las células, que se han visualizado por primera vez en lías de cava mediante AFM. Estas uniones al tener más quitina serían más duras, pero luego se volverían más blandas por la degradación del material, a medida que progresa la autólisis. Podemos concluir que, aunque durante la crianza no se rompe la pared, la arquitectura molecular se ve modificada debido a la autólisis, probablemente por la pérdida de glucanos y quitina y/o a la rotura de los enlaces cruzados entre la quitina y los glucanos.

#### **4.1.3.2 Referencias bibliográficas**

Alexandre, H., Charpentier, C., 1998. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20, 20-27.

Alsteens, D., Dupres, V., Mc Evoy, K., Wildling, L., Gruber, H.J., Dufrene, Y.F., 2008. Structure, cell wall elasticity and polysaccharide properties of living yeasts cells, as probed by AFM. *Nanotechnology* 19, 1-9.

Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a review. *South Africa Journal of Enology and Viticulture* 21, 27-51.

Bui, V.C., Kim, Y.U., Choi, S.S., 2008. Physical characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Surface and Interface Analysis* 40, 1323-1327.

Cabib, E., Durán, A., 2005. Synthase III-dependent Chitin Is Bound to Different Acceptors Depending on Location on the Cell Wall of Budding Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 280, 9170-9179.

Canetta, E., Adya, A.K., Walker, G.M., 2006. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. *FEMS Microbiology Letters* 255, 308-15.

Canetta, E., Walker, G.M., Adya, A.K., 2009. Nanoscopic morphological changes in yeast cell surfaces caused by oxidative stress: an atomic force microscopic study. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 547-555.

Chaudhari, R.D., Stenson, J.D., Overton, T.W., Thomas, C.R., 2012. Effect of bud scars on the mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Chemical Engineering Science* 84, 188-196.

Chopinnet, L., Formosa, C., Rols, M.P., Duval, R.E., Dague, E., 2013. Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode. *Micron* 48, 26-33.

Dague, E., Bitar, R., Ranchon, H., Durand, F., Yken, H.M., François, J.M., 2010. An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture. *Yeast* 27, 673-684.

Dufrêne, Y.F., 2003. Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology. *Current Opinion in Microbiology* 6, 317-23.

El-Kirat-Chatel, S., Beaussart, A., Alsteens, D., Jackson, D.N., Lipke, P.N., Dufrêne, Y.F., 2013. Nanoscale analysis of caspofungin-induced cell surface remodelling in *Candida albicans*. *Nanoscale* 5, 1105-1115.

Formosa, C., Schiavone, M., Martin-Yken, H., François, J.M., Duval, R.E., Dague, E., 2013. Nanoscale effects of caspofungin against two yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 3498-3506.

Gaboriaud, F., Dufrêne, Y.F., 2007. Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 54, 10-19.



Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Leclaire, J.P.R., Powell, C.D., Smart, K.A., 2007. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews* 31, 535-569.

Kim, K.S., Kim, Y.S., Han, I., Kim, M.H., Jung, M.H., Park, H.K., 2011. Quantitative and qualitative analyses of the cell death process in *Candida albicans* treated by antifungal agents. *PLoS ONE* 6, e28176.

Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W.J., 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185-202.

Kobayashi, N., McEntee, K., 1990. Evidence for a heat shock transcription factor independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 6550-6554.

Lanero, T.S., Cavalleri, O., Krol, S., Rolandi, R., Gliozzi, A., 2006. Mechanical properties of single living cells encapsulated in polyelectrolyte matrixes. *Journal of Biotechnology* 124, 723-731

Lesage, G., Bussey, H., 2006. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, 317-343.

Levin, D.E., 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69, 262–291.

Levin, D.E., 2011. Regulation of Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The Cell Wall Integrity Signaling Pathway. *Genetics* 189, 1145-1175.

Liu, S., Wang, Y., 2010. Application of AFM in microbiology: a review. *Scanning* 32, 61-73.

Martinez-Rodriguez, 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.

Martini, S., Ricci, M., Bonechi, C., Trabalzini, L., Santucci, A., Rossi, C., 2004. In vivo <sup>13</sup>C-NMR and modelling study of metabolic yield response to ethanol stress in a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 564, 63-68.

Mercadé-Prieto, R., Thomas, C.R., Zhang, Z., 2013. Mechanical double layer model for *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *European Biophysics Journal* 42, 613-20.

- Milhiet, P.E., Dosset, P., Godefroy, C., Le Grimellec, C., Guigner, J.M., Larquet, E., Ronzon, F., Manin, C., 2011. Nanoscale topography of hepatitis B antigen particles by atomic force microscopy. *Biochimie* 93, 254–259.
- Pelling, A.E., Sehati, S., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Gimzewski, J.K., 2004. Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 305, 1147-1150.
- Pillet, F., Lemonier, S., Schiavone, M., Formosa, C., Martin-Yken, H., Francois, J.M., Dague, E., 2014. Uncovering by atomic force microscopy of an original circular structure at the yeast cell surface in response to heat shock. *BMC Biology* 12, 1-11.
- Piton, F., Charpentier, M., Troton, D., 1988. Cell wall and lipid changes in *Saccharomyces cerevisiae* during aging of champagne wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 221-226.
- Smith, A.E., Zhang, Z., Thomas, C.R., 2000a. Wall material properties of yeast cells: part 1. Cell measurements and compression experiments. *Chemical Engineering Science* 55, 2031-2041.
- Smith, A.E., Zhang, Z.B., Thomas, C.R., Moxham, K.E., Middelberg, A.P.J., 2000b. The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 9871-9874.
- Stenson, J.D., Thomas, C.R., Hartley, P., 2009. Modelling the mechanical properties of yeast cells. *Chemical Engineering Science* 64, 1892-1903.
- Stenson, J.D., Hartley, P., Wang, C., Thomas, C.R., 2011. Determining the mechanical properties of yeast cell walls. *Biotechnology Progress* 27, 505-512.
- Touhami, A., Nysten, B., Dufrene, Y.F., 2003. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy. *Langmuir* 19, 4539-4543.
- Valdivieso, M.H., Ferrario, L., Vai, M., Duran, A., Popolo, L., 2000. Chitin Synthesis in a *gas1* Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 182, 4752-4757.
- Yeh, J., Haarer, B.K., 1996. Profilin is required for the normal timing of actin polymerization in response to thermal stress. *FEBS Letters* 398, 303-307.
- Zaragoza, O., Gancedo, J.M., 2000. Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78, 187-94.
- Zhao, X.Q., Bai, F.W., 2009. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology* 144, 23-30.

## 4.2 Evolución de los catabolitos de ARN en el cava durante la crianza biológica

En este apartado se presentan los resultados del estudio sobre la evolución del contenido de catabolitos de ARN, en diferentes muestras de cava a lo largo de su crianza. Los resultados están publicados en *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2013).

### 4.2.1 Resumen

**Tudela, R.,** Riu-Aumatell, M., Castellari, M., Buxaderas, S., López-Tamames, E., 2013. Changes in RNA catabolites of Sparkling Wines during the biological aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 6028-6035.

El objetivo de este estudio fue evaluar los contenidos de siete catabolitos derivados de la degradación del ARN (guanósina, adenosina, inosina, uridina, xantina, hipoxantina y ácido úrico) en el cava, y proporcionar un enfoque bioquímico que pueda esclarecer el proceso real de envejecimiento, de acuerdo con la degradación celular de las levaduras evaluadas previamente mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para determinar los cambios en la concentración de estos siete nucleósidos y purinas se elaboraron tres series de cava a escala industrial, y se envejecieron durante 4 años en botellas con lías. Por otra parte, para establecer si estos catabolitos provenían de la autólisis de las lías o de otro mecanismo, también se cuantificaron en dos series de los mismos vinos espumosos, pero una vez realizado el degüelle a los 9 meses y, por tanto, almacenados sin contacto con las lías y conservados en las mismas condiciones, es decir, en bodega a 16°C.

Para evaluar el contenido en cava de los catabolitos se utilizó el método UHPLC-MS / MS. La uridina es el nucleósido mayoritario y aumenta su contenido a lo largo del envejecimiento cuando las lías están en contacto con el cava. Sin embargo, las purinas parecen tener un origen fermentativo, siendo la xantina la más abundante. Cuando se eliminan las lías con el degüelle y se hace un seguimiento a lo largo del almacenamiento los niveles de los catabolitos en el cava permanecen sin cambios. Por lo tanto, el contenido de los nucleósidos estaría asociado con la degradación celular, lo que implica que los enzimas hidrolíticos intracelulares actuarían para liberar compuestos citoplasmáticos y celulares al cava a lo largo de toda la crianza. En este sentido, el envejecimiento en contacto con las lías se ha revelado como muy significativo para el vino espumoso: el contenido en uridina aumenta

progresivamente durante la segunda fermentación y crianza, y podría ser utilizado como marcador de la progresión de la autólisis. Las purinas aparecen como catabolitos fermentativos, que derivan de nucleósidos o la degradación de ATP pero no parecen relacionados con la degradación celular.

#### Aportaciones más relevantes

- La uridina es el nucleósido principal en el cava y su contenido aumenta significativamente a lo largo del envejecimiento. Este producto de degradación podría ser liberado al vino espumoso gracias a la degradación de la pared celular, y las roturas de la membrana plasmática que se producen durante la autólisis de la levadura.
- La xantina parece ser la purina más abundante y probablemente el origen de estos catabolitos sea fermentativo.
- Cuando se eliminan las lías, las cantidades de los catabolitos no aumentan con el tiempo.



## Changes in RNA Catabolites of Sparkling Wines During the Biological Aging

Rebeca Tudela,<sup>†</sup> Montserrat Riu-Aumatell,<sup>\*,†</sup> Massimo Castellari,<sup>‡</sup> Susana Buxaderas,<sup>†</sup> and Elvira López-Tamames<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Departament de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av Prat de la Riba, 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

<sup>‡</sup>IRTA-Food Technology, Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Spain

**ABSTRACT:** In this study the catabolites derived from RNA degradation were assessed in Cava sparkling wines as a consequence of lees autolysis. For this purpose, the changes in the content of adenosine, guanosine, inosine, uridine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid were determined by UHPLC-MS/MS, in sparkling wines produced on industrial scale, and aged for 4 years. Uridine is the main nucleoside, and its content increases whenever lees cells are present (*sur lie* aging). Purines seem to have a fermentative origin, with xanthine the most abundant one. When RNA catabolite amounts in sparkling wines aged with or without lees are compared over time, it can be concluded that lees and their cell degradation play an important role in the evolution of Cava; when lees are removed, RNA catabolite amounts remain unchanged.

**KEYWORDS:** purines, uridine, nucleosides, autolysis, sparkling wine

### ■ INTRODUCTION

The distinctive character of Cava (quality sparkling wine) is determined by the second fermentation and aging of the wine with yeast.<sup>1</sup> Once the second fermentation is complete, cell viability decreases by more than 90%,<sup>2</sup> autolysis starts, and biological aging takes place for a minimum of 9 months.<sup>3</sup> The contact between wine and lees, involving the reduction or increase of some components in wine, improves quality. Therefore, there is great interest among sparkling wine producers to know all the biochemical details of this biological aging. The elaboration of high-quality sparkling wines is a very long process, usually lasting between 18 and up to 30 months, and producers need information to control or monitor the procedure and justify the long aging and increased cost. The implications of the process called autolysis for sparkling wine have been cited previously.<sup>4–8</sup> During aging *sur lie*, some intracellular components are released from yeast cells, such as nitrogen compounds, peptides, polysaccharides, lipids, and nucleotides, which modify wine composition and final quality.<sup>9</sup> However, nucleic acids and their degradation products are among the least studied topics in sparkling wines. RNA and DNA make up 5–15% and 0.1–1.5% of cell dry yeast, respectively.<sup>6</sup> RNA, the main content of nucleic acids of yeast cells (95%), is degraded more rapidly than DNA.<sup>10</sup> Zhao and Fleet<sup>11,12</sup> concluded that up to 55% of total cell DNA and up to 95% of cell RNA were degraded during induced autolysis at 30–60 °C (pH 7.0), and at 40 °C (pH 4.0–7.0) for 10–14 days. Those authors suggested that RNA degradation is a key reaction of yeast autolysis. However, when autolysis was induced at 30 °C and pH 3 in hydroalcoholic buffer (ethanol 11.5%, v/v), only ribonucleotides were detected in yeast autolysate, as in up to 9 year-old Champagne. The absence of deoxyribonucleotides could be explained by a slower degradation of DNA, producing mainly oligonucleotides.<sup>13</sup> The concentration of nucleotides found in Champagne is very

low, reaching a maximum of ~3 mg L<sup>-1</sup> for 9 years of aging.<sup>13</sup> However, in sparkling wine, the subsequent degradation of these nucleotides into nucleosides and purine bases has not yet been investigated in real oenological conditions mainly due to the reasons associated with analytical procedures. Recently, the development of soft ionization techniques such as electrospray ionization (ESI)<sup>10</sup> and MS/MS methods<sup>14,15</sup> facilitates the detection of these compounds in food. The ultrastructure of cell yeast is also clarified by the development of microscopic techniques, such as transmission electron microscopy (TEM).<sup>16</sup> The availability of these new analytical techniques permits the measurement of catabolic products that could be related to their autolytic status.

The aim of the study was to assess the level of seven RNA catabolites (guanosine, adenosine, inosine, uridine, xanthine, hypoxanthine, and uric acid) that can be found in Cava wines and to provide a better biochemical approach to understanding the real aging process, according to the yeast cell degradation evaluated by transmission electron microscopy (TEM). For this purpose an UHPLC-MS/MS method was used to determine changes in the concentration of seven target nucleosides and purines in three series of Cava sparkling wines produced on an industrial scale, and aged for 4 years in bottles with lees. Furthermore, to establish whether these target nucleosides and purines come from lees or from another biochemical mechanism, their level was also evaluated in two series of the same sparkling wines aged without lees contact.

**Received:** January 22, 2013

**Revised:** April 23, 2013

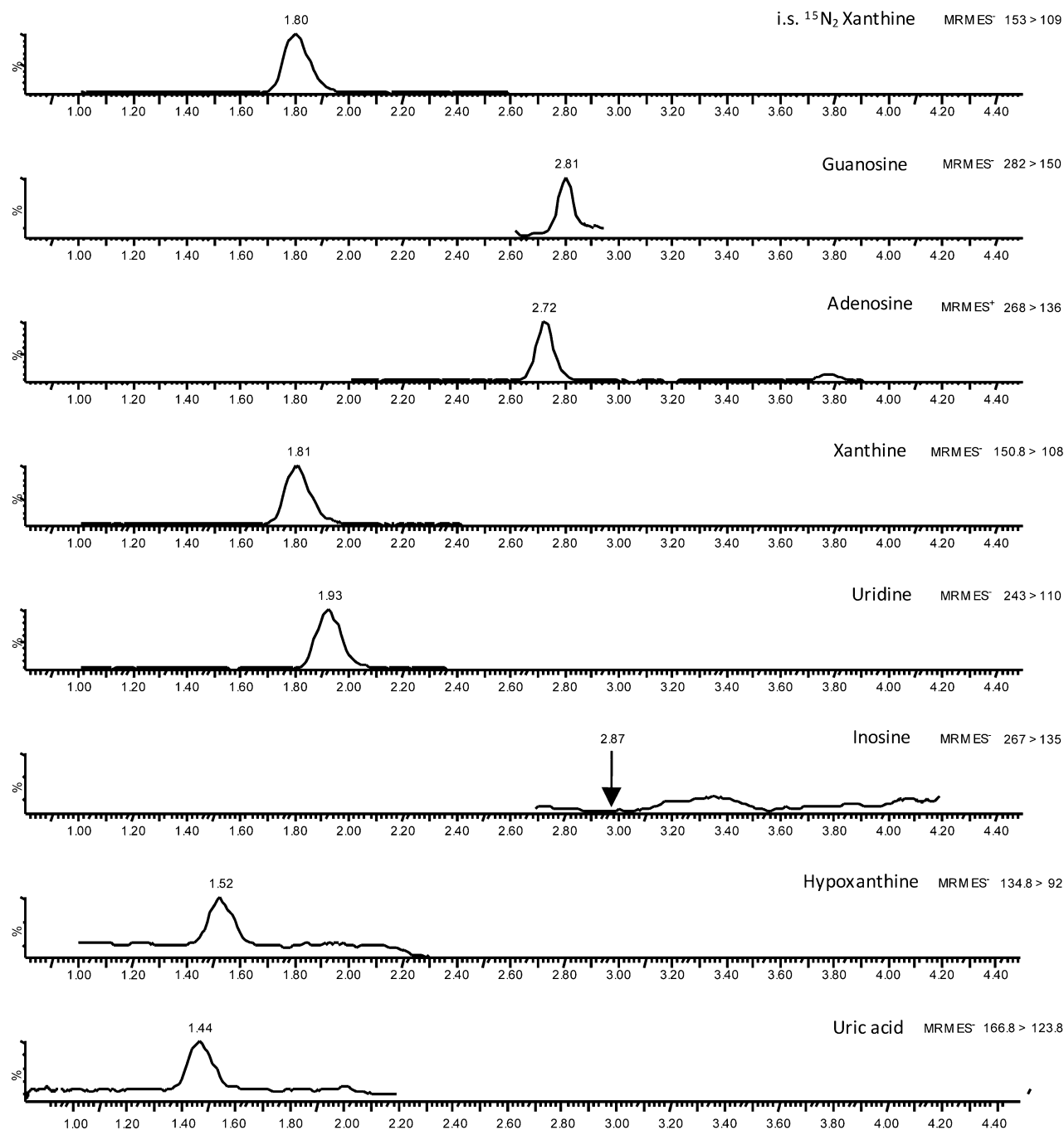
**Accepted:** May 26, 2013

**Published:** May 27, 2013

Table 1. Evolution of Catabolite Content (mg/L) of Cava Wine During Aging “sur Lie” (Different Letters Indicate Statistical Differences by ANOVA)

| series | 0 month             | 1 month        | 3 months            | 6 months        | 9 months       | 13 months           | 17 months       | 21 months       | 30 months      | 39 months     | 48 months       |
|--------|---------------------|----------------|---------------------|-----------------|----------------|---------------------|-----------------|-----------------|----------------|---------------|-----------------|
| A      | <0.01a <sup>a</sup> | <0.01a         | <0.02a <sup>b</sup> | 0.17h ± 0.01    | 0.09e ± 0.01   | 0.15f ± 0.01        | 0.16g ± 0.01    | 0.05c ± 0.01    | 0.07d ± 0.01   | 0.07d ± 0.01  | 0.03b ± 0.01    |
| B      | <0.01a              | <0.01a         | <0.02b              | 0.07d ± 0.01    | 0.07d ± 0.01   | 0.09e ± 0.01        | 0.12f ± 0.01    | 0.07d ± 0.01    | 0.07d ± 0.01   | 0.06c ± 0.01  | 0.04c ± 0.01    |
| C      | <0.01a              | <0.01a         | <0.01a              | 0.02b ± 0.01    | 0.18f ± 0.01   | 0.09d ± 0.01        | c               | 0.14e ± 0.01    |                |               |                 |
| A      | <0.06a <sup>a</sup> | <0.06a         | <0.06a              | 0.46e ± 0.04    | 0.27c ± 0.03   | 0.27c ± 0.03        | 0.36d ± 0.03    | 0.24b ± 0.02    | <0.06a         | <0.06a        | <0.06a          |
| B      | <0.06a              | <0.06a         | <0.06a              | <0.06a          | <0.06a         | <0.18b <sup>b</sup> | <0.06a          | <0.06a          | <0.06a         | <0.06a        | <0.06a          |
| C      | <0.06a              | <0.06a         | <0.06a              | <0.06a          | <0.06a         | 0.20c ± 0.01        | <0.06a          | <0.18b          | <0.06a         | <0.06a        | <0.06a          |
| A      | 18.96ab ± 0.51      | 20.36bc ± 0.55 | 17.72a ± 0.48       | 20.87c ± 0.56   | 21.74c ± 0.59  | 20.37bc ± 0.55      | 25.12d ± 0.68   | 24.92d ± 0.67   | 26.62de ± 0.72 |               | 28.38e ± 0.77   |
| B      | 10.81a ± 0.29       | 10.51a ± 0.28  | 13.31b ± 0.36       | 13.50b ± 0.36   | 13.45b ± 0.36  | 14.21bc ± 0.38      | 15.53de ± 0.42  | 14.73cd ± 0.40  | 15.96e ± 0.43  |               | 18.03f ± 0.49   |
| C      | 15.46a ± 0.42       | 16.17a ± 0.44  | 16.68a ± 0.45       | 18.39b ± 0.50   | 16.11a ± 0.43  | 19.33b ± 0.52       |                 | 19.11b ± 0.52   |                | 22.10c ± 0.60 |                 |
| A      | <0.44a <sup>b</sup> | <0.44a         | 0.64c ± 0.06        | 1.03e ± 0.10    | 0.99e ± 0.09   | 0.82d ± 0.08        | 0.81d ± 0.08    | 0.53bc ± 0.05   | 0.45b ± 0.04   |               | 0.95e ± 0.09    |
| B      | 0.54a ± 0.05        | 0.97b ± 0.09   | 1.28fg ± 0.12       | 1.00bc ± 0.09   | 1.14de ± 0.11  | 1.05bcd ± 0.10      | 1.19ef ± 0.11   | 1.43h ± 0.13    | 1.30g ± 0.12   |               | 1.07cd ± 0.10   |
| C      | <0.44a              | 1.70bc ± 0.16  | 1.80cd ± 0.17       | 1.74bcd ± 0.16  | 1.84cd ± 0.17  | 1.88d ± 0.18        |                 | 1.61b ± 0.15    |                | 1.85d ± 0.17  |                 |
| A      | 8.11a ± 0.26        | 9.86bc ± 0.32  | 9.38b ± 0.30        | 9.72bc ± 0.31   | 9.82bc ± 0.31  | 9.59bc ± 0.31       | 9.47bc ± 0.30   | 9.85bc ± 0.32   | 10.20c ± 0.33  |               | 10.08bc ± 0.32  |
| B      | 10.19ab ± 0.33      | 10.29a ± 0.33  | 11.72cd ± 0.37      | 11.27bcd ± 0.36 | 11.31cd ± 0.36 | 11.25bcd ± 0.36     | 11.25bcd ± 0.36 | 10.7abcd ± 0.35 | 11.78d ± 0.38  |               | 10.80abc ± 0.35 |
| C      | 9.54a ± 0.31        | 10.58bc ± 0.34 | 10.16abc ± 0.32     | 10.15abc ± 0.32 | 10.83c ± 0.35  | 10.70bc ± 0.34      |                 | 9.93ab ± 0.32   |                | 10.88c ± 0.35 |                 |
| A      | 0.74a ± 0.07        | 0.77bc ± 0.08  | 1.17f ± 0.12        | 1.31g ± 0.13    | 1.02e ± 0.10   | 0.77bc ± 0.08       | 0.75b ± 0.07    | 0.93de ± 0.09   | 0.78bc ± 0.08  |               | 0.88cd ± 0.09   |
| B      | 0.65a ± 0.06        | 0.92e ± 0.09   | 0.83d ± 0.08        | 0.64ab ± 0.06   | 0.73c ± 0.07   | 0.80d ± 0.08        | 0.70bc ± 0.07   | 0.84d ± 0.08    | 0.81d ± 0.08   |               | 0.82d ± 0.08    |
| C      | 0.44c ± 0.04        | 0.40b ± 0.04   | <0.36a <sup>b</sup> | 0.51f ± 0.05    | 0.49dc ± 0.05  | 0.47cd ± 0.05       |                 | 0.49de ± 0.05   |                | 0.45c ± 0.04  |                 |

<sup>a</sup><LOD, <sup>b</sup><LOQ, <sup>c</sup>Nonexistent sample point.



**Figure 1.** MRM profile corresponding to the quantifier transition of adenosine, guanosine, inosine, uridine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid found in a Cava sample.

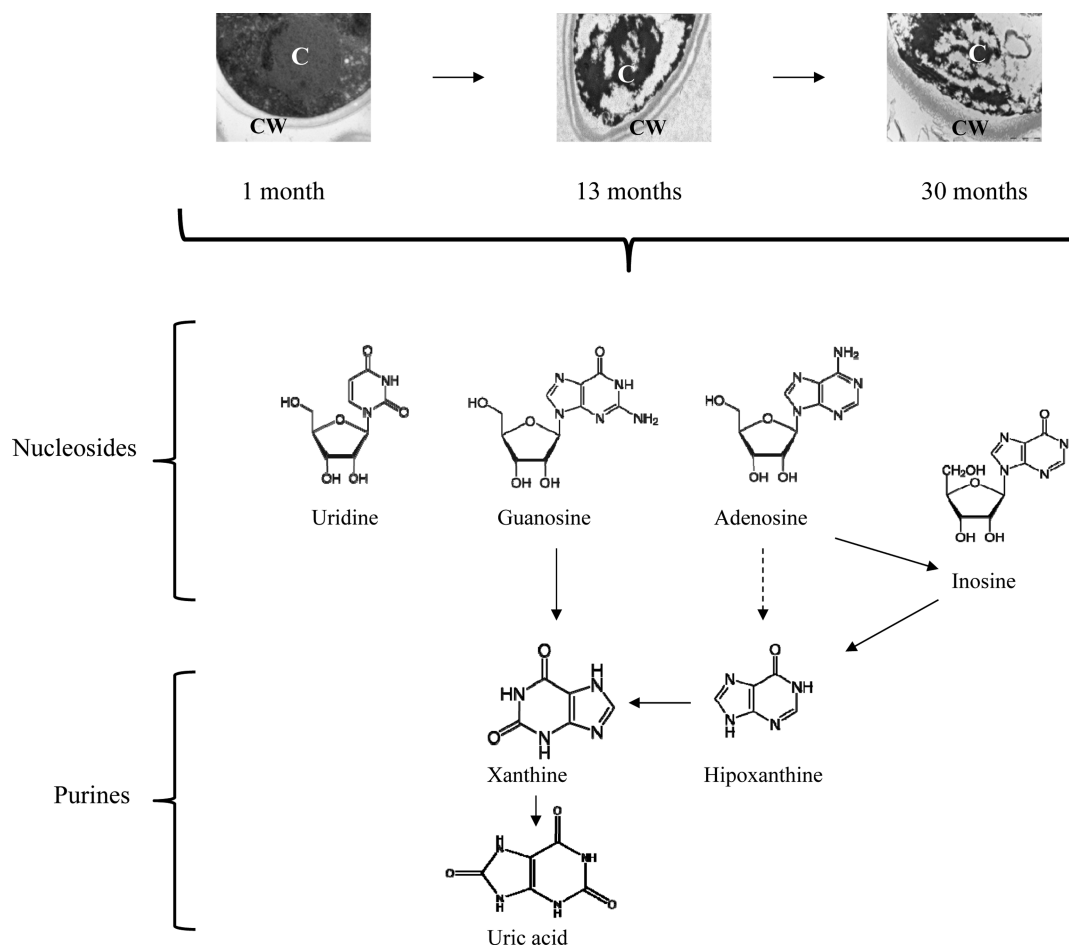
## MATERIALS AND METHODS

**Samples.** Three Cava sparkling wine series (series A, B, and C) from three different blends were made following the traditional method on an industrial scale at the Freixenet S.A. winery. The three base wines were bottled after the addition of the same “liqueur de tirage”. This liqueur was composed of  $1\text{--}2 \times 10^6$  yeast cells  $\text{mL}^{-1}$  (yeast starter),  $500 \text{ g L}^{-1}$  of sucrose, and  $0.04 \text{ g L}^{-1}$  of calcium bentonite. As approximately 40–42 mL of “liqueur de tirage”/750 mL bottle was added, each bottle received between 22 and 24 g of sucrose for the second fermentation.<sup>17</sup> The *S. cerevisiae* F11 strain belongs to the private collection of Freixenet S.A. winery. Each Cava series was stacked in two cages of 500 bottles of 750 mL and stored ( $16^\circ\text{C}$ ) in the cellar for 48 months during the second fermentation “prise de mousse” and aging in contact with lees. Two bottles of each series were

taken at different aging times. These sampling points were selected according to representative aging periods: 0 months (base wine added of “liqueur de tirage”), 1 month (second fermentation), 3 months (end second fermentation), 6 months (aging), 9 and 13 months (Cava), 17 and 21 months (Reserva), 30, 39, and 48 months (Gran Reserva).

In addition, 500 bottles of Cava (one cage of each series A and B) were disgorged to remove the lees at 9 months of biological aging. The brut expedition liqueur (sucrose, wine, and sulfite) was added automatically to produce commercial sparkling wines. These two series of Cava without lees (named Ac and Bc) were stored together with A, B, and C cages. Subsequently, they are under the same cellar conditions at  $16^\circ\text{C}$  for four years. At 13, 17, 21, 39, and 48 months of aging, coinciding with the sampling time for series A and B, two bottles were collected for series Ac and Bc.





**Figure 2.** Catabolic pathways of nucleosides and purines in sparkling wines according to yeast cell degradation observed by TEM. CW = cell wall; C = cytoplasm.

In order to remove the lees and to degas the product, the contents of bottles from series A, B and C were centrifuged at 4 °C for 15 min at 1410g (Rotina48CR, Tuttlingen, Germany). The supernatant was then placed in a 250 mL amber flask. Aseptic conditions were maintained throughout the experiment. The samples from series Ac and Bc were also degassed by magnetic stirred under sterile conditions in the laminar flow hood.

All samples were then stored at −20 °C until analysis.

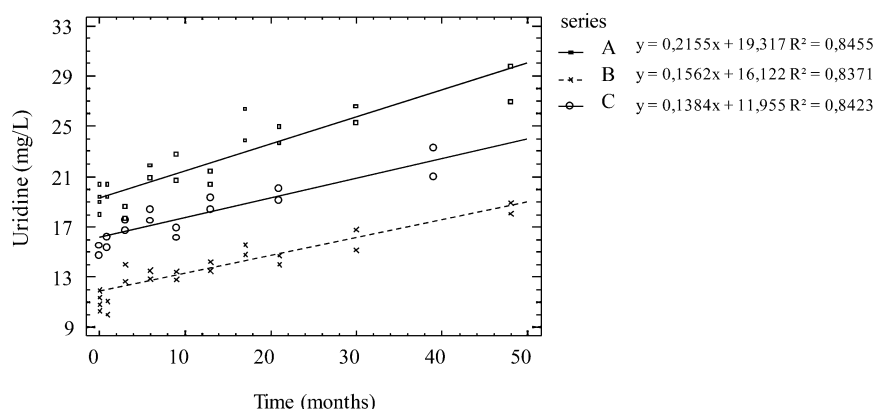
**Chemical Standards and Reagents.** Adenosine, guanosine, inosine, hypoxanthine, xanthine, uric acid, hydrochloric acid, and ammonium hydroxide ACS were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Uridine and formic acid mass spectrometry grade were from Fluka (Buchs, Switzerland). Deuterated xanthine [1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>] used as an internal standard with isotopic purity greater than 98%, was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Acetonitrile LC-MS grade was from Riedel-de Haën (Seelze, Germany), while ultrapure water was obtained by a Milli-Q system (Millipore, Milford, MA). Single-standard stock solutions were prepared weekly by dissolving known amounts of pure standards in 2 mM ammonium hydroxide and then storing at 4 °C until analysis. Internal standard solution (I.S.) was prepared weekly by dissolving known amounts of 1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-xanthine in 2 mM ammonium hydroxide, diluting with water to reach a final concentration of 20 μg mL<sup>−1</sup>, and then storing at 4 °C.

**UPLC–MS/MS analyses.** Analyses were carried out following a previously published method<sup>14</sup> with an Acquity Ultra-Performance liquid chromatography system (UPLC) (Waters, Milford, MA), equipped with a binary pump system, a photodiode array detector (DAD), a ZSpray electrospray (ESI) as a source of ionization, and a triple-quadrupole mass spectrometer (TQD). Chromatographic separation was achieved with a BEH C<sub>18</sub> Shield column (150 mm ×

1.0 mm id) with 1.7 μm particle size (Waters, Milford, MA), kept at 40 °C. An isocratic elution was carried out with acetonitrile (ACN)/water/formic acid (5:94.9:0.1, v/v/v) with a flow rate of 0.140 mL min<sup>−1</sup>. Sample vials and the injector were maintained at 4 °C; the injected volume was 2 μL. Electrospray was operated for all analytes in negative (ESI<sup>−</sup>) mode, except for adenosine which was performed in positive (ESI<sup>+</sup>) mode.<sup>14</sup> Data acquisition and integration were controlled by MassLynx software (version 4.0). Cava samples (500 μL) were added with 450 μL of formic acid 0.1% in water, and 50 μL of [1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>] xanthine solution (i.s. = 20 mg L<sup>−1</sup>), then filtered with PTFE membrane filter (0.22 μm porosity), and injected. Standard addition calibration curves were created by spiking two Cava samples with seven spiking levels for each compound. Calibration curves were made by plotting the peak area ratio of each compound to the internal standard against the concentration ratio of the compounds to the internal standard, taking into account the initial concentrations in real samples. The limit of detection (LOD) was calculated on the basis of the calibration curve response for each kind of matrix at S/N = 3. Intraday repeatability was determined by analyzing two samples in triplicate each day.

**Transmission Electron Microscopy (TEM) of Wine Lees.** The lees of three bottles were prepared at each sampling point by centrifugation (previously described in Samples section), and the pellet was washed three times with 30 mL of NaCl 0.9% (Panreac Barcelona, Spain) according to Leroy et al.<sup>18</sup>

Lees pellets were selected under a stereomicroscope, transferred to 1.5 mm diameter and 200 μm deep planchettes, and immediately cryoimmobilized, using a Leica EMPact high-pressure freezer (Leica, Vienna, Austria), and then stored in liquid nitrogen until further use.<sup>19</sup> After rapid freezing, specimens were freeze-substituted in anhydrous



**Figure 3.** Uridine release in sparkling wine (Cava series A, B, and C) during aging *sur lie*.

acetone containing 2% osmium tetroxide and 0.1% uranyl acetate at  $-90^{\circ}\text{C}$  for 3 days. They were gradually warmed to room temperature at a temperature progression rate of  $5^{\circ}\text{C h}$ .

After several acetone rinses, the samples were embedded in Epon resin. The Epon was then polymerized for 48 h at  $60^{\circ}\text{C}$ .<sup>20</sup> Ultrathin sections were cut with a Leica Ultracut UCT ultra-microtome, mounted on Formvar-coated copper grids and poststained with 2% uranyl acetate in water and lead citrate.<sup>21</sup> The ultrathin sections were observed with a Tecnai Spirit electron microscope (FEI Co, Hillsboro, OR) at an accelerating voltage of 120 kV. On average, 10 overview and approximately 55–65 detailed electron micrographs for each sample point were taken.

**Statistical Analysis.** Statgraphics Plus 5.1 was used to carry out the statistical data analysis. Results were analyzed by simple and multifactorial ANOVA ( $p < 0.05$ ). Relationships between catabolite content and aging time were also examined.

## RESULTS AND DISCUSSION

The concentration of 4 nucleosides (guanosine, adenosine, uridine, and inosine) and 3 purine bases (hypoxanthine, xanthine, and uric acid) in the three different series (A, B, and C) of sparkling wine during their manufacturing process (“*méthode champenoise*”) is shown in Table 1. The sampling points of this table were according to Cava categories: base wine (0 month), second fermentation (1 month), end of second fermentation, as indicated by Freixenet S.A data (3 months), post fermentative aging (6 months), “Cava” (9 and 13 months), “Reserva” (17 and 21 months), and “Gran Reserva” (30, 39, and 48 months).

In Figure 1 is reported the MRM profile corresponding to the quantifier transition of nucleosides and purine bases of Cava. Inosine was not detected in any sample analyzed of base wine or sparkling wine (Figure 1). This might be because inosine was below its detection limit ( $39\ \mu\text{g L}^{-1}$ ). However, another possibility is the enzymatic activity of purine-nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1.) which catalyzes the direct transformation of inosine into hypoxanthine,<sup>22</sup> or from adenosine (Figure 2) by an intermediate step to adenine (EC 2.4.2.1.) and then through adenine deamination (adenine deaminase EC 3.5.4.2.) to hypoxanthine (Figure 2 in discontinuous arrow).<sup>23</sup>

In base wine (Table 1, 0 months), uridine is the only nucleoside detected, whereas purines were detected in all series. Hypoxanthine shows values in the base wine lower than uric acid, whereas it remains in series A and C below the limit of quantification ( $44\ \mu\text{g L}^{-1}$ ).

In sparkling wine, all nucleosides (except the inosine mentioned above) and purines were quantified.

## Levels of Nucleosides in Cava Wine During “*sur Lie*”

**Aging.** Uridine was the main nucleoside, higher than adenosine and guanosine amounts (Table 1). The greater presence of uridine in the current study contradicts the previous research into model wines by Charpentier et al.<sup>13</sup> and Guilloux-Benatier and Chassagne.<sup>9</sup> These authors found that adenosine was the main nucleoside, followed by uridine and guanosine, when induced autolysis is performed. Nevertheless, our results are in accordance with the findings of Zhao et al.,<sup>12</sup> where, under several pH and temperature conditions of induced autolysis, uridine is the most abundant ribonucleosides, followed by adenosine. In our study, the autolysis took place in real enological conditions, with low pH at 2.9–3.0, relative low temperatures ( $16^{\circ}\text{C}$ ), and high  $\text{CO}_2$  pressure ( $>6\ \text{atm}$ ) for 4 years. Induced autolysis in the various previous studies probably did not reproduce the autolytic lees process that occurs in the bottle under real conditions. Thus, in the current study (Figure 3 and Table 1), it seems that the progressive formation of uridine, in contrast to the other nucleosides, was promoted. Yeasts are rich in enzymes that could hydrolyze nucleic acids, all of which could be involved in the autolytic degradation of RNA in nucleotides, nucleosides, and nucleobases.<sup>12</sup> Nucleotidases act on nucleotides to release phosphate and nucleoside, while nucleosidases act on nucleosides to release nucleobases. In real enological conditions nucleotidases may be active at these temperatures and pH, while nucleosidases appear not to be very active. The three nucleosides determined (uridine, adenosine, and guanosine) may result from the degradation of nucleotides that occurs inside cells due to the enzymatic activity. However, to verify this point, a detailed study to find how nucleic acids are degraded (poly- oligo- or mononucleotides) over time inside the lees is needed.

During aging, uridine increased its content, and a relationship was established between uridine content and aging time ( $R^2 > 0.8$ ) (Figure 3). The maximum concentration was found in the last months of aging reaching  $28.4\ \text{mg L}^{-1}$  and  $18.1\ \text{mg L}^{-1}$  at month 48 for series A and B, respectively, and  $22.2\ \text{mg L}^{-1}$  at month 39 for series C (Table 1). No uridine kinetic differences between the three series were found. The uridine increment, according to the quality categories of Cava (Cava, Cava Reserva, and Gran Reserva), accounted for nearly 12% in each category. Uridine is used as a parameter to monitor freshness in other foodstuffs.<sup>24</sup> Our results suggest that uridine in sparkling wine could be used as a marker to monitor long-term aging.

Table 2. Evolution of Catabolites Content (mg/L) of Cava Wine During Aging without Lees

| series | 17 months           | 21 months     | 21 months     | 30 months     | 48 months      |
|--------|---------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
|        |                     |               | Adenosine     |               |                |
| Ac     | <0.01a <sup>a</sup> | <0.01a        | <0.01a        | <0.01a        | <0.01a         |
| Bc     | <0.02a <sup>b</sup> | <0.02a        | <0.02a        | <0.02a        | <0.02a         |
|        |                     |               | Guanosine     |               |                |
| Ac     | <0.06a <sup>a</sup> | <0.06a        | <0.06a        | <0.06a        | <0.06a         |
| Bc     | <0.06a              | <0.06a        | <0.06a        | <0.06a        | <0.06a         |
|        |                     |               | Uridine       |               |                |
| Ac     | 22.06a ± 0.60       | 22.17a ± 0.60 | 22.66a ± 0.61 | 23.20a ± 0.63 | 23.28a ± 0.63  |
| Bc     | 14.12a ± 0.38       | 14.07a ± 0.38 | 14.95b ± 0.40 | 15.20b ± 0.41 | 14.95b ± 0.40  |
|        |                     |               | Hypoxanthine  |               |                |
| Ac     | <0.44 <sup>b</sup>  | <0.44         | <0.44         | <0.44         | <0.44          |
| Bc     | 1.01a ± 0.09        | 1.03a ± 0.10  | 1.12a ± 0.10  | 1.03a ± 0.10  | 1.17a ± 0.10   |
|        |                     |               | Xanthine      |               |                |
| Ac     | 10.30a ± 0.33       | 10.00a ± 0.32 | 10.02a ± 0.32 | 9.74a ± 0.31  | 9.80a ± 0.31   |
| Bc     | 10.54ab ± 0.34      | 10.16a ± 0.33 | 11.65c ± 0.37 | 11.33c ± 0.36 | 11.05bc ± 0.35 |
|        |                     |               | Uric Acid     |               |                |
| Ac     | 0.62a ± 0.06        | 0.82b ± 0.08  | 0.71ab ± 0.07 | 0.70ab ± 0.07 | 0.77ab ± 0.08  |
| Bc     | 0.74a ± 0.07        | 0.68a ± 0.07  | 0.81a ± 0.08  | 0.76a ± 0.08  | 0.83a ± 0.08   |

<sup>a</sup><LOD. <sup>b</sup><LOQ. Different letters indicate statistically differences by ANOVA.

Adenosine and guanosine behaved differently (Table 1). These nucleosides were not detected in base wine and did not appear while fermentation takes place (3 months). Adenosine concentration behaved in a similar way in the three series: it was found six months after bottling, once aging started. Its highest concentration was detected between 9 and 21 months (Cava and Reserva) while in long-aging Cava (Gran Reserva) this nucleoside seemed to continue its degradation (Figure 2). Guanosine showed a similar trend (Table 1).

The release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis could act as flavoring agents.<sup>13</sup> Exploration of the nucleoside profiles and their impact in Cava quality should be studied from the standpoint of flavor enhancers.

**Quantification of Purines in Cava Wine During Aging "sur Lie".** Purines have been studied in other foodstuffs as a flavor enhancer,<sup>25</sup> and they may also contribute to flavor in the evolution of Cava during aging and storage. Xanthine, hypoxanthine, and uric acid were detected in all base wines (Table 1). Xanthine is the main purine quantified in wine and sparkling wine. These purines increase their content until the end of second fermentation. The average of the percent increases (calculated at 3 months with respect to 0 months of the 3 series) corresponds at 11% of xanthine, 36% of uric acid, and more than double of hypoxanthine, and their concentration remains constant in sparkling wines even within the quality categories (Cava, Reserva, and Gran Reserva). These purines appear already in base wines, probably from the first fermentation, and do not appear to alter significantly during *sur lie* aging. Xanthine is a product on the pathway of purine degradation (Figure 2). It is created from guanine by guanine deaminase (EC 3.5.4.3);<sup>26</sup> a previous step to guanine was needed by a purine-nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1).<sup>22</sup> Xanthine comes from hypoxanthine too (hypoxanthine is a spontaneous deamination product of adenine)<sup>27</sup> by a xanthine dehydrogenase (EC 1.17.1.4).<sup>23</sup> or by a xanthine oxidase (EC 1.17.3.2).<sup>23</sup> Another possible pathway comes from xanthosine by the purine-nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1).<sup>22</sup> However, as seen in Figure 2, xanthine could be transformed to uric acid by the enzyme action of the xanthine dehydrogenase (EC 1.17.1.4).<sup>23</sup> or by the xanthine oxidase (EC 1.17.3.2).<sup>23</sup>

mentioned above. However, Pantazopoulou and Diallinas<sup>28</sup> indicate that *Saccharomyces cerevisiae* lacks all the enzymes necessary for purine oxidation.

Another possible origin of sparkling wine purines could be from ATP degradation as described in the muscle tissue of seafood.<sup>29</sup> The post mortem sequence could be represented by the following cascade of decomposition: ATP → ADP → AMP → IMP → inosine → hypoxanthine → xanthine.

**Quantification of Catabolites During Aging without Lees.** To establish the role of lees in these wine catabolites, the lees of cava series (A and B) were removed at 9 months by means of the disgorging, and the corresponding sparkling wines (Ac and Bc series) were obtained and stored in the same cellar conditions. This procedure was performed in order to compare the catabolite contents between the wines in contact with lees and those without lees. The catabolites could be produced inside the cell and then be released from the lees to wine through the cell wall. The alternative would be the release of precursors (nucleotides) and enzymes to wine, and then the enzyme reactions produced these nucleosides and purines in the wine medium.

Table 2 shows the concentration of catabolites determined in sparkling wine aged without lees from month 13 to month 48. Adenosine and guanosine were not detected in either Ac series or Bc series.

Uridine, xanthine, hypoxanthine, and uric acid did not significantly increase their content during aging without lees. These results indicate that the presence of these nucleosides and purines was related to lees autolysis and not to chemical or enzymatic changes in the wine. The nucleosides detected in the present study derived mostly from RNA, which may remain the only source in the case of uridine, with rRNA being the most abundant of the different kinds of RNA.<sup>30</sup> Along these lines, Tudela et al.<sup>16</sup> described that cytoplasm content was already degraded at 9 months and ribosomes were present in the periplasmic space of lees. The determined breakdown products could be released into the extracellular environment (sparkling wine) by the degradation of the cell wall and the breakages of plasma membrane that occur during yeast autolysis. Figure 2 shows three TEM images for three cell states: cell fermentation

(1 month) and lees at 12 months and at 48 months. The microfibrinous material of the cell wall (CW) appeared more diffuse, the amorphous midzone of the inner wall layer is degraded, and from the ninth month onward the cells were plasmolyzed. During *sur lie* aging, the lees at different stages suffer cytoplasmic degradation accompanied by extensive loss and disorganization of the intracellular organelles (C).

In conclusion, only some RNA catabolites increase in sparkling wine during *sur lie* aging. When lees are removed these catabolite levels remain unchanged in wine medium. Thus, nucleoside content could be associated with cell degradation, which involves intracellular hydrolytic enzymes that act to release cytoplasmic and cellular compounds into the wine. In this sense, the aging in contact with lees has been revealed to be highly significant for sparkling wine: uridine amounts increase progressively during second fermentation and aging, and it could be used as autolysis marker. Purines appear as fermentative catabolites, which derived from nucleosides or ATP degradation. Further studies about the role played by nucleotides, or RNA, or DNA fragments in autolysis are needed.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: montseriu@ub.edu. Phone: +34 93 4033795. Fax: +34 93 4035931.

### Funding

This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, project AGL2011-23872, by the Generalitat de Catalunya, project SGR2009-606, and by XaRTA (Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Freixenet S.A. wineries for samples and data provided. We appreciate Carmen López-Iglesias laboratory assistance in TEM preparations at the Scientific Technical Center at the University of Barcelona.

## REFERENCES

- (1) Pozo-Bayón, M. A.; Martínez-Rodríguez, A. J.; Pueyo, E.; Moreno-Arribas, M. V. Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: From a traditional to an improved winemaking technology. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20*, 289–299.
- (2) Hidalgo, P.; Pueyo, E.; Pozo-Bayón, M. A.; Martínez-Rodríguez, A. J.; Martín-Alvarez, P.; Polo, M. C. Sensory and analytical study of rosé sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6640–6645.
- (3) Council Regulation (EC) No. 1493/1999 of 17 May 1999 on the common organisation of the market in wine. *Off. J. Eur. Union* **1999**, *1493*, 1–98.
- (4) Feuillat, M.; Charpentier, C. Autolysis of yeasts in Champagne. *Am. J. Enol. Vitic.* **1982**, *33*, 6–13.
- (5) Charpentier, C.; Feuillat, M. Yeast autolysis. In *Wine Microbiology and Biotechnology*; Fleet, G. H., Ed.; Harwood Academic Publishers: Chur, Switzerland, 1993; pp 225–242.
- (6) Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. Yeast autolysis in sparkling wine—A review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**, *12*, 119–127.
- (7) Charpentier, C. Aging on lees (*sur lies*) and the use of speciality inactive yeasts during wine fermentation. In *Managing Wine Quality: Oenology and Wine Quality*; Reynolds, A. G., Ed.; Woodhead Publishing Ltd.: Abington Hall, Cambridge, U.K., 2010; Vol 2, Chapter 6, pp 164–187.
- (8) Buxaderas, S.; López-Tamames, E. Sparkling wines: features and trends from tradition. *Adv. Food Nutr. Res.* **2012**, *66*, 1–45.
- (9) 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.
- (10) Aussenac, J.; Chassagne, D.; Claparols, C.; Charpentier, M.; Duteurtre, B.; Feuillat, M.; Charpentier, C. Purification method for the isolation of monophosphate nucleotides from champagne wine and their identification by mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2001**, *907*, 155–164.
- (11) Zhao, J.; Fleet, G. H. Degradation of DNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30*, 175–182.
- (12) Zhao, J.; Fleet, G. H. Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* produces predominantly ribonucleotides. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *32*, 415–423.
- (13) Charpentier, C.; Aussenac, J.; Charpentier, M.; Prome, J. C.; Duteurtre, B.; Feuillat, M. Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: kinetics and potential impact on flavor. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3000–3007.
- (14) Clariana, M.; Gratacós-Cubarsí, M.; Hortós, M.; García-Regueiro, J. A.; Castellari, M. Analysis of seven purines and pyrimidines in pork meat products by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 4294–4299.
- (15) Clariana, M.; Hortós, M.; García-Regueiro, J. A.; Castellari, M. Effect of high pressure processing on the level of some purines and pyrimidines nucleosides and bases in dry cured and cooked ham. *Meat Sci.* **2011**, *89*, 533–535.
- (16) Tudela, R.; Gallardo-Chacón, J. J.; Rius, N.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Ultrastructural changes of sparkling wine lees during long-term aging in real enological conditions. *FEMS Yeast Res.* **2012**, *12*, 466–476.
- (17) Flanzy, C.; Salgues, M.; Bidan, P.; Dubois, C.; Moulin, J. P.; Sablayrolles, J. M. In *Oenology: Fondements Scientifiques et Technologiques*; Flanzy, C., Ed.; Technique et Documentation: Paris, France, 1999; pp 497–516.
- (18) Leroy, M. J.; Charpentier, M.; Duteurtre, B.; Feuillat, M.; Charpentier, C. Yeast autolysis during champagne aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 21–28.
- (19) Nevot, M.; Deroncelle, V.; López-Iglesias, C.; Bozal, N.; Guinea, J.; Mercade, E. Ultrastructural analysis of the extracellular matter secreted by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF3. *Microb. Ecol.* **2006**, *51*, S01–S07.
- (20) Walther, P.; Ziegler, A. Freeze substitution of high-pressure frozen samples: the visibility of biological membranes is improved when substitution medium contains water. *J. Microsc.* **2002**, *208*, 3–10.
- (21) Bozzola, J. J.; Russell, L. D. Specimen staining and contrast methods for transmission electron microscopy. In *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*; The Jones and Bartlett Series in Biology; Jones & Bartlett Publishers, Boston, MA, 1999; pp 120–147.
- (22) Lecoq, K.; Belloc, I.; Desgranges, C.; Konrad, M.; Daignan-Fornier, B. YLR209c encodes *Saccharomyces cerevisiae* purine nucleoside phosphorylase. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 4910–4913.
- (23) Scheer, M.; Grote, A.; Chang, A.; Schomburg, I.; Munaretto, C.; Rother, M.; Söhngen, C.; Stelzer, M.; Thiele, J.; Schomburg, D. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (database issue), D670–676.
- (24) Tikk, M.; Tikk, K.; Tørngren, M. A.; Meinert, L.; Aaslyng, M. D.; Karlsson, A. H.; Andersen, H. J. Development of inosine monophosphate and its degradation products during aging of pork of different qualities in relation to basic taste and retronasal flavor perception of the meat. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7769–7777.
- (25) Hidalgo, A.; Lucisano, M.; Comelli, E. M.; Pompei, C. Evolution of chemical and physical yolk characteristics during the storage of shell eggs. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1447–1452.
- (26) Saint-Marc, C.; Daignan-Fornier, B. GUD1 (YDL238c) encodes *Saccharomyces cerevisiae* guanine deaminase, an enzyme expressed during post-diauxic growth. *Yeast* **2004**, *21*, 1359–1363.

(27) Pospisilová, H.; Sebel, M.; Novák, O.; Frébort, I. Hydrolytic cleavage of N6-substituted adenine derivatives by eukaryotic adenine and adenosine deaminases. *Biosci. Rep.* **2008**, *28*, 335–347.

(28) Pantazopoulou, A.; Diallinas, G. Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiol. Rev.* **2007**, *31*, 657–75.

(29) Howgate, P. Kinetics of degradation of adenosine triphosphate in chill-stored rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int J. Food Sci. Technol.* **2005**, *40*, 579–588.

(30) Felici, F.; Cesareni, G.; Hughes, J. M. The most abundant small cytoplasmic RNA of *Saccharomyces cerevisiae* has an important function required for normal cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 3260–3268.

### 4.3 Evolución de indoles en el cava durante la crianza biológica

En este apartado se presentan los resultados del contenido y evolución en el cava de la melatonina y sus isómeros, y de otros indoles relacionados con su metabolismo. Es un tema reciente, cuya información disponible aún resulta poco esclarecedora. Posiblemente el problema radica en la variedad y sofisticación de los métodos utilizados en la determinación de la melatonina y/o sus isómeros.

La inclusión de los indoles como posibles indicadores del estado autolítico de las levaduras o del tiempo de crianza del cava, reside en los estudios de aquellos autores que defienden un origen ligado mayoritariamente a la actividad metabólica de la levadura. Teniendo en cuenta que el cava es un vino resultante de dos fermentaciones alcohólicas, se le puede suponer que esté especialmente enriquecido en melatonina, sus isómeros y metabolitos de su biosíntesis, como resultado de las condiciones de estrés de las levaduras.

#### 4.3.1 Origen y función de la melatonina y sus isómeros

La estructura química de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) fue identificada por primera vez en la glándula pineal de res por Lerner *et al.* (1958). Dado que la melatonina se descubrió inicialmente en la glándula pineal de los mamíferos, se creía que se producía exclusivamente en animales, particularmente en los vertebrados. El posterior hallazgo de la melatonina en organismos fotosintéticos (Pöggeler *et al.*, 1991) impulsó la investigación de este compuesto en otros taxones. Hasta ahora, la melatonina se ha detectado en bacterias, protozoos, algas, hongos, invertebrados (Hardeland y Poeggeler, 2003) y plantas (Arnao y Hernández-Ruiz, 2015).

La melatonina posee propiedades antiinflamatorias (Mauriz *et al.*, 2013) y reduce el estrés oxidativo mediante varios mecanismos, incluyendo acciones secuestradoras (*scavenger*) de radicales libres, regulación de genes (aumento de la expresión de enzimas antioxidantes, mientras que suprime enzimas pro oxidantes), y/o la mejora de la homeostasis mitocondrial. La gran mayoría de los estudios demuestran que la melatonina presenta acciones antioxidantes *in vivo*. Su efecto beneficioso y su valor terapéutico parecen prometedores para la salud, el envejecimiento y varias enfermedades degenerativas, incluyendo cáncer, isquemia y trastornos neurodegenerativos (Zhang y Zhang, 2014).

En los vertebrados, la melatonina (MEL) es sintetizada y secretada por la glándula pineal siguiendo un patrón circadiano (Reiter *et al.*, 2011). MEL también se sintetiza en otros tejidos extrapineales, como la retina (Tosini, 2000; Garbarino-Pico *et al.*, 2004), linfocitos (Carrillo-Vico *et al.*, 2004), células de la médula ósea y de los huesos (Conti *et al.*, 2000), mastocitos (Maldonado *et al.*, 2010), en el tracto

gastrointestinal incluyendo el epitelio biliar (Bubenik, 2002; Renzi *et al.*, 2013), etc. Sólo la melatonina originada en la glándula pineal y en el tracto intestinal es liberada a la circulación de la sangre en cantidades significativas. En el tracto gastrointestinal, las células entero-endocrinas del intestino generan esta hormona tras la ingestión de comida que contiene triptófano y luego la liberan a su torrente sanguíneo. En este tejido el nivel de MEL es 400 veces superior al de la glándula pineal (Bubenik, 2002). Parece que esta indolamida se utiliza como antioxidante local y como sustancia protectora para el hígado (Glaser *et al.*, 2014) y el intestino, contra una variedad de agentes nocivos, en particular las bacterias y sus toxinas, introducidos en el intestino con cada comida (Bubenik, 2002; Reiter *et al.*, 2011).

Recientemente ha surgido la hipótesis, desde un punto de vista evolutivo, que la mitocondria es el sitio original de la síntesis de la melatonina en las células eucariotas (Tan *et al.*, 2013). Tanto mitocondrias como cloroplastos pueden tener la capacidad de sintetizar melatonina. Se teoriza que estos dos orgánulos fueron los sitios iniciales de la biosíntesis de la melatonina en la etapa temprana de la endosimbiosis y su capacidad de biosíntesis se ha conservado durante la evolución. Probablemente estos orgánulos celulares requieren melatonina para proporcionar protección contra el estrés oxidativo y preservar sus importantes funciones fisiológicas. La melatonina puede ser considerada no sólo como un antioxidante mitocondrial, porque neutraliza directa e indirectamente los radicales libres, sino que también reduce la generación de radicales, a través de un fenómeno conocido como *radical avoidance*. Para lograr este efecto, la melatonina acelera el flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones y activa levemente el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial. Esto podría explicar por qué la melatonina es más protectora en las mitocondrias contra el estrés oxidativo que otros antioxidantes. La producción de la melatonina propuesta en mitocondrias y cloroplastos no necesariamente excluye la posibilidad de que otras orgánulos celulares también puedan ser capaces de generarla (Tan *et al.*, 2013).

#### Rutas de síntesis de la melatonina

La ruta biosintética de la melatonina en los vertebrados ha sido ampliamente estudiada y aceptada (Hardeland, 2010). Básicamente, cuatro enzimas incluyendo triptófano hidroxilasa (TPH), descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AAAD), arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT), y N-acetilserotonin metiltransferasa (ASMT) (anteriormente llamada hidroxilindol-O-metiltransferasa (HIOMT)) están involucrados; sus sucesivas actividades conducen a la formación de melatonina a partir de su precursor, el triptófano, teniendo como compuestos intermediarios el 5-hidroxitriptófano, serotonina y N-acetilserotonina (Figura 4.9).

Sin embargo, existe poca información disponible relacionada con la biosíntesis de la melatonina en otros organismos distintos de los vertebrados, con algunas excepciones como la de *Saccharomyces cerevisiae*. Sprenger *et al.* (1999) demuestra que la melatonina puede formarse en *Saccharomyces* a partir de los precursores de la ruta biosintética de los vertebrados, es decir, a partir de triptófano y a través del 5-hidroxitriptófano, la serotonina y N-acetilserotonina. En su investigación también detecta otros dos metoxiindoles que se han asociado frecuentemente con la melatonina en otros organismos unicelulares (Hardeland y Fuhrberg, 1996; Fuhrberg *et al.*, 1997): la 5-metoxitriptamina y el 5-metoxitriptofol. Las concentraciones de melatonina y de los otros dos metoxiindoles que se pueden encontrar en *Saccharomyces*, superan en varios órdenes de magnitud a los niveles que se encuentran estos mismos metoxiindoles en la sangre de los vertebrados. En *S. cerevisiae*, las condiciones de crecimiento pueden influenciar estos niveles. En este sentido, Sprenger *et al.* (1999) demuestra que la producción de melatonina y 5-metoxitriptamina depende de la disponibilidad que haya de triptófano en el medio, pero esto no pasa para el 5-metoxitriptofol, cuya principal vía de formación en la levadura permanece sin ser identificada. Por un lado, el 5-metoxitriptofol puede ser generado a través de la oxidación de la 5-metoxitriptamina por el enzima monoamino oxidasa (MAO) y la posterior reducción del aldehído indólico resultante por el enzima alcohol deshidrogenasa; alternativamente, el alcohol indólico también puede formarse a partir de 5-metoxitriptofano o por O-metilación del metabolito de la serotonina, 5-hidroxitriptofol (Hardeland *et al.*, 1993). En los experimentos de Sprenger *et al.* (1999), la 5-metoxitriptamina se forma 15 minutos después de que apareciera la melatonina, cuando la levadura crece en un medio de cultivo completo y también en un medio suplementando con serotonina y N-acetilserotonina (precursores de la melatonina). También se detectó en concentraciones muy altas después de la adición de melatonina, ya que puede formarse por desacetilación de la melatonina (Figura 4.9). Sin embargo, como la melatonina también puede generarse a partir 5-metoxitriptamina, existe una ruta biosintética alternativa posible: la O-metilación de la serotonina seguido por N-acetilación de 5-metoxitriptamina. A esta conclusión llegaron también con otra eucariota inferior, el dinoflagelado *Gonyaulax Polyedra*, en el que la melatonina se forma predominantemente a partir de N-acetilserotonina, pero también a partir de 5-metoxitriptamina si la serotonina está disponible en concentraciones altas, o cuando la actividad de desacetilación de la arilo acilamidasa es baja (Hardeland *et al.*, 1993; Hardeland y Fuhrberg, 1996) (Figura 4.9).

En el campo de la investigación de la melatonina, la aparición de isómeros de melatonina en la naturaleza representa un tema emergente. La melatonina y / o sus isómeros conviven en los organismos vivos, incluyendo levaduras, bacterias y plantas. Los niveles encontrados de isómeros de melatonina son significativamente más altos que los de melatonina en algunas plantas y en varios



productos fermentados tales como en el vino y el pan (Kocadağlı *et al.*, 2014). Actualmente, no hay artículos que documenten la presencia de isómeros de melatonina en los vertebrados aunque desde un punto de vista evolutivo, es poco probable que no existan, por el gran y diverso microbioma colónico que habita en el intestino y que probablemente intercambie materiales con el huésped. El origen de la melatonina y sus isómeros se remonta a las bacterias fotosintéticas y otros organismos unicelulares primitivos. El análisis filogenético basado en el enzima serotonina N-acetiltransferasa (NAT), enzima limitante de la velocidad de síntesis de la melatonina, indica sus múltiples orígenes durante la evolución. Por lo tanto, es probable que la melatonina y sus isómeros estén también presentes en el dominio de las arqueas, que puede que utilicen estas moléculas para protegerse contra ambientes hostiles, incluyendo la temperatura extremadamente alta o baja. La evidencia indica que la función inicial y primaria de la melatonina y sus isómeros sería como primera línea de defensa contra el estrés oxidativo, mientras que todas las demás funciones fueron adquiridas durante la evolución, ya sea por el proceso de adaptación o por la extensión de su capacidad antioxidante (Tan *et al.*, 2014).

Todos los isómeros de melatonina son estructurales y sus grupos funcionales se unen a diferentes sitios en el núcleo del indol. La estructura de la melatonina tiene dos cadenas laterales distinguibles, que se añaden al anillo de indol: el grupo metoxi en la posición 5 (grupo 5-metoxi) y el grupo N-acetilaminoetilo en la posición 3 (3-N-acetilaminoetilo) (Figura 4.10). En teoría, cualquiera de estas dos cadenas laterales pueden ser potencialmente reubicadas en cualquiera de las siete posiciones del anillo indol para formar isómeros de melatonina. Sobre esta base, se podrían formar 42 combinaciones de estas dos cadenas laterales en siete posiciones diferentes. Por lo tanto, pueden existir 42 isómeros potenciales de melatonina cuya nomenclatura ya se ha propuesto (Tan *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista de las funciones biológicas, los isómeros de melatonina muestran actividad antioxidante y citoprotectora dependiendo de la posición de las dos cadenas laterales en el anillo indol (Spadoni *et al.*, 2006). Las rutas biosintéticas de los isómeros, en base a la limitada información disponible, parece que difieren de las rutas biosintéticas de la melatonina. Especialmente en aquellos compuestos en los que la cadena lateral alifática no está unida al carbono 3 del anillo, el material de partida puede que no sea el triptófano. Además, las vías metabólicas de los isómeros siguen siendo desconocidas (Tan *et al.*, 2012).

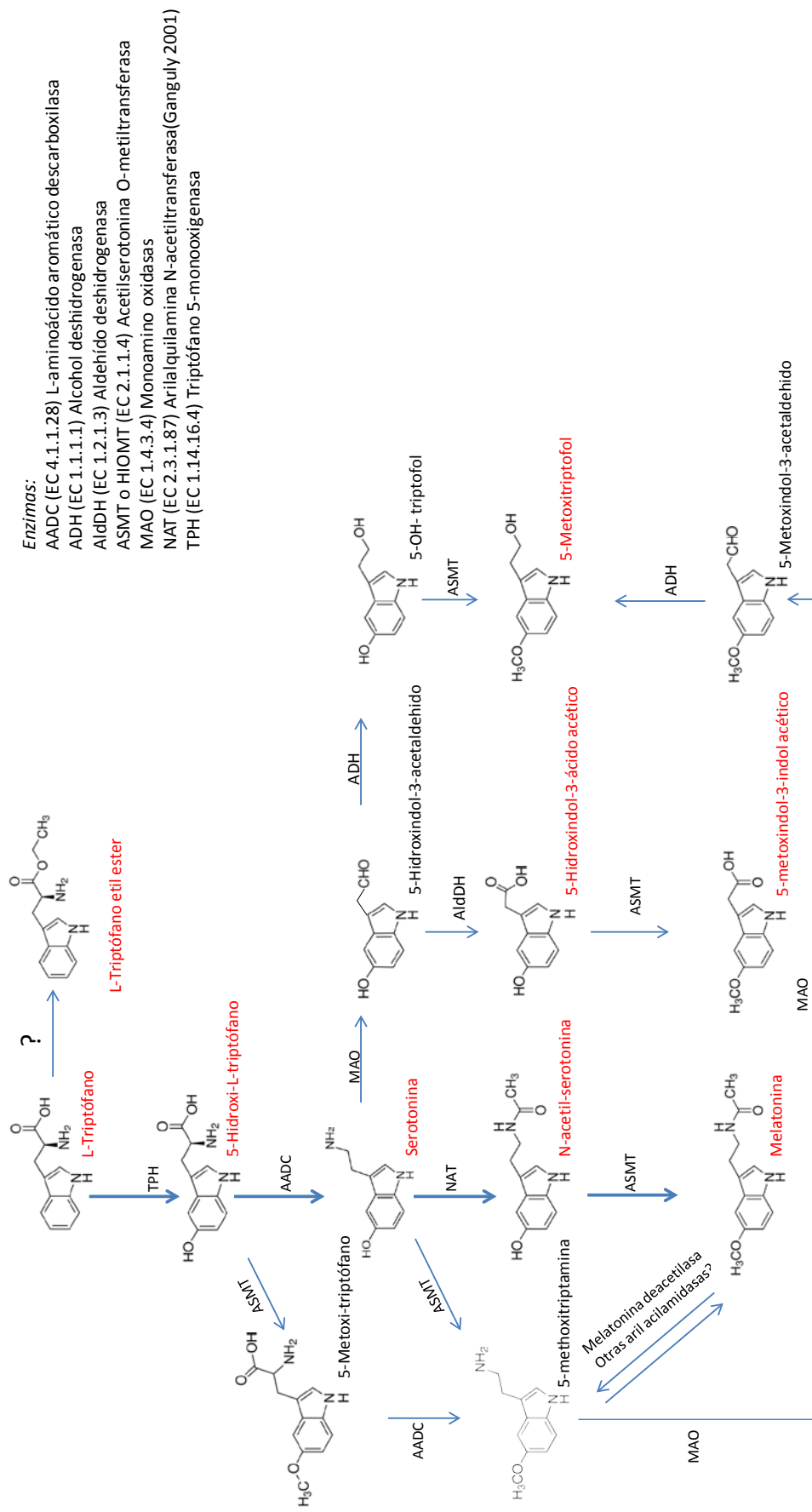


Figura 4.9: Red del metabolismo de los metoxiindoles. En letras rojas los 9 indoles analizados en este estudio. Con las líneas más gruesas se señala la ruta principal de biosíntesis de la melatonina, teniendo como precursor el triptófano. Figura adaptada de Hardeland, (2010).

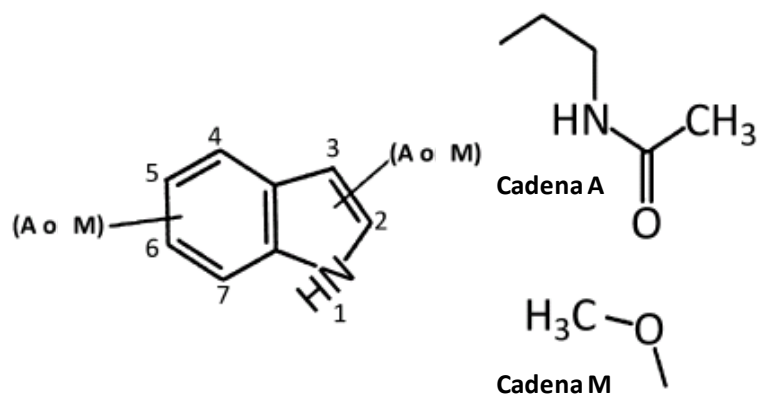


Figura 4.10: Estructuras químicas propuestas de los isómeros de melatonina. Los números identifican las posiciones en el anillo indol y A o M representa la cadena lateral A y cadena lateral M, respectivamente (figura adaptada de Tan *et al.*, 2012).

#### 4.3.2 Antecedentes bibliográficos en vinos

En animales y humanos, la ingesta de productos alimenticios que contienen melatonina puede contribuir a aumentar el nivel sérico de este compuesto. Por ello y por las propiedades anteriormente descritas en el apartado anterior, existe un creciente interés en conocer su posible aportación como compuesto bioactivo a la dieta mediterránea y como componente clave de la misma, el vino. El hallazgo de melatonina en vinos abriría una interesante perspectiva asociada a la gran cantidad de beneficios para la salud relacionados con el consumo moderado de vino. El consumo regular y moderado de vino se asocia a menudo con la reducción de la morbilidad y la mortalidad de una variedad de enfermedades crónicas en las que la inflamación es la causa (Fernández-Mar *et al.*, 2012).

La primera vez que la melatonina se detectó en uva fue hace alrededor de una década, en el exocarpio de la baya de diferentes variedades de vid (Iriti *et al.*, 2006). Desde entonces, esta indolamina se ha detectado en otros tejidos de la uva con unos niveles que varían de acuerdo a factores endógenos y exógenos, tales como los rasgos genéticos, las condiciones ambientales y climáticas y las prácticas agrícolas (Iriti y Vigentini, 2015) (Tabla 4.1). En vino fue detectada por primera vez por Mercolini *et al.* (2008) (Tabla 4.2).

Tabla 4.1: Contenido de melatonina en uvas (adaptada de Iriti y Vigentini, 2015)

| <b>Variedad</b>   | <b>Melatonina (ng /g)</b> | <b>Bibliografía</b>              |
|---|---------------------------|----------------------------------|
| Nebbiolo, Croatina, Barbera, Sangiovese, Marzemino, Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc (piel, Italia) | 0.005–0.96                | Iriti <i>et al.</i> , 2006       |
| Malbec, Cabernet Sauvignon, Chardonnay (piel, Argentina)  | 0.6–1.2                   | Stege <i>et al.</i> , 2010       |
| Merlot (toda la baya, Canadá)   | 100,000–150,000           | Murch <i>et al.</i> , 2010       |
| Merlot (piel, Italia)   | 9.3–17.5                  | Vitalini <i>et al.</i> , 2011a   |
| Merlot (semilla, Italia)  | 3.5–10                    | Vitalini <i>et al.</i> , 2011a   |
| Merlot (pulpa, Italia)  | 0.2–3.9                   | Vitalini <i>et al.</i> , 2011a   |
| Malbec (piel, Argentina)  | 9–159                     | Boccalandro <i>et al.</i> , 2011 |
| Malbec (piel, Argentina)  | 120–160                   | Gomez <i>et al.</i> , 2012       |
| Albana, Sangiovese (toda la baya, Italia)   | 1.2, 1.5                  | Mercolini <i>et al.</i> , 2012   |
| Malbec (piel, Argentina)  | 440                       | Gomez <i>et al.</i> , 2013       |

Tabla 4.2: Contenido de melatonina y otros indoles en vino.

| Indoles                              | Varietades de uva   | Origen de la muestra   | Rango de concentración en vino ( $\mu\text{g/l}$ )   | Bibliografía                            |
|--------------------------------------|---|--|--|---|
| Trp                                  | Chardonnay (B) <sup>1</sup>   | Vino producido en un centro de investigación (Istituto agrario di San Michele) Italia  | 62-417   | Mattivia <i>et al.</i> (1999)           |
| Trp                                  | Kerner (B)  | Vino producido en el Centro de Investigación del Estado de Baviera. Alemania   | <12-24000  | Hoenicke <i>et al.</i> (2001)           |
| Ser                                  | Merlot (T) <sup>2</sup>   | Microvinificación en la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (Embrapa)  | 0-22900  | Manfroi <i>et al.</i> (2009)            |
| Mel                                  | Sangiovese (T) y Trebbiano (B)  | Vino comercial   | Sangiovese 0.5; Trebbiano 0.4  | Mercolini <i>et al.</i> (2008)          |
| Mel                                  | Malbec (T), Cabernet Sauvignon (T) y Chardonnay (B)   | Vino comercial   | Malbec: 0.24; Cabernet Sauvignon: 0.32; Chardonnay 0.16  | Stege <i>et al.</i> (2010)              |
| Mel y Mel iso                        | Cabernet Sauvignon (T), Jaen Tinto (T), Merlot (T), Palomino Negro (T), Petit Verdot (T), Prieto Picudo (T), Syrah (T) y Tempranillo (T). | Vino producido por el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Jerez de la Frontera España                        | <u>Mel</u> : Cabernet Sauvignon: 14.2, Petit verdot 5.1, Prieto Picudo: 49.0, Syrah: 86.5, Tempranillo: 129.5; <u>Mel iso</u> : Cabernet Sauvignon: 6.1, Jaen Tinto: 21.9, Merlot: 5.2, Palomino negro: 16.7, Prieto Picudo: 6.5, Tempranillo: 9.3   | Rodriguez-Naranjo <i>et al.</i> (2011a) |
| Mel                                  | Cabernet Sauvignon (T), Merlot, Syrah (T), Tempranillo (T), Tintilla de Rota (T) y Palomino Fino (B)                                      | Microvinificaciones con uvas procedentes del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Jerez de la Frontera España | Vino de prensa: Cabernet Sauvignon 74.13; Merlot 241.22; Tempranillo 77.72; Tintilla de rota 322.68. Vino en rama: Merlot 245.46; Syrah 423.01; tempranillo 306.86; Palomino Fino 390.82   | Rodriguez-Naranjo <i>et al.</i> (2011b) |
| Mel                                  | Groppello (T) y Merlot (T)  | Varietades cultivadas en viñedos experimentales y microvinificadas   | Gropello 8.1; Merlot 5.2   | Vitalini <i>et al.</i> (2011b)          |
| Mel, Trp, Ser y 5OHIA                | Albana (B)  | Lote certificado producido en una finca  | <u>Mel</u> : 0.6; <u>Trp</u> : 82; <u>Ser</u> : 5.5; <u>5OHIA</u> : 105  | Mercolini <i>et al.</i> (2012)          |
| Mel y Mel isos                       | Groppello (T), Melag (T), Nebbiolo (T), Terre di Rubinoro (T), Syrah (T), vino tinto y vino blanco  | Vinos comerciales  | <u>Mel</u> : Groppello 0.35, Melag 0.62, Nebbiolo 0.14, Terre di Rubinoro 0.17, Syrah 0.23, vino tinto 0.05-0.31, vino blanco 0.18; <u>Mel iso 1</u> : Groppello 26.3, Melag, 13.1, Nebbiolo 7.1, Terre di Rubinoro 26.4, Syrah 72.4, vino tinto 55.9-68.4, vino blanco 0.50; <u>Mel iso 2</u> : Groppello, Terre di Rubinoro 0.46, vino blanco 0.33; <u>Mel iso 3</u> : Groppello 1.0, Melag 0.49, Nebbiolo 1.8, Terre di Rubinoro 3.0, Syrah 4.1, vino tinto 1.5-4.2, vino blanco 19.2 | Vitalini <i>et al.</i> (2013)           |
| <u>Mel iso</u>                       | Malbec (T)  | Vinificación a escala piloto y de laboratorio  | <u>Mel iso</u> : 24 -18  | Gómez <i>et al.</i> (2012)              |
| <u>Mel isos</u>                      | Vino tinto  | Vinos comerciales  | <u>Mel iso 1</u> : 170.7; <u>Mel iso 2</u> : 0.75; <u>Mel iso 3</u> : 0.30   | Kocadağlı <i>et al.</i> (2014)          |
| <u>Mel</u> , <u>Trp</u> , <u>TEE</u> | Syrah (T)   | Vinos comerciales  | <u>Mel</u> : 3; <u>TEE</u> : 84; <u>Trp</u> : 152; Muestra de vino purificado: <u>Mel</u> : 27; <u>TEE</u> : 588; <u>Trp</u> : 12  | Gardana <i>et al.</i> (2014)            |

<sup>1</sup> B: vino blanco; <sup>2</sup> T: vino tinto; Mel: melatonina; Mel iso: isómero de melatonina; Mel isos: isómeros de melatonina.

Los métodos inicialmente utilizados para la identificación de la melatonina (MEL) fueron de tipo radioinmunoensayo, ELISA y HPLC. Sin embargo, ninguno de estos métodos, tenía la capacidad de identificar isómeros de melatonina. Aunque varios estudios habían usado la espectrometría de masas (MS) para detectar melatonina en muestras biológicas, estas publicaciones no mencionan la presencia de isómeros (Tan *et al.*, 2014). La primera publicación que hace referencia al origen natural de los isómeros de melatonina apareció en 2011 (Rodríguez-Naranjo *et al.*, 2011a). Rodríguez-Naranjo *et al.* (2011a), utilizando HPLC acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI MS/MS) para analizar muestras de vino, encontraron que en la supuesta fragmentación de melatonina ( $m/z$  233) los fragmentos menores no coincidían totalmente con los encontrados en la MEL (191, 161, y 141 no se detectaban). Después de un análisis detallado, identificaron estas moléculas como isómeros de melatonina. Posteriormente, varios artículos han confirmado que los isómeros de melatonina están presentes en el vino (Tabla 4. 2). Diferentes autores mostraron que algunos vinos sólo contienen melatonina (Mercolini *et al.*, 2008; Stege *et al.*, 2010; Mercolini, *et al.*, 2012; Vitalini *et al.*, 2011b; Rodríguez-Naranjo *et al.*, 2011b), otros contienen sólo un isómero (Gomez *et al.*, 2012), y en algunos casos contienen melatonina y hasta tres isómeros (Vitalini *et al.*, 2013; Kocadağlı *et al.*, 2014) (Tabla 4.2).

La concentración real de la melatonina en el vino es un tema de máxima actualidad. Los valores alcanzados van desde pg a ng/mL. Las diferentes marcas de vino o diferentes cepas de levadura pueden explicar sólo en parte estas grandes variaciones en las concentraciones. Es probable, sin embargo, que esas divergencias en los niveles de melatonina en el vino puedan ser principalmente el resultado de los diferentes métodos de análisis. Rodríguez-Naranjo *et al.* (2011a) calcula los niveles de melatonina en el mismo vino utilizando tanto el método ELISA como HPLC-MS/MS. Los resultados mostraron que los niveles de melatonina en el vino medido por HPLC-MS/MS fueron de 1 a 3 órdenes de magnitud superiores a los medidos por ELISA. Adicionalmente, también se ha indicado que este mismo vino contenía un posible isómero de melatonina. Los autores proponen que ELISA no es un método adecuado para medir el contenido de melatonina en los vinos y que los métodos de HPLC sí serían válidos para este propósito. Sin embargo, HPLC por sí sola no podría detectar isómeros en los vinos sin patrones de referencia. Teniendo en cuenta que el contenido del isómero en algunos vinos es mucho más alto que el de melatonina, los niveles están marcadamente subestimados, ya que los ensayos utilizados eran incapaces de reconocer cualquier isómero que pudiera haber estado presente. Para obtener niveles precisos se requieren métodos avanzados de medición tales como HPLC-MS/MS, y patrones de referencia de todos los isómeros. Más recientemente se ha determinado, aplicando la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-HRMS) y realizando la fragmentación de analitos por HRMS/MS, que

el isómero más abundante de melatonina identificado anteriormente en vino es en realidad el etil éster del triptófano (TEE) (Gardana *et al.*, 2014).

En estudios previos ya se había informado de que los ésteres de aminoácidos contribuyen significativamente al conjunto de compuestos básicos que se encuentran en los vinos (no se menciona el etil éster del Trp, el TEE). El intervalo de concentraciones totales de ésteres etílicos de aminoácidos en vinos oscila entre 3,5 a 14,6 mg/L. En los vinos de jerez, el rango de concentración total es aún mayor, 33,1 a 51,7 mg/L (Herraiz y Ough, 1992). Los ésteres etílicos de aminoácidos se forman durante la fermentación alcohólica por las levaduras. (Heresztyn, 1984; Herraiz y Ough, 1993). La formación se presenta principalmente en la segunda mitad de la fermentación, cuando el contenido de alcohol en el medio es alto. Al principio de la fermentación, aquellos aminoácidos que son absorbidos bien por las levaduras del medio o son sintetizados, se utilizan rápidamente en la biosíntesis de proteínas. Cuando la concentración intracelular de etanol es alta, el etanol puede esterificar los aminoácidos activados previamente para la biosíntesis de proteínas. Al final de la fermentación, cuando la levadura permanece en contacto con el vino, aumentan tanto los aminoácidos como sus ésteres etílicos (Herraiz y Ough, 1993). En estos estudios también se encontraron algunas diferencias en función de las cepas de levaduras utilizadas. Así, al contrario que la melatonina, los ésteres de aminoácidos tales como el TEE, derivarían únicamente de la actividad de la levadura (Gardana *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta las pequeñas cantidades presentes en los alimentos (Gardana *et al.*, 2014) la identidad de esta molécula puede que la haga menos interesante que cuando era un supuesto isómero de melatonina, aunque podría ser más biodisponible que el Trp al ser más liposoluble y pasar barrera hematoencefálica. Un estudio reciente (Vigentini *et al.*, 2015) se centró en la posibilidad de que diferentes especies de levaduras tanto *Saccharomyces* como no *Saccharomyces* produjeran derivados del triptófano (MEL, isómeros y TEE) en condiciones de laboratorio y en condiciones enológicas. Las tres cepas de levadura analizadas fueron capaces de producir melatonina, isómeros de melatonina y TEE en diferentes medios alcohólicos a cualquier concentración de TRP (medio suplementado con 20 y 100 mg/l de TRP) aunque la concentración final excretada al medio fue dependiente de la cepa. Sin embargo, en condiciones enológicas las levaduras fueron incapaces de producir melatonina e isómeros, pero sí TEE, cuya concentración aumentó hasta el final de la fermentación, momento a partir del cual los niveles disminuyeron.

Como el cava es un vino espumoso que necesita una segunda fermentación para su elaboración, el objetivo de este estudio es conocer si debido a esta segunda fermentación se detecta alguno de los 9 indoles (Figura 4.9) relacionados con el metabolismo de la melatonina y si es así, estudiar cómo evolucionan éstos a lo largo de la crianza.

### 4.3.3 Análisis de indoles en las muestras de cava

El estudio del contenido y evolución de indoles en el cava comprende la puesta a punto del método UPLC-MS/MS, sin pre-tratamiento de la muestra para evitar la posibilidad de que aparezcan artefactos, y la determinación de los parámetros característicos que avalan su aplicación: efecto matriz, límites de detección y cuantificación, reproducibilidad y sensibilidad (apartado 4.3.3.1). Posteriormente, el método se ha aplicado a 29 muestras de cavas de las bodegas Freixenet, Segura Viudas y Castellblanch, cuyo tiempo de crianza con lías se conoce con exactitud y elaborados a partir de dos categorías de vino base, el que se suele utilizar en cada bodega para los cavas de calidad estándar y, el vino base seleccionado para elaborar los cavas de mayor excelencia (Figura 3.4 del apartado 3.2 y Tabla 4.3). También se han analizado 45 cavas adquiridos en el comercio, cuyo periodo de crianza biológica se deduce de la categoría comercial a la que pertenecen (Figura 3.4 del apartado 3.2 y Tabla 4.4), pero no se conoce con exactitud el tiempo de crianza biológica (los meses que definen las categorías comerciales son tiempos mínimos) ni el tiempo de almacenamiento sin lías:

- Crianza post-fermentativa: de 3 a 6 meses desde el tiraje (espumosos que aún no son cavas)
- Cavas jóvenes: de 9 hasta 15 meses de crianza
- Cavas Reserva: de 15 hasta 30 meses de crianza
- Cavas Gran Reserva: desde 30 hasta 60 meses de crianza

El origen de las muestras es, en este caso, muy variado. Proceden de uvas de diferentes añadas y también de distintas bodegas, lo cual significa que se han utilizado cultivos de levadura seleccionados en virtud de la experiencia de la bodega, y se han aplicado operaciones tecnológicas diferentes. Si a pesar de estos factores de variabilidad se observa relación entre el tiempo de crianza y el contenido de indoles, se entiende que dicha relación aún podrá ser mayor en muestras del mismo cava a lo largo de la crianza, puesto que se habrían eliminado las variables cepa de levadura, añada y bodega, al igual que sucedía con las muestras utilizadas en la determinación de los nucleótidos durante la evolución de su crianza.



#### **4.3.3.1 Validación de un método de Ultra Alto Rendimiento mediante Cromatografía Líquida (UHPLC) tándem espectrometría de masas (MS / MS) para la cuantificación de nueve indoles en los vinos espumosos**

##### **4.3.3.1.1 Resumen**

**Tudela, R.,** Ribas-Agustí, A., Buxaderas, S., Riu-Aumatell, M., Castellari, M., López Tamames, E., 2015. Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) tandem mass spectrometry (MS/MS) method for the quantification of nine target indoles in sparkling wines. Pulicación enviada a *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

El objetivo de este estudio fue la puesta a punto de un método analítico basado en la cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) en tándem con espectrometría de masas (MS/MS). Su desarrollo permitió la determinación simultánea de nueve indoles relacionados con el metabolismo de la melatonina en vinos espumosos. El método propuesto requiere un tratamiento previo mínimo de la muestra, y los parámetros de validación (precisión, repetibilidad, LOD y efecto matriz) indican que es una técnica adecuada para el análisis rutinario. Se detectaron cuatro indoles a niveles cuantificables en varias muestras de cava comercial: 5-metoxitriptofol (5MTL), triptófano (TRP), éster etílico del triptófano (TEE) y n-acetilserotonina (NSER); dos de ellos, la NSER y el 5MTL, han sido descritos por primera vez en los vinos espumosos. En las mismas muestras, el contenido de melatonina (MEL), serotonina (SER), 5-hidroxitriptófano (5-OHTRP), ácido 5-hidroxiindolacético (5OHIA) y ácido 5-metoxi-3-indolacético (5MIA) se encontraron por debajo de los límites correspondientes de detección. El método propuesto podría ser un punto de partida prometedor para más estudios, que aclararen el efecto de la tecnología del vino espumoso en la ruta biosintética de la melatonina.

##### **Aportaciones más relevantes**

- Se ha desarrollado y validado un método basado en UHPLC@ MS / MS, para la evaluación simultánea de 9 indoles implicados en el metabolismo de la melatonina en vinos espumosos.
- El protocolo propuesto no requiere pretratamiento de la muestra, y en aproximadamente 6 minutos se logra la separación completa de los nueve compuestos diana, por lo que se considera adecuado para análisis rutinarios.
- Entre los nueve indoles investigados, cuatro fueron detectados en muestras de cava: triptófano, éster etílico del triptófano, N-Acetilserotonina (NSER) y 5-metoxitriptofol (5MTL).
- Se ha detectado por primera vez la presencia de NSER y 5MTL en vino espumoso.

## Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)–tandem mass spectrometry (MS/MS) method for the quantification of nine target indoles in sparkling wines

Rebeca Tudela<sup>†</sup>, Albert Ribas-Agustí<sup>‡</sup>, Susana Buxaderas<sup>†</sup>, Montserrat Riu-Aumatell<sup>†\*</sup>, Massimo Castellari<sup>‡</sup>, and Elvira López Tamames<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Departament de Nutrició i Bromatologia, Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments (XaRTA), Institut de recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA), Campus de l'Alimentació de Torribera, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain, Universitat de Barcelona.

<sup>‡</sup>IRTA-Monells, Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Spain

\* Corresponding author. Tel.: (+34) 934033795; fax: (+34) 934035931  
E-mail address: [montseriu@ub.edu](mailto:montseriu@ub.edu) (M. Riu-Aumatell)

### Abstract

An Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) tandem mass spectrometry (MS/MS) method was developed for the simultaneous determination of nine target indoles in sparkling wines. The proposed method requires a minimal sample pretreatment, and the validation parameters (accuracy, repeatability, LOD and matrix effect) indicate that it is suitable for routine analysis.

Four indoles were found at detectable levels in commercial Cava samples, *i.e.* 5-methoxytryptophol (5MTL), tryptophan (TRP), tryptophan ethyl ester (TEE) and n-acetylserotonin (NSER); two of them, namely NSER and 5MTL, have been described for the first time in sparkling wines. In the same samples, the content of melatonin (MEL), Serotonin (SER), 5-hydroxytryptophan (5-OHTRP), 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5OHIA) and 5-methoxy-3-indoleacetic acid (5MIA) were below the corresponding limits of detection.

**Keywords:** UHPLC-MS/MS, melatonin, sparkling wines, indoles, tryptophan ethyl ester

## INTRODUCTION

The presence of neurohormone ubiquitous melatonin (MEL) in grapes and wines generated great interest of the wine industry in recent years.<sup>1-9</sup> MEL is considered a bioactive compound<sup>10</sup> with antioxidant activities, which have been related with the presence of two side chains in the indole ring.<sup>11</sup> First studies, suggested that MEL was formed in grapes.<sup>3,12-18</sup> However, recent findings pointed out that MEL is accumulated only during the winemaking process, being its presence in wine strictly related with the activity of the yeast during fermentation.<sup>1,2,19</sup> MEL can be formed by *Saccharomyces* yeasts from precursors of the common tryptophan (TRP) biosynthetic pathway, via 5-hydroxytryptophan (5OHTRP), serotonin (SER) and n-acetylserotonin (NSER). An alternative way for MEL formation involves a secondary metabolic pathway of *S. cerevisiae* through the O-methylation of the serotonin followed by the N-acetylation of 5-methoxytryptamine.<sup>20</sup> Furthermore 5-methoxytryptophol (5MTL) are produced by yeasts in association with MEL.<sup>19</sup>

Several Authors showed that wines may contain only melatonin,<sup>1,7,8,12,13</sup> or just one tentatively identified MEL isomer,<sup>3</sup> or, in few cases, melatonin and up to three possible MEL isomers.<sup>5,21</sup> More recently tryptophan ethylester (TEE) has been identified as one of the compounds previously described as the most abundant MEL isomers in red wine.<sup>22</sup> These recent findings underline the need for advanced analytical techniques to elucidate the indole-derived compounds involved in melatonin metabolism.

Determination of MEL and related indoles in wine has been initially carried out by HPLC with fluorimetric detection (HPLC-F),<sup>4,7</sup> and capillary electro chromatography (CE) with immobilized carboxylic multi-walled carbon nanotubes.<sup>12</sup> However, these protocols require different sample pretreatments as Microextraction by Packed Sorbent

(MEPS) or Solid Phase Extraction (SPE) in order to improve MEL detection, even if they increase the total time for analysis.<sup>4,5,7,13,23,24</sup> More recently hyphenated techniques as LC-MS/MS, UHPLC-MS/MS or LC coupled to High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) has been used to determine the content of MEL and other related compounds in wines.<sup>3,5,21,22</sup> The advantage of these techniques is a simplified sample preparation, e.g. dilution or filtration, and the structural information provided by the MS detectors that support identification.

The production of the Spanish “Cava” sparkling wines follows the classical or traditional method, which includes a second fermentation of the base wine to obtain the characteristic foam, bubbles and aroma. At the end of the second fermentation, yeast cells die and remain in contact with wine for a long time (up to several months). At this stage the intracellular compounds, including TRP, are released in wine,<sup>3,24-27</sup> and contribute to the development of the particular flavor and aroma of sparkling wines.

To the best of our knowledge, no study about MEL and its metabolic pathway has been performed until now in sparkling wine. Sparkling wines undergo two fermentations, so it might be expected that the assessment of indole-derived compounds metabolic pathway could be important to clarify the role of yeast and lees autolysis in the development of the characteristic sparkling wine quality.<sup>25,26,27</sup>

Therefore, the aim of this study was to develop a suitable UHPLC-MS/MS method, for the simultaneous identification and quantification of MEL and other eight indole compounds (Figure 1), involved in the melatonin metabolism pathway in sparkling wines.

Accuracy, repeatability, sensitivity and matrix effect of the method were assessed, and the levels of L-tryptophan (TRP), 5-hydroxy-L-tryptophan (5-OHTRP), serotonin

(SER), n-acetylserotonin (NSER), melatonin (MEL), 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5OHIA), 5-methoxytryptophol (5MTL), 5-methoxy-3-indoleacetic acid (5MIA) and tryptophan ethyl ester (TEE) in 18 commercial Spanish sparkling wines (Cava) were evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** L-tryptophan, 5-hydroxy-L-tryptophan, serotonin hydrochloride, n-acetyl-5-hydroxytryptamine, melatonin, 5-methoxytryptophol, 5-hydroxyindole-3-acetic acid, 5-methoxy-3-indoleacetic acid, L-tryptophan ethyl ester hydrochloride, L-tryptophan-d<sub>5</sub> (indole-d<sub>5</sub>) (I.S., internal standard) with an isotopic purity more than 97%, hydrochloric acid and ammonium hydroxide ACS were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Acetonitrile LC-MS grade was from Riedel-de Haën (Seelze, Germany), methanol, hexane and acetone HPLC grade were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Ultra-pure water was obtained by a Milli-Q system (Millipore, Milford, MA).

Single standard stock solutions and internal standard solution were prepared weekly by dissolving known amounts of pure standards in methanol (1,000 mg/L) and then stored at 4 °C until analysis in the dark. Spiking standard solutions (20 mg/L) were prepared weekly by diluting standard stock solutions with methanol.

**Samples.** A set of commercial Cava sparkling wines ( $n=18$ ) were purchased in local supermarkets, coming from several brands, produced at different winery in Cava region (Catalonia -Spain). Cava was produced following the traditional method in which the second fermentation it's followed by an aging time in contact with lees (minimum 9 months) in which the sparkling wine develops the characteristic foam and aroma.<sup>26,27,28</sup>

Once opened, samples were degassed by magnetic stirring for 5 min, and then stored in a 250 mL amber flask at -20 °C until analysis. The entire process was carried out under

reduced light conditions to prevent degradation of melatonin. Just before analysis, the samples were filtered with nylon membrane filter (0.2  $\mu\text{m}$ ).

**UPLC-MSMS conditions.** Analyses were carried out with an Acquity Ultra-Performance<sup>TM</sup> liquid chromatography system (UPLC), equipped with a binary pump system (Waters, Milford, MA). Detection was carried out by a TQD triple quadrupole MS detector (Waters, Milford, MA). Chromatographic separation was carried out with a BEH C<sub>18</sub> Shield column (150 x 1.0 mm i.d.) with 1.7  $\mu\text{m}$  particle size (Waters, Milford, MA), kept at 30 °C. A linear gradient elution was carried out from 95 % mobile phase A (5: 94.9: 0.1 v/v/v ACN: water: formic acid) and 5 % B (95: 4.9: 0.1 v/v/v ACN: water: formic acid) to 25 % A in 8 minutes, with a flow rate of 0.125 mL/min. Samples were maintained at 10 °C and the injected volume was 8  $\mu\text{L}$ .

Electrospray interface (ESI) was operated in the positive mode; the source temperature was fixed at 130 °C, the capillary voltage was set at +3.0 KV and the desolvation temperature was set at 350 °C. The cone gas (nitrogen) flow rate was 350 L/h. The gas used in the collision cell was argon at a flow rate of 0.1 mL/min. A “Multiple Reaction Monitoring” (MRM) mode was used to quantify the compounds. MS/MS experiments in “Daughter Ions” mode were also performed to study the fragmentation patterns of specific molecular ions. MRM conditions were optimized with the Autotune Wizard Software by infusing standard solutions (10 mg/L) of each compound. Two specific MRM transitions of the deprotonated molecular ions were monitored for each compound (one quantifier ion and one qualifier ion). Indole compounds were identified by comparing their retention time and MS/MS transitions with those obtained from pure standard solutions. Data acquisition and integration were controlled by MassLynx<sup>TM</sup> software (version 4.0).

**Analytical performances.** Standard addition calibration was created by spiking a cava sample with known amounts of standards at five levels (ranging from 1 to 50  $\mu\text{g/L}$  for 5MTL, NSER, MEL, 5OHTRP and TEE; from 5 to 50  $\mu\text{g/L}$  for 5MIA and 5OHIA; from 5 to 1000  $\mu\text{g/L}$  for TRP; from 100 to 500  $\mu\text{g/L}$  for SER), and by using tryptophan- $\text{d}_5$  as internal standard (I.S.) at a final concentration in the sample at 50  $\mu\text{g/L}$ . Calibration curves were created by plotting the ratio between the area of the quantitation transition and the area of the I.S. in the MRM mode vs. the corresponding concentrations of each target compound.

Limits of detection (LOD) quantification (LOQ) were defined as the lowest concentrations the assay can differentiate from the background levels with an S/N ratio  $>3$  and  $>10$ , respectively.

Repeatability was assessed by analyzing in triplicate three Cava sparkling wines (which were spiked with standard solutions for those compounds below the corresponding LOD).

Accuracy of the analytical assay was determined by analyzing three Cava sparkling wines spiked with standard solutions and calculating the percent ratio between expected and calculated concentrations for each compound.

Matrix effects were estimated for each compound by comparing the response in presence of matrix (spiked samples) with the response of pure compounds at the same concentration dissolved in mobile phase A.

## RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the MRM conditions and calibration parameters for the target compounds. Under our conditions, the best responses were obtained by working in positive mode for all the nine compounds object of this study. As previously reported by

other authors,<sup>3,4,22</sup> the fragment with  $m/z$  174.2 was the more intense for MEL. In the current study for TRP the first intense transition was 205.1 > 146.6, which was already described by others authors.<sup>29</sup> However, for Gardana et al.<sup>22</sup> the transition fragment most intense for TRP was 205 > 188, probably because the differences between the experimental setup.

The MRM profiles for a mixture of pure standards of the nine target compounds (plus the I.S.), and the profile of a cava sample were shown in Figure 2 and 3, respectively. Complete separation of all the target compounds was completed within 5.2 minutes, which, jointly with the minimal sample preparation allows a high sample throughput.

In all the Cava wine samples a relevant peak was found at 2.92 minutes with an  $[M+H]^+$  of  $m/z$  232. This peak (Figure 3) fits the retention time and the daughter ions spectra of the TEE pure standard (Figure 4), while the ratio between ions at  $m/z$  216 and  $m/z$  174 is in agreement with the results of the recent work of Gardana et al.<sup>22</sup> The comparison between the observed ratios between daughter ions at  $m/z$  216 and  $m/z$  174, for MEL and TEE (Figure 4), supports the hypothesis that the compound, formerly identified as one of the main MEL isomer in red wine,<sup>3</sup> was actually TEE.<sup>22</sup>

Linearity of the calibration curves could be considered satisfactory in the ranges of concentrations included in the protocol of analysis (Table 1). The slopes of SER and 5-OHIA (0.6 and 8.2 respectively) were very low if compared to other compounds, as in the case of TEE. As a consequence, sensitivity for these two compounds was clearly lower and the corresponding LOD values were significantly higher than the other ones (Table 2).

Table 4 showed a summary of previous studies found in literature about the analytical methods used by the determination of MEL and related compounds.



In the case of MEL, the LOD of our method was similar than the values reported by other authors operating with both HPLC-F and LC-MS/MS set-ups (Table 4). The LOD for TRP was better than those previously obtained by other authors working with HPLC-F.<sup>13,23,24</sup> LOD of SER was slightly higher than that reported by Mercolini et al.<sup>13</sup> with an HPLC-F method, but was comparable to that previously reported in fruit analysis by HPLC-MS/MS, where the detection limit was 50 µg/L.<sup>9</sup>

The LODs for the other target compounds were always lower than 1 µg/L (Table 2) and only in the case of 5OHIA the LOD was approximately 3 times higher than above-mentioned study of Mercolini et al.<sup>13</sup> using HPLC-F. LODs for TEE were comparable to that obtained by Vigentini et al.<sup>19</sup>

Both repeatability (with values always lower than 10%) and accuracy (Table 2) can be considered adequate for all the target compounds, taking to account that their levels in real samples are mainly in the range of few µg/L. Matrix effects were also acceptable, considering that the samples were injected without any pre-treatment to reduce the interfering compounds; only in the case of 5OHTRP the ionization suppression was higher than 30 %.

Thus the chromatographic performances and the validation parameters confirm that the analytical method fit-for-purpose the routine analysis requirements (Table 2). To check the suitability of the proposed protocol, a total of 18 samples of commercial sparkling wine were analyzed with the proposed method (Table 3). TRP was the compound detected with the higher concentrations in all the samples. The concentrations of TRP found in Cava sparkling wines were in accordance with the results of Mattivi et al.<sup>23</sup> obtained by HPLC-F method in Chardonnay wines (62-417 µg/L), but were somewhat lower than those cited by Hoenicke et al.<sup>24</sup> in different white wines (Table 4).

TEE was found in all Cava samples (Table 3); however, the amounts found in the current study, ranged between 0.1-2.7  $\mu\text{g/L}$ , were lower than those found by Gardana et al.<sup>22</sup> in Syrah wine (84  $\mu\text{g/L}$ ).

By our knowledge, no data were previously reported in the literature about the content of NSER and 5MTL in wines. The indole NSER, which is the immediate precursor of MEL according to its biosynthetic pathway,<sup>20</sup> was detected in all the Cava samples. The amount of NSER varied between 0.3 and 2.0  $\mu\text{g/L}$ . Moreover, 5MTL, another MEL precursor,<sup>20</sup> was also detected in variable amounts but in only three of the 18 samples analyzed (LOD-29.2  $\mu\text{g/L}$ ) (Table 3).

MEL, SER, 5MIA, 5OHIA and 5OHTRP were all under the detectable levels in the samples analyzed in this study (Table 3 and Figure 3). MEL has been found in different kind of wines at levels ranging from 0.05 to 423  $\mu\text{g/L}$  being 390.82  $\mu\text{g/L}$  the higher concentration found in white wines<sup>1</sup> (Table 4). The absence of detectable level of MEL in Cava wines could be due to the specific technology used for their preparation, which includes a second fermentation and a long aging (always higher than one year) which could contribute to the transformation and fading of the MEL eventually present in the base wines.

It should also underlined that MEL was actually found at detectable levels only in wines produced at laboratory scale or analyzed by HPLC-F.<sup>1,4,7,13,19</sup> On the contrary, the samples included in our study are commercially available Cava sparkling wines with a long ageing time (higher than 12 months) which could have influenced the final levels of MEL (Table 4).

SER was previously found in Albana wine at concentration below the LOD of our method, while 5OHIA, a SER metabolite, was previously found by Mercolini et al.<sup>13</sup> at 105  $\mu\text{g/L}$  in white wine. The undetectable levels of these compounds in our samples

could be related with the different condition for the wine elaboration and/or the differences in the LOD values between the methods.

In summary, an UHPLC<sup>®</sup> MS/MS method for the simultaneous assessment of nine indoles compounds involved in the MEL metabolism in sparkling wines has been developed and validated. The proposed protocol requires a limited sample pre-treatment, requires about 6 minutes for the complete separation of the nine target compounds and is suitable for routine analysis to give a quick overview about the level of some of the main indole-derived compounds involved in the MEL metabolism pathway. Among the nine indoles investigated, only four were detected in Cava samples, namely tryptophan (TRP), tryptophan ethyl ester (TEE), n-acetylserotonin (NSER), and 5-methoxytryptophol (5MTL). The presence of NSER and 5MTL in sparkling wine has been demonstrated for the first time. The proposed method could be a promising starting point for further studies to clarify the effect of sparkling wine technology on MEL biosynthetic pathway.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was made possible thanks to the financial assistance provided by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Spain) AGL2011-23872, and from the Generalitat de Catalunya, Project 2014SGR1438.

## REFERENCES

- (1) Rodríguez-Naranjo, M.I.; Gil-Izquierdo, A.; Troncoso, A.M. Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. *Food Chem.* **2011a**, 126, 1608-1613.

- (2) Rodriguez-Naranjo, M.I.; Torija, M.J.; Mas, A.; Cantos-Villar, E.; Garcia-Parrilla, M del C. Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions. *J. Pineal Res.* **2012**, *53*, 219-224.
- (3) Gomez, F.J.; Raba, J.; Cerutti, S.; Silva, M.F. Monitoring melatonin and its isomer in *Vitis vinifera* cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle. *J. Pineal Res.* **2012**, *52*, 349-355.
- (4) Rodriguez-Naranjo, M. I.; Gil-Izquierdo, A.; Troncoso, A. M.; Cantos-Villar, E.; Garcia-Parrilla, M. C. Melatonin: A new bioactive compound in wine. *J. Food Compost. Anal.* **2011b**, *24*, 603-608.
- (5) Vitalini, S.; Gardana, C.; Simonetti, P.; Fico, G.; Iriti, M. Melatonin, melatonin isomers and stilbenes in Italian traditional grape products and their antiradical capacity. *J. Pineal Res.* **2013**, *54*, 322-333.
- (6) Arevalo-Villena, M.; Bartowsky, E.J.; Capone, D.; Sefton, M.A. Production of indole by wine-associated microorganisms under oenological conditions. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 685-690.
- (7) Mercolini, L.; Addolorata Saracino, M.; Bugamelli, F.; Ferranti, A.; Malaguti, M.; Hrelia, S.; Raggi, M.A. HPLC-F analysis of melatonin and resveratrol isomers in wine using an SPE procedure. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1007-1014.
- (8) Vitalini, S.; Gardana, C.; Zanzotto, A.; Fico, G.; Faoro, F.; Simonetti, P.; Iriti, M. From vineyard to glass: agrochemicals enhance the melatonin and total polyphenol contents and antiradical activity of red wines. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 278-285.
- (9) Huang, X.; Mazza, G. Simultaneous analysis of serotonin, melatonin, piceid and resveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2011**, *1218*, 3890-3899.
- (10) Mas, A.; Guillamon, J.M.; Torija, M.J.; Beltran, G.; Cerezo, A.B.; Troncoso, A.M.; Garcia-Parrilla, M.C. Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 7 pp.
- (11) Spadoni, G.; Diamantini, G.; Bedini, A.; Tarzia, G.; Vacondio, F.; Silva, C.; Rivara, M.; Mor, M.; Plazzi, P. V.; Zusso, M.; Franceschini, D.; Giusti, P. Synthesis, Antioxidant activity and structure-activity relationships for a new series of 2-(*N*-acylaminoethyl) indoles with melatonin-like cytoprotective activity. *J. Pineal Res.* **2006**, *40*, 259-269.
- (12) Stege, P.W.; Sombra, L.L.; Messina, G.; Martinez, L.D.; Silva, M.F. Determination of melatonin in wine and plant extracts by capillary electrochromatography with immobilized carboxylic multi-walled carbon nanotubes as stationary phase. *Electrophoresis.* **2010**, *31*, 2242-2248.

- (13) Mercolini, L.; Mandrioli, R.; Raggi, M.A. Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. *J. Pineal Res.* **2012**, *53*, 21-28.
- (14) Iriti, M.; Rossoni, M.; Faoro, F. Melatonin content in grape: myth or panacea?. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 1432–1438.
- (15) Murch, S.J.; Hall, B.A.; Le, C.H.; Saxena, P.K. Changes in the levels of indoleamine phytochemicals during véraison and ripening of wine grapes. *J. Pineal Res.* **2010**, *49*, 95-100.
- (16) Vitalini, S.; Gardana, C.; Zanzotto, A.; Simonetti, P.; Faoro, F.; Fico, G.; Iriti, M. The presence of melatonin in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry tissues. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 331-337.
- (17) Boccalandro, H.E.; Gonzáles, C.V.; Wunderlin, D.A.; Silva, M.F. Melatonin levels, determined by LC-ESI-MS/MS, deeply fluctuate during the day in *Vitis vinifera* cv Malbec. Evidences for its antioxidant role in fruits. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 226-232.
- (18) Gomez, F.J.; Hernández, I.G.; Martinez, L.D.; Silva, M.F.; Cerutti, S. Analytical tools for elucidating the biological role of melatonin in plants by LC-MS/MS. *Electrophoresis.* **2013**, *34*, 1749-1756
- (19) Vigentini, I.; Gardana, C.; Fracassetti, D.; Gabrielli, M.; Foschino, R.; Simonetti, P.; Tirelli, A.; Iriti, M. Yeast contribution to melatonin, melatonin isomers and tryptophan-ethylester during alcoholic fermentation of grape musts. *J. Pineal Res.* **2015**, *58*, 388-396.
- (20) Sprenger, J.; Hardeland, R.; Fuhrberg, B.; Han, S.-Z. Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia.* **1999**, *64*, 209-213.
- (21) Kocadağlı, T.; Yılmaz, C.; Gökmen, V. Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *153*, 151-156.
- (22) Gardana, C.; Iriti, M.; Stuknyte, M.; De Noni, I.; Simonetti, P. 'Melatonin isomer' in wine is not an isomer of the melatonin but tryptophan-ethylester. *J. Pineal Res.* **2014**, *57*, 435-441.
- (23) Mattivia, F.; Vrhovsek, U.; Versini, G. Determination of indole-3-acetic acid, tryptophan and other indoles in must and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* **1999**, *855*, 227-235.
- (24) Hoenicke, K.; Simat, T. J.; Steinhart, H.; Köhler, H. J.; Schwab, A. Determination of Free and Conjugated Indole-3-Acetic Acid, Tryptophan, and Tryptophan Metabolites in Grape Must and Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5494-5501.

- (25) Henschke, P.A.; Jiranek, V. Yeasts - metabolism of nitrogen compounds. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*; G.H. Fleet (Ed.), Harwood Academic Publishers: Chur, Switzerland, 1993; pp.77-164.
- (26) Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. Yeast autolysis in sparkling wine A review, *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**, 12, 112–127.
- (27) Buxaderas, S.; López-Tamames, E. Sparkling wines: features and trends from tradition. *Adv. Food Nutr. Res.* **2012**, 66, 1-45.
- (28) Commission Regulation (EC) No 607/2009 of 14 July 2009 laying down certain detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards protected designations of origin and geographical indications, traditional terms, labelling and presentation of certain wine sector products.
- (29) Lu, W.; Kimball, E.; Rabinowitz, J.D. A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2006**, 17, 37-50.

Table 1: MRM conditions and linearity parameters for the target indoles analyzed

| Compound | MW    | [M+H] <sup>+</sup> | Cone voltage | Collision energy | MRM transition* | slope  | R <sup>2</sup> |
|----------|-------|--------------------|--------------|------------------|-----------------|--------|----------------|
| 5MIA     | 205.2 | 206.2              | 24           | 30               | 206.2 > 117.7   | 19.6   | 0.9988         |
|          |       |                    |              | 42               | 206.2 > 145.6   |        |                |
| 5MTL     | 191.2 | 192.1              | 28           | 26               | 192.1 > 159.6   | 41.4   | 0.9973         |
|          |       |                    |              | 34               | 192.1 > 131.5   |        |                |
| NSER     | 218.3 | 219.2              | 22           | 20               | 219.2 > 160.5   | 235.2  | 0.998          |
|          |       |                    |              | 38               | 219.2 > 115.7   |        |                |
| 5OHIA    | 191.2 | 192.3              | 24           | 38               | 192.3 > 117.9   | 8.2    | 0.9982         |
|          |       |                    |              | 48               | 192.3 > 91.7    |        |                |
| TRP      | 204.2 | 205.1              | 20           | 22               | 205.1 > 146.6   | 95.1   | 0.9999         |
|          |       |                    |              | 30               | 205.1 > 118.7   |        |                |
| TRPd5    | 209.3 | 210.3              | 20           | 22               | 210.3 > 151.6   | -      | -              |
|          |       |                    |              | 30               | 210.3 > 123.4   |        |                |
| MEL      | 232.3 | 233.1              | 24           | 18               | 233.1 > 174.2   | 519.7  | 0.9935         |
|          |       |                    |              | 12               | 233.1 > 216.1   |        |                |
| 5OHTRP   | 220.2 | 221.3              | 20           | 20               | 221.3 > 162.5   | 109.4  | 0.9997         |
|          |       |                    |              | 28               | 221.3 > 134.6   |        |                |
| SER      | 176.2 | 177.3              | 16           | 24               | 177.3 > 160.5   | 0.6    | 0.9987         |
|          |       |                    |              | 28               | 177.3 > 115.7   |        |                |
| TEE      | 232.3 | 233.1              | 20           | 18               | 233.1 > 174.0   | 2050.1 | 0.9953         |
|          |       |                    |              | 20               | 233.1 > 159.0   |        |                |

\*First transition = Quantifier; Second transition = Qualifier

Table 2: Validation parameters of target indoles

| Compound | LOD<br>( $\mu\text{g/l}$ ) | LOQ<br>( $\mu\text{g/l}$ ) | Repeatability <sup>a</sup> |                | Matrix effects<br>(n=3) | Accuracy <sub>b</sub><br>%<br>(n=3) |
|----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------------------|
|          |                            |                            | RSD%<br>(n=3)              | RSD %<br>(n=3) |                         |                                     |
| 5MIA     | 0.61                       | 2.01                       | 7.5                        |                | + 15.6 %                | 97.9                                |
| 5MTL     | 0.29                       | 0.96                       | 8.0                        |                | + 12.9 %                | 97.1                                |
| NSER     | 0.05                       | 0.17                       |                            | 8.2            | +0.5 %                  | 97.0                                |
| 5OHIA    | 1.46                       | 4.82                       | 9.3                        |                | -26.8 %                 | 99.2                                |
| TRP      | 0.13                       | 0.43                       |                            | 5.9            | - 10.1%                 | 98.5                                |
| MEL      | 0.02                       | 0.17                       | 4.8                        |                | + 19.7 %                | 98.3                                |
| 5OHTRP   | 0.11                       | 0.36                       | 3.6                        |                | - 38.8 %                | 99.0                                |
| SER      | 19.8                       | 65.34                      | 8.2                        |                | - 14.2 %                | 98.2                                |
| TEE      | 0.01                       | 0.03                       |                            | 6.4            | -4.6 %                  | 101.0                               |

<sup>a)</sup> n=3 samples in triplicate. Cava samples spiked with pure standards of the compounds below detectable levels in real samples (5 ppb for 5MIA, 5MTL, 5OHIA, MEL and 5OHTRP; 100 ppb for SER).

<sup>b)</sup> Calculated as: (expected value/ observed value) \* 100



Table 3. Indoles levels in sparkling wine samples (n=18) expressed as µg/L

| Abbr | Compound  | Max   | Min    | Median |
|------|---|-------|--------|--------|
| 5MTL | 5-Methoxytryptophol                               | 29.2  | <0.29* | 3.5    |
| NSER | n-Acetyl-5-hydroxytryptamine (n-acetyl serotonin) | 2.0   | 0.3    | 0.7    |
| TRP  | tryptophan  | 574.9 | 5.9    | 35.6   |
| TEE  | tryptophan-ethylester                             | 2.7   | 0.1    | 0.3    |

\*&lt;LOD

Table 4: Summary of the previous studies found in literature about the analytical methods used by the analysis of target indoles in wines

| Target compound(s) <sup>#</sup> | Analytical method  |  |   | Concentration range of the target compounds (µg/L)  | Ref.   |
|---------------------------------|--------------------|--|---|---|--|
|                                 | Technique          | Sample preparation                       | Other parameters of method                    |   |  |
| TRP                             | HPLC-F             | SPE                                      | LOD (µg/L)<br>8.7                             | Quantification by IS indol-3 propionic acid (200 µg/L) and recovery   | White wines (n=8): 62-417<br>Mattivi <i>et al.</i> (1999) <sup>23</sup>  |
| TRP                             | HPLC-F             | SPE                                      | 50  | Quantification by IS indol-3 propionic acid and 5-methoxy-tryptophan  | Pilot scale white wines (n=48): <12-24,000<br>Hoenicke <i>et al.</i> (2001) <sup>24</sup>  |
| MEL                             | HPLC-F             | SPE                                      | 0.01  | Quantification by IS myrtazapine (5µg/L), RSD <3.7 and recovery >90%  | Red wine: 0.5; White wine: 0.4<br>Mercolini <i>et al.</i> (2008) <sup>7</sup>  |
| MEL                             | CE                 | Direct injection after filtration        | 0.01  | Quantification by external standard; repeatability <4.1%; recovery >92%   | Red wines (n=2): 0.24-0.32; White wine: 0.16<br>Stege <i>et al.</i> (2010) <sup>12</sup>   |
| MEL and its isomers             | HPLC-F<br>LC-MS/MS | SPE for HPLC-F                           | HPLC-F: 51.7;<br>LC-MS/MS: 0.13               | Reproducibility <13.46%; recovery >83.34%; SPE recovery 98%   | Red wines (n=8) Mel: <LOD - 129.5; Mel Iso: <LOD - 21.9<br>Rodríguez-Naranjo <i>et al.</i> (2011b) <sup>4</sup>  |
| MEL                             | LC-MS/MS           | Dried and re-diluted in methanol.        | 0.13  | Quantification by external standard   | Pilot scale red wines (n=5): 74.13-423.01; White wine 390.82<br>Rodríguez-Naranjo <i>et al.</i> (2011a) <sup>1</sup>   |
| MEL and its isomers             | UPLC-MS/MS         | Direct injection after filtration        | 0.03  | Quantification by external standard; recovery >90%; <10.8%RSD   | Laboratory scale red wines (n=2) Mel: <LOD; Mel iso: 18-24<br>Gomez <i>et al.</i> (2012) <sup>3</sup>  |
| MEL, TRP, SER, 5OHIA            | HPLC-F             | Microextraction by packed sorbent (MEPS) | Mel: 0.02; Trp: 0.5; Ser: 0.2; 5OHIA: 0.5     | Quantification by IS 8-hydroxymirtazapin; reproducibility MEL <5.5%, TRP <5%, SER <5.1%, 5OHIA <5.3%; accuracy >90% | White wine Mel: 0.6; Trp: 82; Ser: 5.5; 5OHIA: 105<br>Mercolini <i>et al.</i> (2012) <sup>13</sup>   |
| MEL and its isomers             | LC-MS/MS           | Direct injection after filtration        | 0.03  | Quantification by external standard; recovery >86% (beer); <4.1% RSD  | Red wine Mel: <LOD; Mel iso 1: 170.7; Mel iso 2: 0.75; Mel iso 3: 0.30<br>Kocadağlı <i>et al.</i> (2014) <sup>21</sup>   |
| MEL and its isomers, TEE        | UPLC-MS/MS         | Dilution and centrifugation              | MEL: 0.1; TEE: 0.06                           | Quantification by external standard; recovery, MEL: 88-94%, TEE 92-96%; precision: 2.7 to 6.4 %RSD                  | Alcoholic mediums supplemented with Trp (n=21) (Mel: <LOD - 37.2; Mel iso 1: <LOD - 655.0; Mel iso 2: <LOD-439.0; TEE : <LOD-1,126.9<br>Vigentini <i>et al.</i> (2015) <sup>19</sup> |
| TRP, TEE, 5MTL, NSER            | UPLC-MS/MS         | Direct injection after filtration        | Trp: 0.19 ; Nser: 0.08; 5MTL: 0.29; TEE: 0.01 | See Table 1 and 2   | Sparkling wines (n=18) Trp: 5.9-574.9; Nser: 0.3-2.01; 5MTL: 0.29-29.2; TEE: 0.1-2.7<br>This study   |

# abbreviations as in table 1

Figure 1

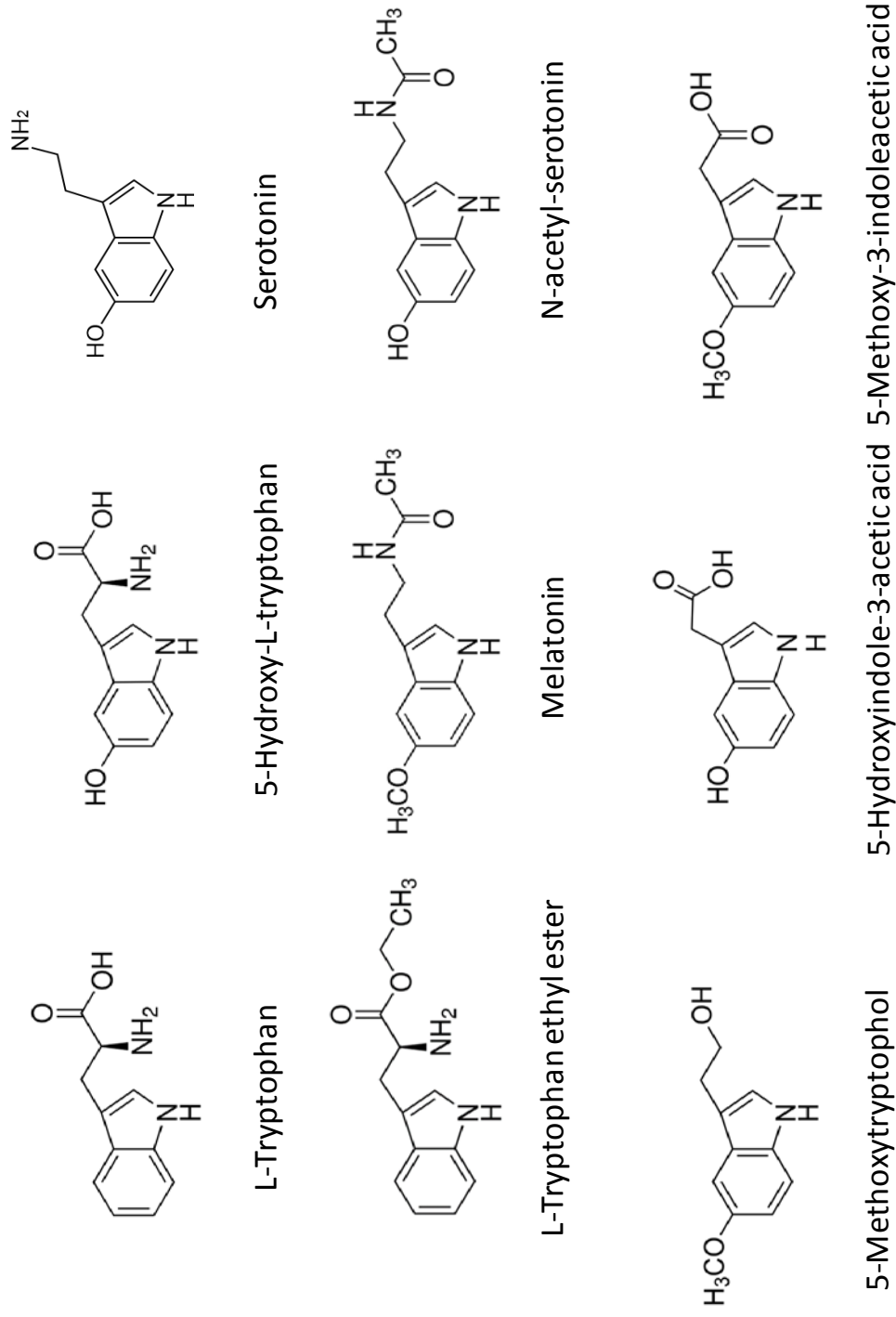


Figure 2

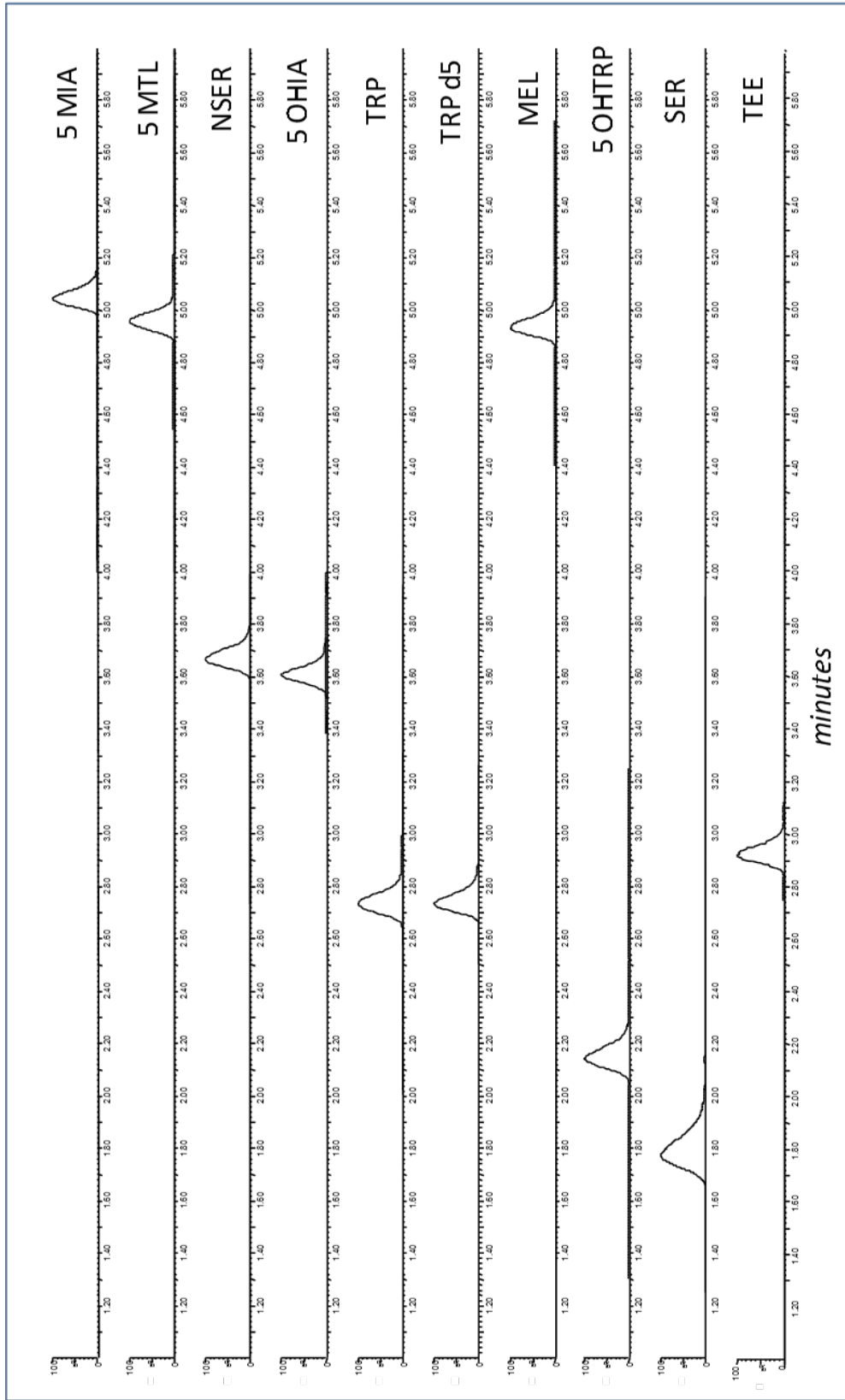


Figure 3

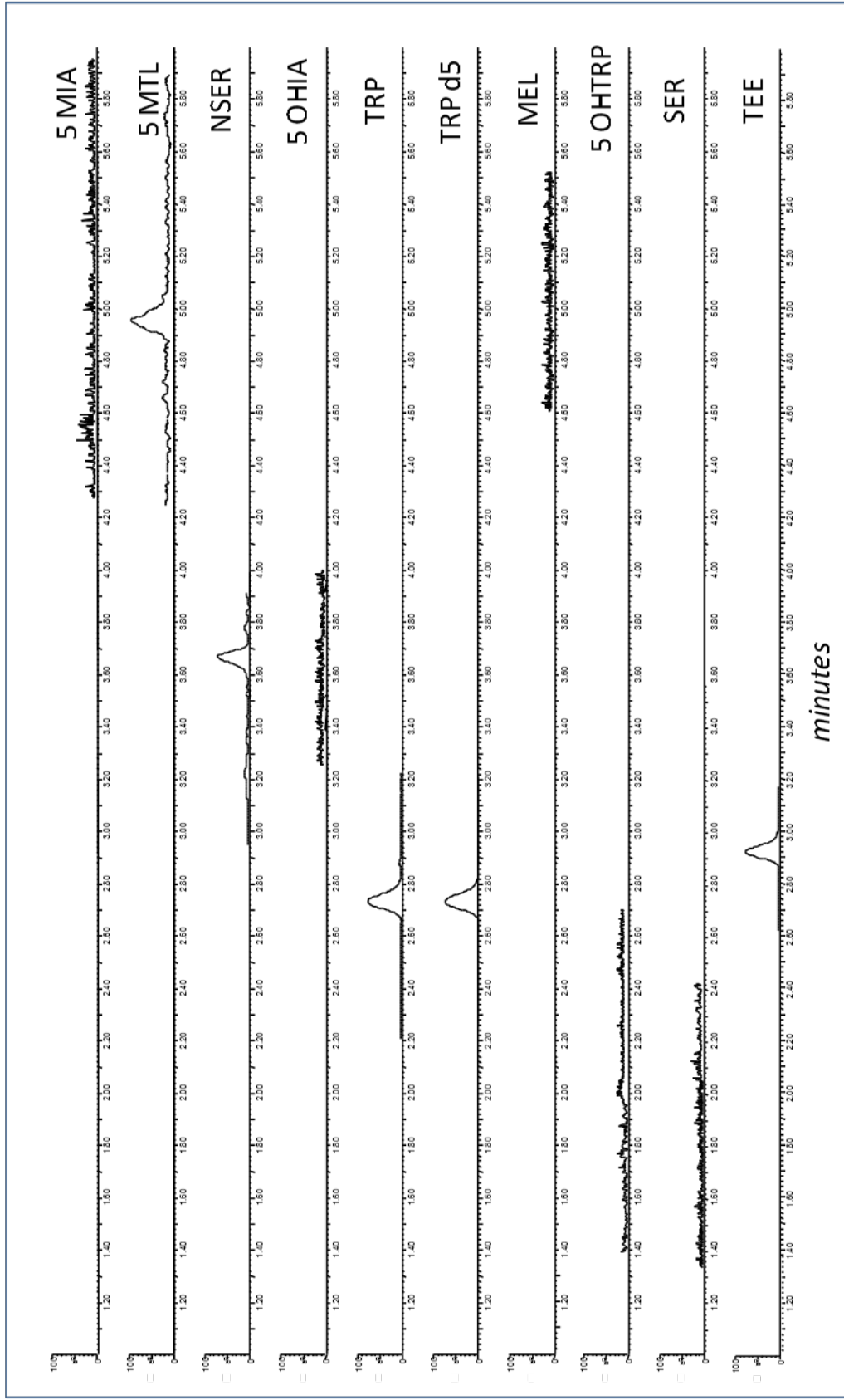
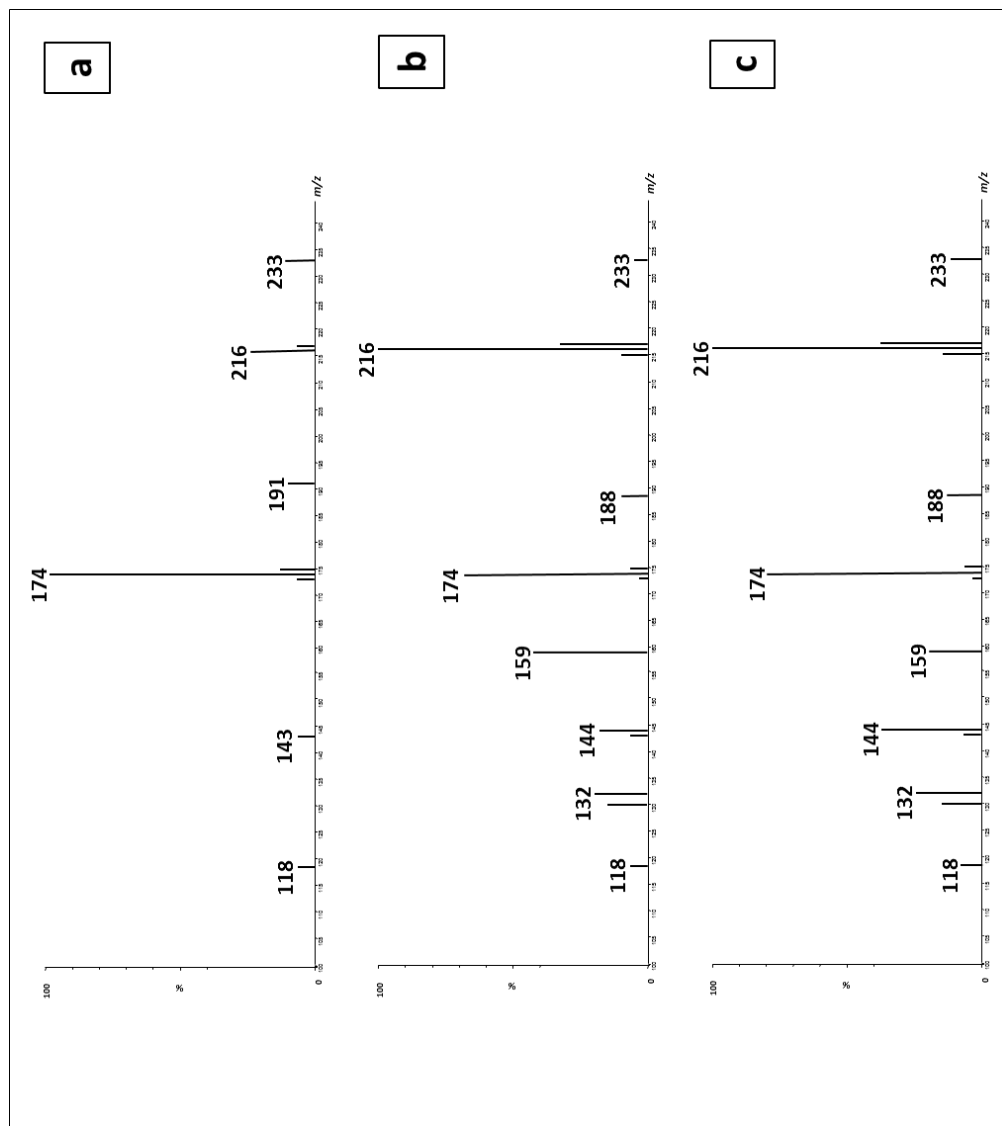


Figure 4



### **Figure Headings**

Figure 1: Structures of analyzed indoles.

Figure 2: MRM profile of indole standards.

Figure 3: MRM profile corresponding to the quantifier transition of a sparkling wine (1 $\mu$ L injected).

Figure 4: Daughter ions profiles from Collision Induced Dissociation at 15V for MEL standard (a); TEE standard (b); and peak in Cava sparkling wines at 2.92 min (c).

#### 4.3.3.2 Contenidos de indoles en muestras de cava con distinta crianza.

Se han analizado un total de 9 indoles, 5-metoxitriptofol (5MTL), triptófano (Trp), etil éster de triptófano (TEE), n-acetilserotonina (NSER), melatonina (MEL), serotonina (SER), 5-hidroxitriptófano (5-OHTRP), ácido 5-hidroindolacético (5OHIA) y ácido 5-metoxindolacético (5MIA) en diferentes muestras de cava (Tabla 4.3 y 4.4). El método validado previamente (apartado 4.3.3.1) ha permitido la determinación fiable de los nueve compuestos en un total de 29 muestras de rima (Tabla 4.3), 58 muestras de cavas blancos comerciales (Tabla 4.4) y 5 muestras de cavas rosados comerciales (Tabla 4.6).

En las muestras de cava se han identificado y cuantificado el triptófano (Trp), etil éster del triptófano (TEE), N-acetilserotonina (NSER) y 5-metoxitriptofol (5MTL). Pero, en ninguna muestra (ni de rima ni comercial) se han detectado melatonina o alguno de sus isómeros, SER, 5-OHTRP, 5OHIA ni 5MIA. El Trp es el indol que se encuentra en mayor cantidad, seguido del TEE y la NSER. El MLT no siempre se ha podido cuantificar (< LOQ) e incluso, no siempre se ha podido identificar (< LOD).

En la Tabla 4.3 se muestran los contenidos de los 4 indoles identificados en las 29 muestras de cava directamente recogidas en bodega (rima) y de las que se conoce el tiempo exacto de crianza; mientras que en la Tabla 4.4 se presentan los resultados del análisis de las 58 muestras comerciales de cava blanco, para las cuales el tiempo de envejecimiento con las lías es sólo aproximado, ya que sólo responden a la categoría comercial declarada en la etiqueta (>9 meses, >15 meses y >30 meses). Por ello, a continuación se expondrán los resultados en función de estos dos tipos de vinos: los obtenidos en bodega, que marcarán la evolución durante la rima, y los adquiridos en establecimientos, que permitirán establecer los contenidos en cavas de forma acorde a su categoría comercial.

#### Evolución de los indoles durante la toma de espuma y crianza biológica

El contenido de **triptófano** en el vino base oscila entre 1680.4 µg/l y 250.3 µg/l, y en muestras con la segunda fermentación terminada y posterior crianza entre 855.1 µg/l y 8.5 µg/l (Tabla 4.3). Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el contenido en vino base y el Gran reserva con el resto de las categorías (Figura 4.11). En este sentido, en la Figura 4.11 se observa que para unos límites decisión del 95%, la media de los vinos base está por encima del límite de decisión superior (LSD=616.8 µg/l) y en los cavas Gran reserva está por debajo del límite de decisión inferior (LDI=55.8 µg/l). El contenido de Trp desciende a medida que las muestras tienen más crianza (Tabla 4.3), siguiendo una línea de tendencia exponencial ( $\text{Trp} = 276.36 e^{-0.068t}$   $R^2 = 0.8$ ) y llegando a valores por debajo de 100 µg/l (Figura 4.12).



Comparando nuestros datos con estudios previos (Tabla 4.5), los contenidos de Trp en el vino base son significativamente inferiores con excepción del estudio de Moreno-Arribas *et al.* (2000). Esto puede ser debido a que nuestras muestras corresponden a añadas diferentes, y las cantidades de Trp en el mosto o en el vino se vean afectados por las condiciones climáticas de la cosecha y por diferentes medidas vitivinícolas, como el momento de la cosecha, tratamiento del suelo, y el deshojado (Hoenicke *et al.*, 2001). Martínez-Rodríguez *et al.* (2002) y Bozdogan y Canba (2012) describen la disminución del Trp después de 20 días de la inoculación de las levaduras. Esta disminución se debería a la asimilación de este aminoácido por *Saccharomyces*, cuya población está en aumento o mantiene una alta viabilidad durante esta etapa (Tabla 4.5). Estos autores observan disminución del Trp por asimilación seguida de aumentos en etapas post-fermentativas. Sin embargo, en la presente tesis, aunque sí vemos la asimilación, no podemos apreciar la excreción, ya sea porque la frecuencia del muestreo no nos lo permitió o por la diferente velocidad en los procesos bioquímicos post-fermentativos. Además, nuestros contenidos de triptófano en los vinos espumosos de esta etapa post-fermentativa siguen siendo menores que los de Martínez-Rodríguez *et al.* (2002), y Bozdogan y Canba (2012), oscilando entre 855.1 y 84.9  $\mu\text{g/l}$  (Tabla 4.3).

Los contenidos en Trp del estudio de Moreno-Arribas *et al.* (2000) no concuerdan ni con nuestros resultados ni con los de Martínez-Rodríguez *et al.* (2002), ni con Bozdogan y Canba (2012), anteriormente citados (Tabla 4.5): parten de un vino base sin triptófano y en su primer punto de muestreo, a los 9 meses, no se detecta y comienza a cuantificarse a partir de los 15 meses pero para desaparecer a los 24 meses. La no detección del Trp en el vino base por Moreno-Arribas *et al.* (2000) puede ser debida a que el contenido en mosto era muy bajo. Hoenicke *et al.* (2001) sugieren que la utilización de Trp por la levadura depende de la cantidad de Trp en el mosto y cuando éste es bajo, se puede llegar a consumir casi el 100% requiriéndose un mínimo de 15 mg/L para el crecimiento de la levadura.

Tabla 4.3. Contenido de indoles en diferentes categorías de cava y vinos base en ( $\mu\text{g/l}$ ) (muestras de bodega n=29)

| indoles               | Vino base (n=6)    |       |                   | crianza post-fermentativa (n=5) |      |                   | Cava (n=4) |                   |                   | Reserva (n=6)       |                   |                   | Gran reserva (n=8)  |     |                   |
|-----------------------|--------------------|-------|-------------------|---------------------------------|------|-------------------|------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-----|-------------------|
|                       | max                | min   | media             | max                             | min  | media             | max        | min               | media             | max                 | min               | media             | max                 | min | media             |
|                       | 5-Metoxi triptofol | 5.5   | <0.3 <sup>2</sup> | 1.9a                            | 3.0  | <0.3 <sup>1</sup> | 0.6ab      | <0.3 <sup>1</sup> | <0.3 <sup>1</sup> | <0.3 <sup>1</sup> b | <0.3 <sup>1</sup> | <0.3 <sup>1</sup> | <0.3 <sup>1</sup> b | 3.3 | <0.3 <sup>1</sup> |
| n-acetil serotonina   | 1.3                | 0.8   | 1.0a              | 0.93                            | 0.6  | 0.7b              | 1.3        | 0.5               | 0.8ab             | 0.8                 | 0.5               | 0.6b              | 0.7                 | 0.5 | 0.7b              |
| Triptófano            | 1680.4             | 250.3 | 1165.0a           | 855.1                           | 84.9 | 326.8b            | 180.3      | 95.4              | 133.3b            | 144.7               | 30.3              | 77.2b             | 32.5                | 8.5 | 16.4c             |
| Triptófano etil éster | 5.2                | 2.3   | 3.6a              | 6.3                             | 1.4  | 2.6ab             | 2.2        | 1.4               | 1.7bc             | 1.0                 | 0.3               | 0.7cd             | 0.4                 | 0.1 | 0.2d              |

Las letras diferentes en la misma línea indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias ( $p < 0,05$ ) por ANOVA.

Nota: <sup>1</sup><LOD

Tabla 4.4. Contenidos de indoles ( $\mu\text{g/l}$ ) en diferentes categorías de cava blanco (muestras comerciales n=58)

| indoles               | Cava (n=23)        |                    |                   | Reserva (n=20) |                    |                   | Gran reserva (n=15) |     |                   |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|----------------|--------------------|-------------------|---------------------|-----|-------------------|
|                       | max                | min                | media             | max            | min                | media             | max                 | min | media             |
|                       | 5-Metoxi triptofol | 29.2               | <0.3 <sup>1</sup> | 1.7a           | 5.4                | <0.3 <sup>1</sup> | 0.9a                | 5.7 | <0.3 <sup>1</sup> |
| n-acetil serotonina   | 2.3                | 0.3                | 0.8a              | 1.3            | 0.3                | 0.8a              | 1.1                 | 0.4 | 0.7a              |
| Triptófano            | 574.87             | 2.3                | 125.4a            | 179.5          | 2.9                | 66.4ab            | 128.1               | 5.9 | 38.8b             |
| Triptófano etil éster | 2.8                | <0.01 <sup>1</sup> | 0.7a              | 1.4            | <0.01 <sup>1</sup> | 0.4ab             | 0.6                 | 0.1 | 0.3b              |

Las letras diferentes en la misma línea indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias ( $p < 0,05$ ) por ANOVA.

Nota: <sup>1</sup><LOQ

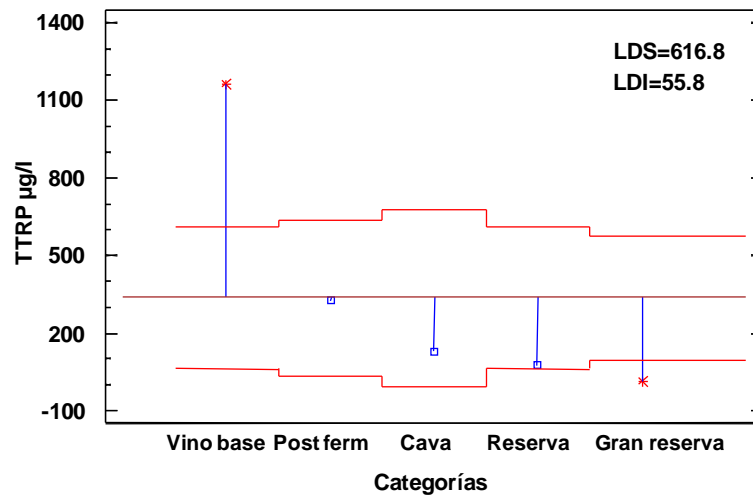


Figura 4.11: Gráfica del análisis de medias con el 95% de límites de decisión para el contenido en TRP µg/l, en cavas de bodega según las diferentes categorías de vino. LDI: límite de detección inferior; LDS: límite de detección superior.

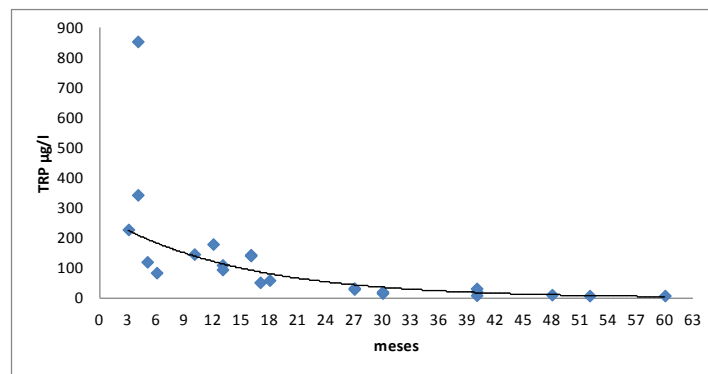


Figura 4.12: Evolución de los contenidos de Trp en vinos espumosos en fase de rima (n=23) a lo largo de los meses de crianza biológica.

Tabla 4.5: valores del triptófano (µg/l) en varios estudios en vino espumoso.

| vino base | 20 días            | 40 días  | 3 meses   | 6 meses  | 9 meses    | 12 meses | 15 meses               | 18 meses   | 24 meses | Bibliografía              |
|-----------|--------------------|----------|-----------|----------|------------|----------|------------------------|------------|----------|---------------------------|
| 0         | <sup>a</sup>       | -        | -         | -        | 0          | 0        | 730 ±1450 <sup>b</sup> | 8060 ±3190 | 0        | Moreno-Arribas (2000)     |
| 2600      | 600-0 <sup>c</sup> | 0        | 1400-1200 | 1400-600 | 1900-1000  | 2000-0   | -                      | -          | -        | Martínez-Rodríguez (2002) |
| 2200±50a  | 500±130b           | 810±300b | 730±160b  | 910±290b | 1780±1620a | 980±230b | -                      | -          | -        | Bozdogan y Canba (2012)   |
| 1165±527a | -                  | -        | 327±312b  |          | 133±38b    |          |                        | 77±52b     |          | Esta tesis                |

<sup>a</sup>)No cuantificado; <sup>b</sup>) Valor medio ± desviación estándar; <sup>c</sup>)Valores máximos y mínimos.

Las letras diferentes en la misma línea indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias (p <0.05) por ANOVA.

El indol **étil éster del triptófano**, anteriormente descrito como isómero de melatonina, se detecta en todos los vinos oscilando su contenido entre 5.2  $\mu\text{g/l}$  y 0.1  $\mu\text{g/l}$  y se observan diferencias estadísticamente significativas entre todas las categorías (Tabla 4.3). En la Figura 4.13 se aprecia como el TEE disminuye con el tiempo y presenta una línea de tendencia exponencial ( $\text{TEE} = 2.6705e^{0.067t}$   $R^2 = 0.8$ ) del mismo tipo que la del Trp (Figura 4.12). En la Figura 4.14 se observa que para unos límites de decisión del 95% la media de los vinos base está por encima del límite de decisión superior (LSD=2.6  $\mu\text{g/l}$ ) y en los cavas Gran reserva está por debajo del límite de decisión inferior (LDI=0.6  $\mu\text{g/l}$ ) de forma estadísticamente significativa.

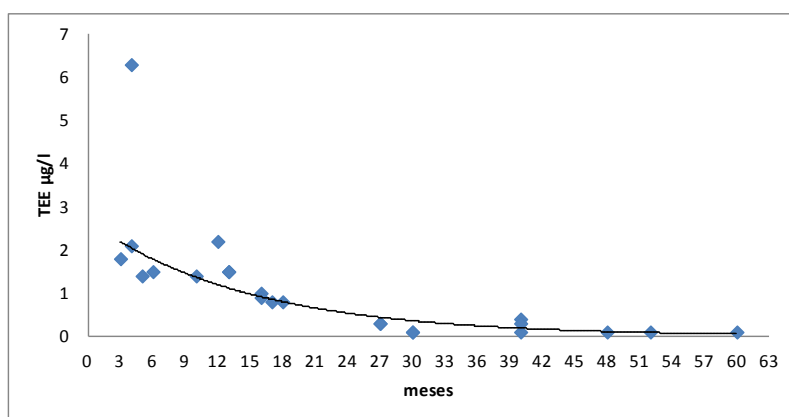


Figura 4.13: Evolución de los contenidos de TEE en vinos espumosos en fase de rima (n=23) a lo largo de los meses de crianza biológica.

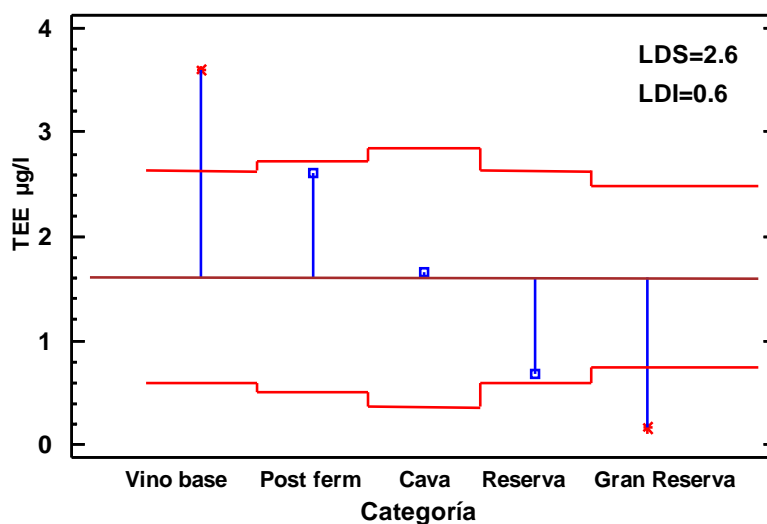


Figura 4.14: Gráfica del análisis de Medias con el 95% de límites de decisión para el contenido en TEE  $\mu\text{g/l}$ , en cavas de bodega según las diferentes categorías de vino. LDI: límite de detección inferior; LDS: límite de detección superior.

Estas tendencias similares entre el Trp (Figuras 4.3 y 4.4) y su éster etílico (TEE) (Figuras 4.5 y 4.6) se refuerzan por el hecho que estos dos indoles están correlacionados significativamente (Figura 4.15).

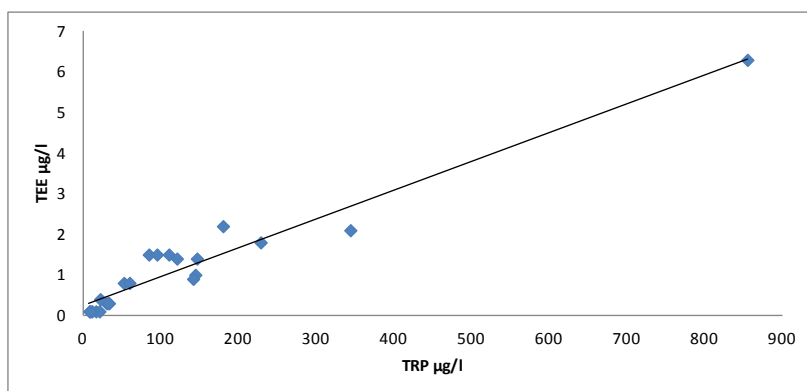


Figura 4.15: Regresión entre Trp y TEE en vinos de bodega (n=23).  $TEE=0,0071Trp+0,2365$   $R^2 = 0,9$ .

El **metoxitriptofol** (MTL) varía entre 5.5 µg/l y el límite de detección <0.3 µg/l (Tabla 4.3). Los vinos base presentan mayores contenidos de MTL que los cavas ( $p>0.05$ ), aunque no se ha podido establecer correlación con los meses de crianza, debido al bajo número de muestras en los que se cuantifica. El único estudio realizado del contenido y formación de este indol en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido el de Sprenger *et al.* (1999), el cual no clarifica qué es lo que induce su formación. El metoxitriptofol es un metoxiindol que podría estar implicado en la integración y la transmisión de información ambiental. Como posible ejemplo de esto es de destacar el papel del metoxitriptofol en el alga unicelular *Polyedra Gonyaulax*, donde la 5-metoxitriptamina y, en menor medida, el 5-metoxitriptofol demuestran tener más eficacia que la melatonina para inducir bioluminiscencia (Balzer y Hardeland, 1990). En otro estudio realizado sobre *Helix aspersa maxima* se planteó la cuestión de la importancia fisiológica del metoxitriptofol en los invertebrados (Blanc *et al.*, 2003). Los resultados sugieren que, dependiendo de la especie, la evolución filogenética o los diferentes biotopos en el que otras especies están viviendo, la importancia relativa de los diferentes 5-metoxiindoles podría variar. Se necesitan más investigaciones para probar tales hipótesis (Blanc *et al.*, 2003) y para esclarecer el papel del MTL en lías y vinos.

La **n-acetilserotonina** (NSER) se cuantifica en todos los vinos y las únicas diferencias significativas observadas han sido entre el vino base y los cavas post-fermentativos, los Reservas y los Gran reserva (Tabla 4.3). Estos últimos presentan menores contenidos de NSER que los vinos base, aunque la disminución no se ajusta significativamente a un modelo de correlación con los meses de crianza ( $p>0.2$ ).

No se ha encontrado ni **melatonina (MEL)** ni sus isómeros (**MELiso**) en ninguna de los 29 vinos analizados. No se ha encontrado melatonina del mismo modo que le ha ocurrido a otros autores (Vigentini *et al.*, 2015) donde en condiciones enológicas, las levaduras fueron incapaces de liberar al medio de crecimiento melatonina e isómeros. Gómez *et al.* (2012, 2013) encontraron melatonina en la piel de la baya (cv. Malbec), pero no se detectó en los vinos experimentales producidos a partir de las mismas uvas, donde sí se reportó un MELiso (Tabla 4.2 y Tabla 4 del artículo del apartado 4.3.3.1). Rodríguez-Naranjo *et al.* (2011) utilizando LC-MS-MS no encuentra niveles de melatonina en 5 mostos de uva tinta y uno de uva blanca, ni tampoco en ninguna parte de la baya analizada (pulpa, piel, semilla). En condiciones de laboratorio la síntesis de melatonina depende en gran medida de la fase de crecimiento de la levadura y la concentración de los azúcares reductores (Rodríguez-Naranjo *et al.*, 2012).

Sin embargo, aunque nuestro estudio está realizado en condiciones enológicas, difiere en los contenidos de melatonina aportados por otros autores, que sitúan los valores por debajo de 1 µg/l, excepto para Rodríguez-Naranjo *et al.* (2011a, b) y Vitalini *et al.* (2011b) que encuentran cantidades considerables (Tabla 4.2). Lo mismo sucede con los isómeros de melatonina, que también se cuantifican en microgramos litro. No obstante, estos datos se refieren a vinos tranquilos y no se han encontrado datos en vinos espumosos. Puede ser que durante la elaboración de los cavas y debido a la labilidad de la melatonina, ésta desaparezca o se transforme. En los datos bibliográficos recogidos en la Tabla 4.2 tampoco se menciona si los vinos eran jóvenes o de crianza. Nuestros resultados también podrían indicar la existencia de problemas de identificación debidos a los diversos métodos analíticos (consultar Tabla 4 del artículo enviado y en fase de revisión, apartado 4.3.3.1).

Tampoco se han detectado **serotonina (SER)** ni **5-hidroxitriptófano (5-OHTRP)**, **ácido 5-hidroxiindolacético (5-OHIA)** ni **5-metoxindol-3-indol acético (5-MIA)**. Tradicionalmente, conocer el contenido de serotonina en vino ha tenido interés por su posible contribución a la totalidad de las aminas biogénicas, aunque no sea común encontrarla en los vinos. La concentración y el contenido de aminas biógenas en los vinos pueden variar ampliamente dependiendo del tiempo de almacenamiento y las condiciones, la calidad de las materias primas, y la posible contaminación microbiana durante el proceso de elaboración del vino. Según Manfroi *et al.* (2009) las bacterias que realizan la fermentación maloláctica afectan significativamente los niveles de serotonina (Tabla 4.2), pero no se formaría durante la fermentación alcohólica. Los niveles indetectables de este compuesto en nuestras muestras, podrían estar relacionados con las diferentes condiciones en la elaboración de estos vinos, ya que la fermentación maloláctica no se ha realizado en la elaboración de los espumosos de este estudio (n=23). También pudiera ser que el contenido de serotonina estuviera por debajo de nuestro límite de detección. Utilizando la técnica HPLC-F el nivel encontrado en un

vino de la variedad Albana fue de 5.5 µg/l (Mercolini *et al.*, 2012) (Tabla 4.2) con un límite de detección de 0.2 µg/l, siendo inferior a nuestro límite de detección que fue de 19.8 µg/l. Se han encontrado cantidades muy elevadas de 23 mg/l en vinos pero son principalmente, como resultado de la fermentación maloláctica (Manfroi *et al.*, 2009). Sólo hemos encontrado un estudio donde se detecte el contenido de 5OHIA en un vino de la variedad albana 105 µg/l (Mercolini *et al.*, 2012) (Tabla 4.2).

#### Contenidos de índoles en cavas comerciales

La Tabla 4.4 se muestran los contenidos de indoles de cavas comerciales elaborados mediante vinificación en blanco (n=58). Se confirma que los índoles que se cuantificaban en los vinos de muestras de bodega (Tabla 4.3) son los mismos que se pueden encontrar en cavas comerciales, triptófano (Trp), etil éster del triptófano (TEE), N-acetilserotonina (NSER) y 5-metoxitriptofol (5MTL).

Respecto al contenido en **Trp** de espumosos comerciales se detectan diferencias estadísticamente significativas por ANOVA (Tabla 4.4) entre la categoría Cava y Gran reserva, igual que sucedía en las muestras de bodega. En esta tabla se aprecia también como el contenido disminuye a medida que las muestras pertenecen a una categoría de calidad superior. El contenido máximo en los cavas comerciales de la categoría Cava (Tabla 4.4) es mayor que en las muestras de la misma categoría de bodega (Tabla 4.3), y presentan un rango de concentración de triptófano muy variable, entre 574.9 y 2.3 µg/l. Esto puede ser debido a la gran variabilidad de muestras del estudio en cuanto a añada, variedades e incluso al tiempo real que las botellas han estado sin lías en el circuito comercial, ya que la categoría que se indica en la botella es el tiempo mínimo de crianza con lías. La gran variabilidad entre los cavas comerciales, incluso de la misma bodega, también se observa en la Tabla 4.7. Sin embargo, si tenemos en cuenta las medias de las categorías de Cava y de cava Gran reserva, éstas se sitúan en 125.4 µg de Trp/l y 38.8 µg de Trp/l, respectivamente ( $p < 0.05$ ) y se confirma que los espumosos comerciales Gran reserva presentan valores inferiores a los 55.8 µg de Trp/l, que era el límite de decisión que tipificaba la categoría comercial de los espumosos de más alta gama establecido en las muestras de bodega, cuyos tiempos de envejecimiento estaban perfectamente controlados.

El contenido de **TEE** en las muestras comerciales también sigue el mismo patrón que las muestras de bodega y que el Trp: se aprecia que disminuye a medida que las muestras pertenecen una categoría superior (Figura 4.14) o, lo que es lo mismo, según han estado más meses en crianza biológica. Si se tienen en cuenta, las medias del éster etílico del triptófano de las categorías de Cava y de cava Gran reserva, éstas se sitúan en 0.7 µg de TEE/l y 0.3 µg de TEE/l, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Los cavas Gran reserva comerciales están por debajo de 0.56 µg de TEE/l (límite de decisión inferior

establecido con los cavas de bodega) y, por tanto, se confirma que este umbral podría servir para su tipificación. Es decir, cuando un cava tenga indicado en la etiqueta que es un Gran reserva debería tener contenidos de etil triptófano inferiores a 0.6 µg/l.

En el caso del **MTL**, igual que sucedía con las muestras de bodega del punto anterior, no se ha podido establecer correlación con los meses de crianza, quizás porque sólo se detecta en 13 de los 63 cavas comerciales (Tabla 4.4).

La **NSER** no muestra diferencias estadísticamente significativas entre las distintas categorías aunque se detecta en todas las muestras y su contenido se encuentra entre 2.3 y 0.3 µg/l (Tabla 4.4).

Vitalini *et al.* (2013) apuntaba que los contenidos del principal isómero de la melatonina, identificado recientemente como TEE (Gardana *et al.*, 2014), eran superiores en vino tinto con respecto al vino blanco. Para corroborar esta observación, en la Tabla 4.6 se presentan los contenidos de los diferentes indoles en las 5 muestras comerciales de cava rosado. Comparando estos valores con los de los cavas de variedades blancas (datos estadísticos no mostrados) sólo se observan diferencias estadísticamente significativas en el contenido de NSER ( $p < 0.05$ ), pero no para el resto de los indoles. La media de la NSER en cava rosado es 0.26 µg/l y, sin embargo, en los cavas de variedades blancas es superior, 0.74 µg/l.

Tabla 4.6: Contenido de los diferentes indoles en cavas rosados (µg/l)

| TRP   | TEE | MTL    | NSER | Categoría | Variedades                            | (%vol) |
|-------|-----|--------|------|-----------|---------------------------------------|--------|
| 45.8  | 0.2 | <0.29* | 0.36 | Cava      | Monastrell, Garnatxa i Pinot noir     | 12     |
| 26.8  | 0.1 | <0.29  | 0.16 | Cava      | Pinot noir, Chardonnay, Pinot Meunier | 12     |
| 660.2 | 4,0 | <0.29  | 0.14 | Reserva   | Pinot Noir                            | 12     |
| 87.3  | 0,4 | <0.29  | 0.16 | Reserva   | Pinot Noir                            | 12     |
| 21    | 0,1 | <0.29  | 0.47 | Cava      | Pinot noir                            | 12     |

\*<LOD

Para poder estudiar la posible variabilidad entre cavas comerciales, en la Tabla 4.7 se muestran los resultados de diferentes cavas pero de la misma marca. La variabilidad entre muestras de la misma bodega (intra-bodega) ha sido superior a la variabilidad entre diferentes marcas (inter-bodega) (datos estadísticos no mostrados). Resulta curioso destacar la elevada variabilidad intra-bodega de la marca Bach. Asumiendo que la misma marca emplea la misma cepa de levadura de tiraje, la variabilidad posiblemente se deba a variabilidad en el vino base: las uvas podrían provenir de parcelas diferentes (Hoenicke *et al.*, 2001) o ser adquirido en cooperativas distintas.



Tabla 4.7: Comparación de contenidos de indoles ( $\mu\text{g/l}$ ) en cavas de la misma marca comercial

| Marca         | Trp   | TEE | 5MLT            | NSER | Crianza      | Añada          | Copage                        |
|---------------|-------|-----|-----------------|------|--------------|----------------|-------------------------------|
| Codorniu      | 75.4  | 0.3 | nd <sup>1</sup> | 0.6  | Cava         | - <sup>2</sup> | Macabeu, Xarel·lo i Parellada |
| Codorniu      | 80.2  | 0.3 | 1.93            | 0.3  | Cava         | -              | Macabeu, Xarel·lo i Parellada |
| Bach          | 427.5 | 1.9 | nd              | 1.7  | Cava         | -              | Macabeu, Xarel·lo i Parellada |
| Bach          | 99.2  | 0.6 | 2.53            | 0.4  | Cava         | -              | Macabeu, Xarel·lo i Parellada |
| Bach          | 88.6  | 0.4 | nd              | 0.4  | Cava         | -              | Macabeu, Xarel·lo i Parellada |
| Segura Viudas | 128.1 | 0.5 | nd              | 0.7  | Gran reserva | 2008           | -                             |
| Segura Viudas | 88.1  | 0.3 | nd              | 0.4  | Gran reserva | 2008           | -                             |
| Segura Viudas | 78.7  | 0.4 | nd              | 0.5  | Gran reserva | 2008           | -                             |
| Segura Viudas | 5.3   | 0.1 | nd              | 0.5  | Reserva      | 2004           | -                             |

Nota: <sup>1</sup>) no detectado; <sup>2</sup>) no aportado

Con la totalidad de los espumosos analizados ( $n=86$ ), se confirma la correlación entre el contenido de triptófano y el contenido de TEE, a mayor contenido de TRP mayor contenido de TEE (Figura 4.16). Este resultado corrobora que el TEE está directamente relacionado con el Trp en condiciones enológicas, como apuntaba Vigentini *et al.* (2015) sin análisis estadístico robusto.

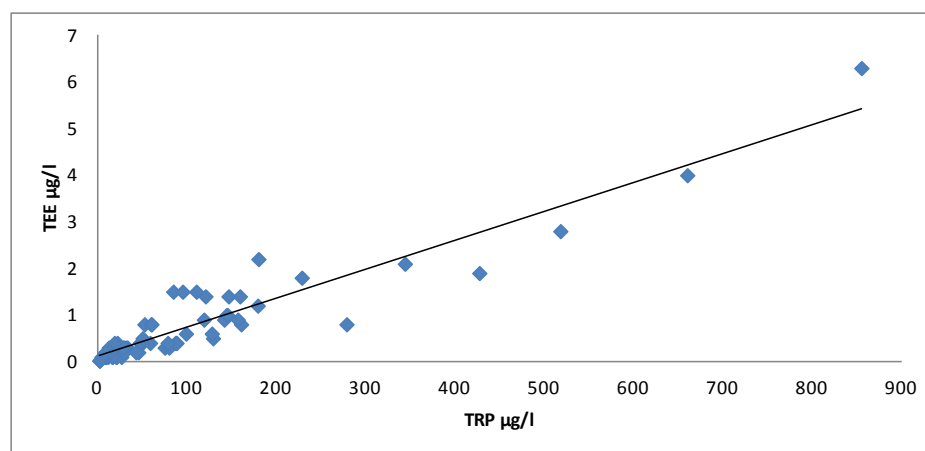


Figura 4.16: Correlación entre triptófano y TEE en muestras de espumosos comerciales y de bodega ( $n=86$ ) y =  $0.0062x + 0.103$   $R^2 = 0.8833$ .

En la Tabla 4.8 se muestran las correlaciones entre los indoles determinados y los parámetros generales de las muestras de bodega, de las cuales se tienen exactamente los meses de crianza con lías ( $n=29$ ). Como se ha comentado anteriormente, el TRP y el TEE están positivamente correlacionados ( $p < 0.0001$ ) y a su vez disminuyen con el tiempo (meses) de crianza ( $p < 0.0001$ ). Este tiempo de crianza también ocasiona un aumento de la absorbancia a 420 nm, hecho anteriormente observado por Serra-Cayuela *et al.* (2014). Quizás por este motivo, estos dos indoles asimismo se

correlacionan negativamente con este parámetro de color y con el grado alcohólico. El metoxitriptofol MTL se correlaciona en negativo con el grado alcohólico y con la acidez volátil, mientras que la NSER lo hace, también negativamente, con el pH. Estas correlaciones podrían depender del tiempo de crianza, ya que son parámetros que tienden a aumentar durante la rima.

Tabla 4.8: Correlaciones (n=29) entre los índoles determinados y los parámetros generales.

|                    |   | TRP           | TEE           | MTL           | NSER          | Año cosecha   | meses         | Grado % vol   | AT g/l  | pH            | Color (A 420 nm) | Acidez volátil g/l |
|--------------------|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------|---------------|------------------|--------------------|
| TRP                | r |               | 0,8060        | 0,2380        | 0,4336        | 0,6127        | -0,6016       | -0,8457       | -0,0595 | -0,4637       | -0,7784          | -0,1601            |
|                    | p |               | <b>0,0000</b> | 0,2137        | <b>0,0188</b> | <b>0,0004</b> | <b>0,0006</b> | <b>0,0000</b> | 0,7593  | <b>0,0113</b> | <b>0,0000</b>    | 0,4067             |
| TEE                | r | 0,8060        |               | 0,1513        | 0,3523        | 0,7104        | -0,7308       | -0,5873       | -0,0570 | -0,2466       | -0,8316          | 0,0404             |
|                    | p | <b>0,0000</b> |               | 0,4334        | 0,0609        | <b>0,0000</b> | <b>0,0000</b> | <b>0,0008</b> | 0,7691  | 0,1972        | <b>0,0000</b>    | 0,8353             |
| MTL                | r | 0,2380        | 0,1513        |               | 0,0190        | 0,2612        | -0,2637       | -0,4692       | -0,2438 | -0,3505       | -0,3426          | -0,5473            |
|                    | p | 0,2137        | 0,4334        |               | 0,9222        | 0,1712        | 0,1669        | <b>0,0102</b> | 0,2025  | 0,0623        | 0,0689           | <b>0,0021</b>      |
| NSER               | r | 0,4336        | 0,3523        | 0,0190        |               | 0,2649        | -0,2453       | -0,4650       | 0,2575  | -0,5891       | -0,2841          | 0,1566             |
|                    | p | <b>0,0188</b> | 0,0609        | 0,9222        |               | 0,1649        | 0,1996        | <b>0,0110</b> | 0,1774  | <b>0,0008</b> | 0,1353           | 0,4172             |
| Año cosecha        | r | 0,6127        | 0,7104        | 0,2612        | 0,2649        |               | -0,9816       | -0,4548       | 0,0876  | -0,2187       | -0,8686          | -0,1697            |
|                    | p | <b>0,0004</b> | <b>0,0000</b> | 0,1712        | 0,1649        |               | <b>0,0000</b> | <b>0,0132</b> | 0,6515  | 0,2544        | <b>0,0000</b>    | 0,3788             |
| Meses              | r | -0,6016       | -0,7308       | -0,2637       | -0,2453       | -0,9816       |               | 0,4136        | -0,1317 | 0,2260        | 0,8970           | 0,1027             |
|                    | p | <b>0,0006</b> | <b>0,0000</b> | 0,1669        | 0,1996        | <b>0,0000</b> |               | <b>0,0257</b> | 0,4958  | 0,2385        | <b>0,0000</b>    | 0,5959             |
| Grado % vol        | r | -0,8457       | -0,5873       | -0,4692       | -0,4650       | -0,4548       | 0,4136        |               | 0,1028  | 0,5814        | 0,5676           | 0,2777             |
|                    | p | <b>0,0000</b> | <b>0,0008</b> | <b>0,0102</b> | <b>0,0110</b> | <b>0,0132</b> | <b>0,0257</b> |               | 0,5955  | <b>0,0009</b> | <b>0,0013</b>    | 0,1447             |
| AT g/l             | r | -0,0595       | -0,0570       | -0,2438       | 0,2575        | 0,0876        | -0,1317       | 0,1028        |         | 0,0782        | -0,0343          | 0,0415             |
|                    | p | 0,7593        | 0,7691        | 0,2025        | 0,1774        | 0,6515        | 0,4958        | 0,5955        |         | 0,6867        | 0,8598           | 0,8309             |
| pH                 | r | -0,4637       | -0,2466       | -0,3505       | -0,5891       | -0,2187       | 0,2260        | 0,5814        | 0,0782  |               | 0,2842           | 0,0958             |
|                    | p | <b>0,0113</b> | 0,1972        | 0,0623        | <b>0,0008</b> | 0,2544        | 0,2385        | <b>0,0009</b> | 0,6867  |               | 0,1351           | 0,6210             |
| Color (A420 nm)    | r | -0,7784       | -0,8316       | -0,3426       | -0,2841       | -0,8686       | 0,8970        | 0,5676        | -0,0343 | 0,2842        |                  | 0,1720             |
|                    | p | <b>0,0000</b> | <b>0,0000</b> | 0,0689        | 0,1353        | <b>0,0000</b> | <b>0,0000</b> | <b>0,0013</b> | 0,8598  | 0,1351        |                  | 0,3723             |
| Acidez volátil g/l | r | -0,1601       | 0,0404        | -0,5473       | 0,1566        | -0,1697       | 0,1027        | 0,2777        | 0,0415  | 0,0958        | 0,1720           |                    |
|                    | p | 0,4067        | 0,8353        | <b>0,0021</b> | 0,4172        | 0,3788        | 0,5959        | 0,1447        | 0,8309  | 0,6210        | 0,3723           |                    |

Para observar con mayor claridad la relación entre los parámetros generales y los índoles, así como para visualizar cómo se tipifican los vinos, en la Figura 4.17 se muestran los pesos de los parámetros (meses de crianza, pH, grado alcohólico, acidez volátil, absorbancia a 420 nm, TRP, MTL, NSER y TEE) y en la Figura 4.18 la distribución de las muestras, mediante el análisis de componentes principales (PCA). Se corroboran las observaciones realizadas en la Tabla 4.8. Aparentemente el contenido de MTL no se relaciona con ninguna de las variables estudiadas, diferentes añadas, color y diferentes cupages (Figura 4.17 PCA). Sí que se ha podido observar una correlación negativa entre este indol y el ácido acético (acidez volátil) en las muestras de bodega (Figura 4.17 PCA).

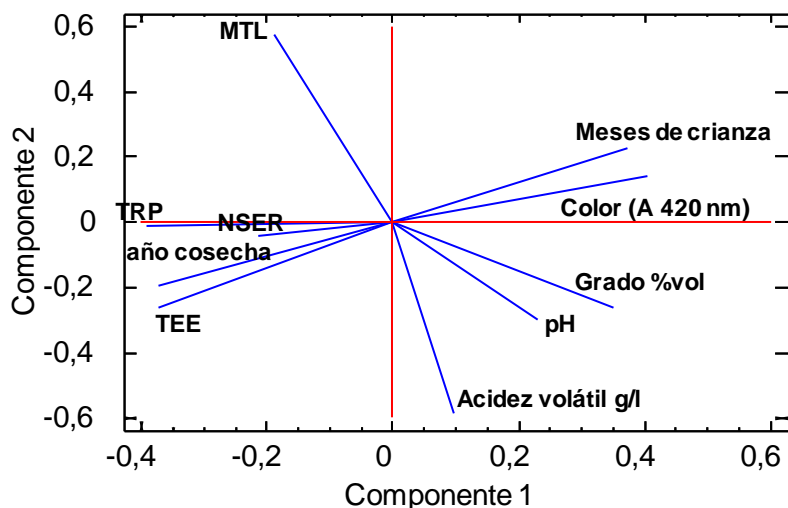


Figura 4.17: Análisis de componentes principales (PCA). Peso de los factores.

En la Figura 4.18 se observa claramente que las muestras se distribuyen fundamentalmente por el tiempo de crianza y, como ya se ha mencionado anteriormente (Figura 4.17), esto viene condicionado por la disminución a lo largo del envejecimiento de los contenidos de TEE y TRP. Los vinos que aún no son legalmente cava (de 0 a 6 meses, vinos base y espumosos de la etapa post-fermentativa) se diferencian por el componente 1, que es el definido por los mayores contenidos de TRP y TEE. Cuando se realiza el análisis discriminante de cavas de bodega y comerciales (n=81) considerando como factores los meses de crianza, el MTL, la NSER, el Trp y el TEE también se discriminan ( $p < 0.0001$ ) las diferentes categorías comerciales de cava: Cava, Reserva y Gran reserva (Figura 4.19).

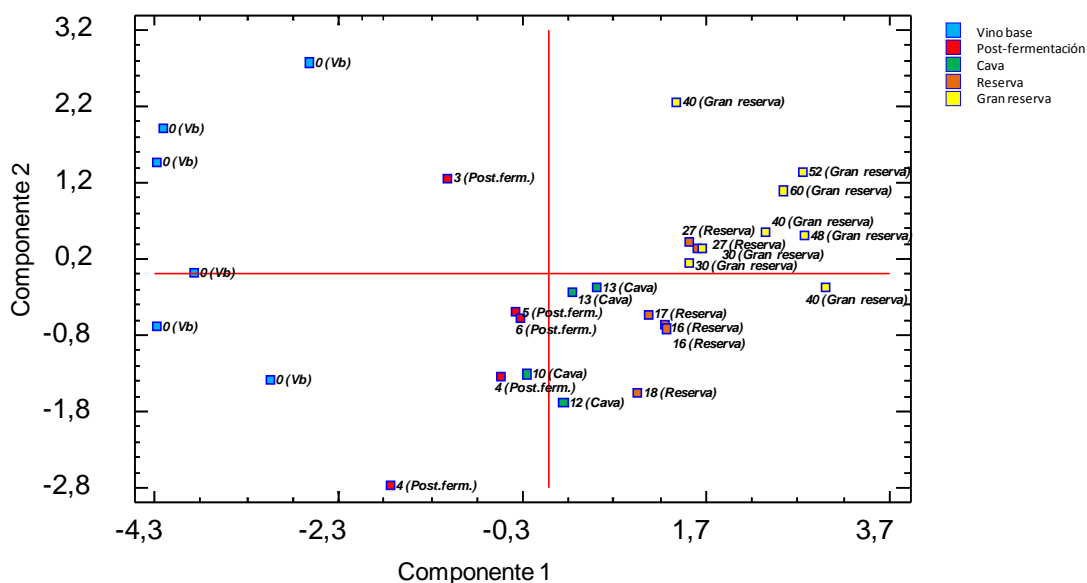


Figura 4.18. Gráfico de dispersión PCA.

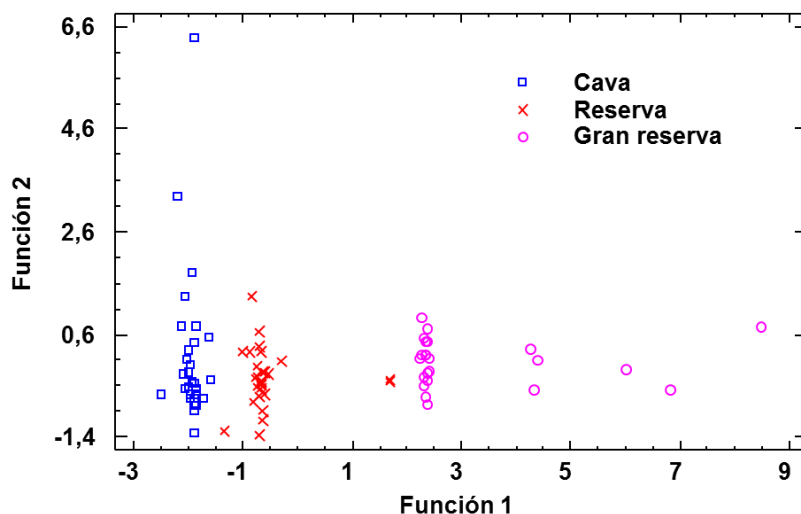


Figura 4.19: Gráfico de análisis discriminante (n=81) de cavas de bodega y comerciales considerando como factores los meses de crianza, el MTL, la NSER, el Trp y el TEE.

Para visualizar los perfiles característicos de los vinos en función del tiempo de crianza biológica y de la cepa de levadura empleada en la segunda fermentación, en la Figura 4.20 se presentan los perfiles de las 29 muestras analizadas provenientes directamente de 3 bodegas. Este tipo de ilustración se realiza mediante un análisis estadístico multivariado que pone de manifiesto similitudes y diferencias de perfil. Se puede observar que las muestras se asemejan más por el tipo de vino (vino base, espumoso de la etapa post-fermentativa, Cava, Reserva y Gran reserva) que por la bodega, lo que puede implicar una importancia menor de la cepa de levadura que del tiempo de crianza en contacto con las lías de las mismas.

La comparación en vertical de los perfiles (Figura 4.20) se diferencia con mayor claridad que la comparación en horizontal (por bodegas). Así los vinos base se caracterizan por la NSER, con excepción de una muestra de Castellblanch, bodega que compra sus vinos base a cooperativas, y que tiene un elevado MTL. Los espumosos de la etapa post-fermentativa presentan el grado alcohólico superior como característica diferenciada. Respecto a los cavas, a partir de 9 meses, los contenidos de TEE y Trp son claramente bajos y especialmente en los cavas Gran reserva presentan niveles residuales.

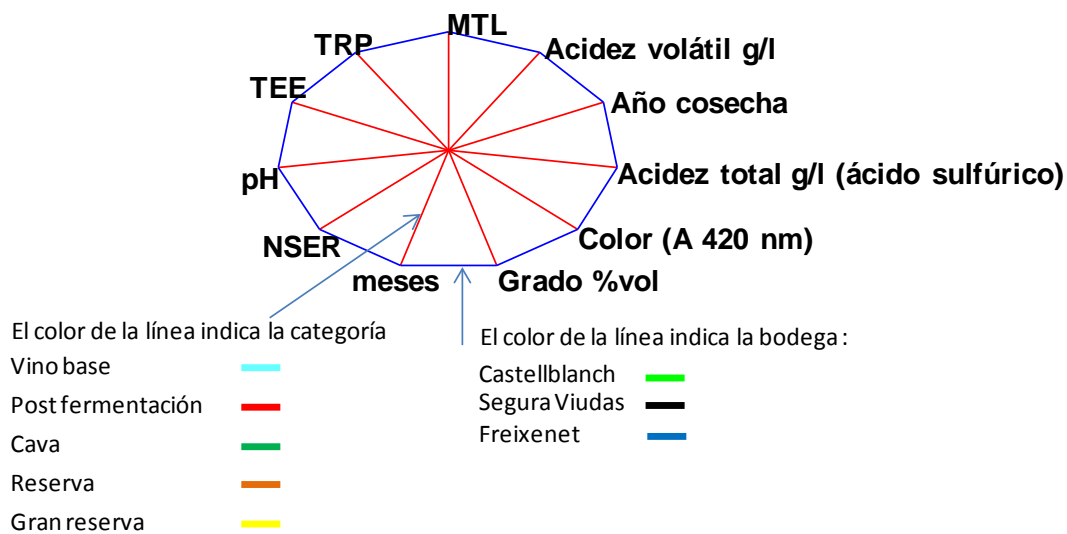
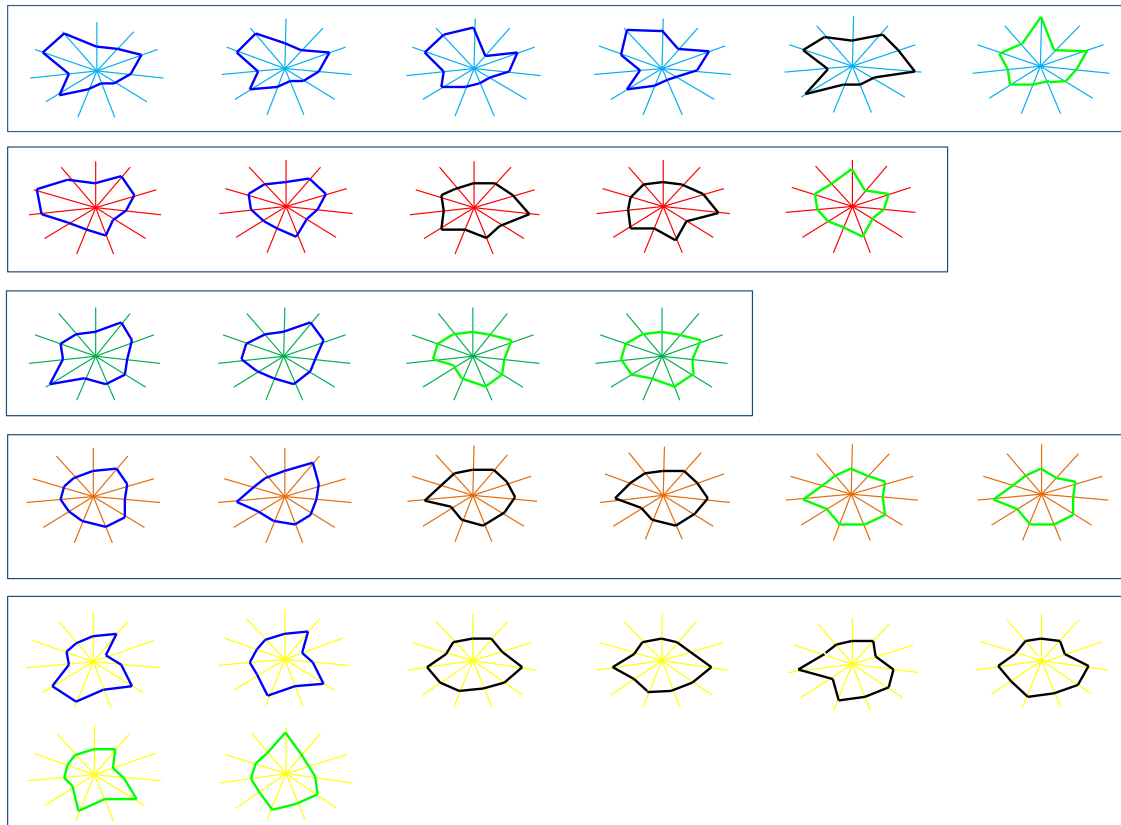


Figura 4.20: Perfiles de las 29 muestras analizadas.

Todos estos resultados abren una nueva visión del tema. Anteriormente existía la hipótesis (Tan *et al.*, 2012) de que la producción de isómeros podía estar inducida por factores de estrés ambientales como el aumento de la concentración de alcohol durante el proceso de fermentación. Para aumentar la tolerancia a los niveles elevados de alcohol en el medio ambiente, una de las respuestas biológicas de la levadura podría ser aumentar la generación de miembros de la familia de la melatonina,

especialmente de isómeros. Actualmente se ha visto que el isómero encontrado en mayor contenido era un derivado del triptófano, el TEE que no se forma en la ruta de síntesis de la melatonina. Todos los estudios enológicos se han focalizado sobre la excreción de metabolitos de la levadura al medio (vino) y ninguno en el análisis de la levadura en sí. En un estudio realizado en sinaptosomas aislados del cerebro de rata se probaron las propiedades antioxidantes in vitro de varias indolaminas de la vía metabólica del triptófano, contra el daño oxidativo a lípidos y proteínas, dado que las membranas biológicas están compuestas de lípidos y proteínas. Pinolina fue el más poderoso antioxidante evaluado, con la melatonina, N-acetilserotonina, 5-hidroxitriptófano, 5-metoxitriptamina, 5-metoxitriptofol y triptolina que también actuaron como antioxidantes (Millán-Plano *et al.*, 2010). Como hipótesis es posible que *Saccharomyces* para protegerse del daño oxidativo producido por el alcohol y proteger las membranas, o inducido por otros factores, utilice la ruta de síntesis de la melatonina y produzca algún metoxindol que acaba finalmente excretado en el medio, en este caso el cava, como la N-acetilserotonina o el 5-metoxitriptofol; otros metoxiindoles de la misma ruta puede que sean utilizados y degradados en otros compuestos dentro de la misma levadura. Se necesitarían estudios del contenido de índoles en *Saccharomyces* para poder saber si en condiciones enológicas se produce melatonina aunque no se excrete al medio.

#### 4.3.4 Referencias bibliográficas

Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2015. Functions of melatonin in plants: a review. *Journal of Pineal Research* 59, 133-150.

Balzer, I., Hardeland R., 1991. Stimulation of bioluminescence by 5-methoxylated indoleamines in the dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 98, 395-397.

Blanc, A., Vivien-Roels, B., Pévet, P., Attia, J., Buisson, B., 2003. Melatonin and 5-methoxytryptophol (5-ML) in nervous and/or neurosensory structures of a gastropod mollusc (*Helix aspersa maxima*): synthesis and diurnal rhythms. *General and Comparative Endocrinology* 131, 168-75.

Boccalandro, H.E., Gonzáles, C.V., Wunderlin, D.A., Silva, M.F., 2011. Melatonin levels, determined by LC-ESI-MS/MS, deeply fluctuate during the day in *Vitis vinifera* cv Malbec. Evidences for its antioxidant role in fruits. *Journal of Pineal Research* 51, 226-32.

Bozdogan, A., Canbas, A., 2012. The effect of yeast strain, immobilisation, and ageing time on the amount of free amino acids and amino acids in peptides of sparkling wines obtained from cv. Dimrit grapes. *South African Journal of Enology and Viticulture* 33, 257-263.

Bubenik, G.A., 2002. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Digestive Diseases and Sciences* 47, 2336-2348.

Carrillo-Vico, A., Calvo, J.R., Abreu, P., Lardone, P.J., García-Mauriño, S., Reiter, R.J., Guerrero, J.M., 2004. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *The FASEB Journal* 18, 537-539.

Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarlo-Sonta, K., Markowska, M., Maestroni, J.M., 2000. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *Journal of Pineal Research* 28, 193-202.

Fernández-Mar, M.I., Mateos, R., García-Parrilla, M.C., Puertas, B., Cantos-Villar, E., 2012. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry* 141, 797-813.

Fuhrberg, B., Hardeland, R., Poeggeler, B., Behrmann, G., 1997. Dramatic rises of melatonin and 5-methoxytryptamine in *Gonyaulax* exposed to decreased temperature. *Biological Rhythm Research* 28, 144-150.

Ganguly, S., Mummaneni, P., Steinbach, P.J., Klein, D.C., Coon, S.L., 2001. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the melatonin rhythm enzyme arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *Journal of Biological Chemistry* 276, 47239-47247.

Garbarino-Pico, E., Carpentieri, A.R., Contin, M.A., Sarmiento, M.I., Brocco, M.A., Panzetta, P., Rosenstein, R.E., Caputto, B.L., Guido, M.E., 2004. Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 51172-51181.

Gardana, C., Iriti, M., Stuknyte, M., De Noni, I., Simonetti, P., 2014. 'Melatonin isomer' in wine is not an isomer of the melatonin but tryptophan-ethylester, *Journal of Pineal Research* 57, 435-441.

Glaser, S., Han, Y., Francis, H., Alpini, G., 2014. Melatonin regulation of biliary functions. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition* 3, 35-43.

Gomez, F.J., Raba, J., Cerutti, S., Silva, M.F., 2012. Monitoring melatonin and its isomer in *Vitis vinifera* cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle. *Journal of Pineal Research* 52, 349-355.

Gomez, F.J., Hernandez, I.G., Martinez, L.D., Silva, M.F., Cerutti, S., 2013. Analytical tools for elucidating the biological role of melatonin in plants by LC-MS/MS. *Electrophoresis* 34, 1749-1756.

Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.X., 1993. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 17, 347-357.

Hardeland, R., Fuhrberg, B., 1996. Ubiquitous melatonin-Presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends in Comparative Biochemistry & Physiology* 2, 25-45.

Hardeland, R., Poeggeler, B., 2003. Non-vertebrate melatonin. *Journal of Pineal Research* 34, 233-241.

Hardeland, R., 2010. Melatonin Metabolism in the Central Nervous System. *Current Neuropharmacology* 8, 168-181.

Herraiz, T., Ough, C.S., 1992. Identification and determination of amino acid ethyl esters in wines by capillary gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 1015-102.

Herraiz, T., Ough, C.S., 1993. Formation of ethyl esters of amino acids by yeasts during the alcoholic fermentation of grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture* 44, 41-48.

Heresztyn, T., 1984. Methyl and ethyl amino acid esters in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32, 916-918.

Hoenicke, K., Simat, T.J., Steinhart, H., Köhler, H.J., Schwab, A., 2001. Determination of Free and Conjugated Indole-3-Acetic Acid, Tryptophan, and Tryptophan Metabolites in Grape Must and Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5494-5501.

Iriti, M., Rossoni, M., Faoro, F., 2006. Melatonin content in grape: myth or panacea?. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 1432-1438.

Iriti, M., Vigentini, I., 2015. Tryptophan-ethylester, the false (unveiled) melatonin isomer in red wine. *International Journal of Tryptophan Research* 8, 27-29.

Kocadağlı, T., Yılmaz, C., Gökmen, V., 2014. Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 153, 151-156.

Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., 1958. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society* 80, 2587-2587.



Maldonado, M.D., Mora-Santos, M., Naji, L., Carrascosa-Salmoral, M.P., Naranjo, M.C., Calvo, J.R., 2010. Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacological Research* 62, 282-287.

Manfroi, L., Silva, P.H., A. Rizzon, L.A., Sabaini, P.S., Glória, M.B.A., 2009. Influence of alcoholic and malolactic starter cultures on bioactive amines in Merlot wines. *Food Chemistry* 116, 208-213.

Martínez-Rodríguez, A.J., Carrascosa, A.V., Martín-Alvarez, P.J., Moreno-Arribas, V., Polo, M.C., 2002. Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29, 314-22.

Mattivia, F., Vrhovsek, U., Versini, G., 1999. Determination of indole-3-acetic acid, tryptophan and other indoles in must and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 855, 227-235.

Mauriz, J.L., Collado, P.S., Veneroso, C., Reiter, R.J., González-Gallego, J., 2013. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *Journal of Pineal Research* 54, 1-14.

Mercolini, L., Addolorata Saracino, M., Bugamelli, F., Ferranti, A., Malaguti, M., Hrelia, S., Raggi, M.A., 2008. HPLC-F analysis of melatonin and resveratrol isomers in wine using an SPE procedure. *Journal of Separation Science* 31, 1007-1014.

Mercolini, L., Mandrioli, R., Raggi, M. A., 2012. Content of melatonin and other antioxidants in grape related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. *Journal of Pineal Research* 55, 21-28.

Millán-Plano, S., Piedrafita, E., Miana-Mena, F.J., Fuentes-Broto, L., Martínez-Ballarín, E., López-Pingarrón, L., Sáenz, M.A., García, J.J., 2010. Melatonin and structurally-related compounds protect synaptosomal membranes from free radical damage. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 312-328.

Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Nieto, F.J., Martín-Álvarez, P.J., Polo M.C., 2000. Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chemistry* 70, 309-317.

Murch, S.J., Hall, B.A., Le, C. H., Saxena, P.K., 2010. Changes in the levels of indoleamine phytochemicals during véraison and ripening of wine grapes. *Journal of Pineal Research* 49, 95-100.

Pöggeler, B., Balzer, I., Hardeland, R., Lerchl, A., 1991. Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften* 78, 268-269.

Reiter, R.J., Rosales-Corral, S., Coto-Montes, A., Boga, J.A., Tan, D.X., Davis, J.M., Konturek, P.C., Konturek, S.J., Brzozowski, T. J., 2011. The photoperiod, circadian regulation and chronodisruption: the requisite interplay between the suprachiasmatic nuclei and the pineal and gut melatonin. *Journal of Physiology and Pharmacology* 62, 269-274.

Renzi, A., DeMorrow, S., Onori, P., Carpino, G., Mancinelli, R., Meng, F., Venter, J., White, M., Franchitto, A., Francis, H., Han, Y., Ueno, Y., Dusio, G., Jensen, K.J., Greene, J.J., Jr., Glaser, S., Gaudio, E., Alpini, G., 2013. Modulation of the biliary expression of arylalkylamine N-acetyltransferase alters the autocrine proliferative responses of cholangiocytes in rats. *Hepatology* 57, 1130-1141.

Rodriguez-Naranjo, M.I., Gil-Izquierdo, A., Troncoso, A.M., Cantos, E., Garcia-Parrilla, M.C., 2011a. Melatonin: A new bioactive compound in wine. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 603-608.

Rodriguez-Naranjo, M.I., Gil-Izquierdo, A., Troncoso, A.M., Cantos-Villar, E., Garcia-Parrilla, M.C., 2011b. Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. *Food Chemistry* 126, 1608-1613.

Serra-Cayuela, A., Jourdes, M., Riu-Aumatell, M., Buxaderas, S., Teissedre, P.L., López-Tamames, E., 2014. Kinetics of browning, phenolics, and 5-hydroxymethylfurfural in commercial sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 1159-1166.

Spadoni, G., Diamantini, G., Bedini, A., Tarzia, G., Vacondio, F., Silva, C., Rivara, M., Mor, M., Plazzi, P.V., Zusso, M., Franceschini, D., Giusti, P., 2006. Synthesis, antioxidant activity and structure-activity relationships for a new series of 2-(N-acylaminoethyl) indoles with melatonin-like cytoprotective activity. *Journal of Pineal Research* 40, 259-269.

Sprenger, J., Hardeland, R., Fuhrberg, B., Han, S.-Z., 1999. Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia* 64, 209-213.

Stege, P.W., Sombra, L.L., Messina, G., Martinez, L.D., Silva, M.D., 2010. Determination of melatonin in wine and plant extracts by capillary electrochromatography with immobilized carboxylic multi-walled carbon nanotubes as stationary phase. *Electrophoresis* 31, 2242-2248.

Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Rosales-Corral, S., Coto-Montes, A., Boga, J.A., Reiter, R.J., 2012. Emergence of naturally occurring melatonin isomers and their proposed nomenclature. *Journal of Pineal Research* 53, 113-121.

Tan, D.X., Manchester, L.C., Liu, X., Rosales-Corral, S.A., Acuna-Castroviejo, D., Reiter, R.J., 2013. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: A hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *Journal of Pineal Research* 54, 127-138.

Tan, D.X., Zheng, X., Kong, J., Manchester, L.C., Hardeland, R., Kim, S.J., Xu, X., Reiter, R.J., 2014. Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 15858-15890.

Tosini, G., 2000. Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals. *Chronobiology International* 17, 599-612.

Vigentini, I., Gardana, C., Fracassetti, D., Gabrielli, M., Foschino, R., Simonetti, P., Tirelli, A., Iriti, M., 2015. Yeast contribution to melatonin, melatonin isomers and tryptophan-Functions of melatonin in plants ethylester during alcoholic fermentation of grape musts. *Journal of Pineal Research* 58, 388–396.

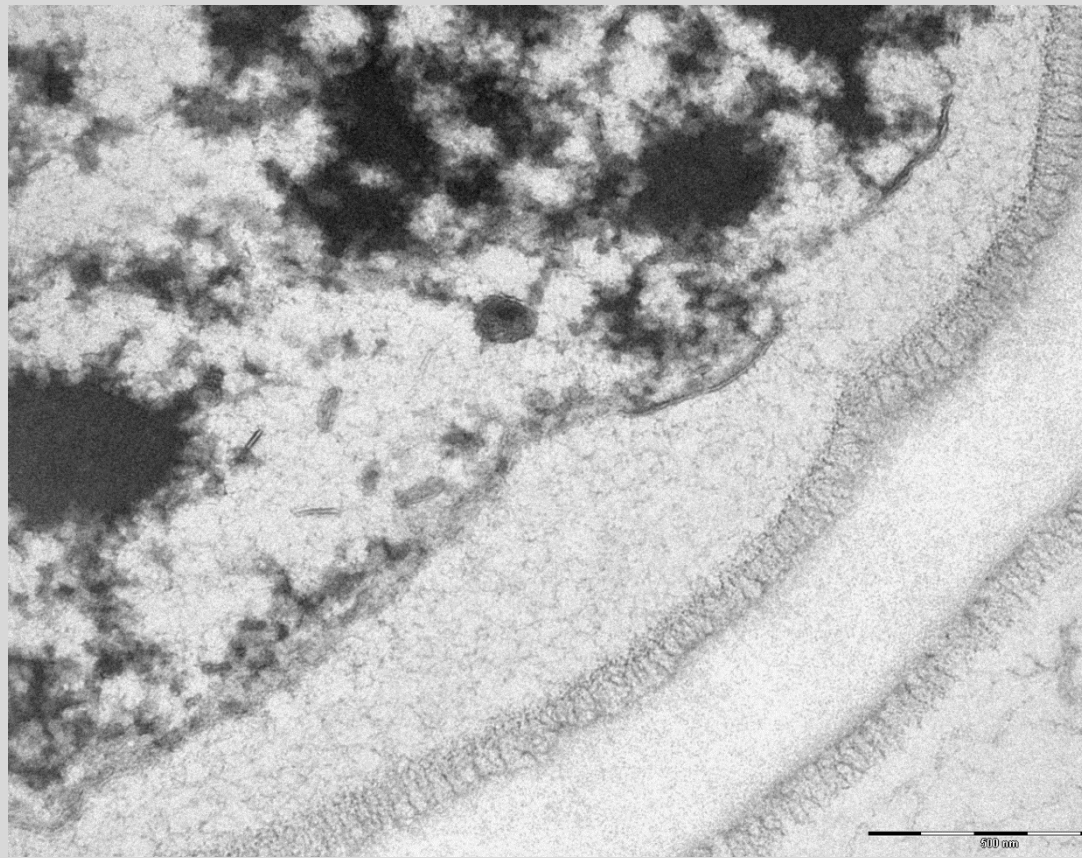
Vitalini, S., Gardana, C., Zanzotto, A., Simonetti, P., Faoro, F., Fico, G., Iriti, M., 2011a. The presence of melatonin in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry tissues. *Journal of Pineal Research* 51, 331-337.

Vitalini, S., Gardana, C., Zanzotto, A., Fico, G., Faoro, F., Simonetti, P., Iriti, M., 2011b. From vineyard to glass: agrochemicals enhance the melatonin and total polyphenol contents and antiradical activity of red wines. *Journal of Pineal Research* 51 278-285.

Vitalini, S., Gardana, C., Simonetti, P., Fico, G., Iriti, M., 2013. Melatonin, melatonin isomers and stilbenes in Italian traditional grape products and their antiradical capacity. *Journal of Pineal Research* 54, 322-333.

Zhang, H.M., Zhang, Y.J., 2014. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Journal of Pineal Research* 57, 131-146.

# Capítulo 5



## 5. Comentarios a los resultados



## 5. Comentarios a los resultados

---

La calidad de los vinos espumosos elaborados por el método tradicional, es decir, realizando la segunda fermentación en botella cerrada, es dependiente entre otros factores, del proceso autolítico de las células de levadura. Las categorías comerciales de calidad, Cava joven, Reserva y Gran reserva, se han decidido tras análisis organolépticos realizados por expertos, pero sin tener en cuenta datos objetivos. El proceso autolítico que se desarrolla gradualmente es una capacidad de la levadura condicionada por su herencia genética, y puede ser diferente entre las distintas cepas que se utilizan en la segunda fermentación. Por otra parte, una vez que el vino se envasa y se añade el licor de tiraje, el proceso biológico que se desarrolla es de difícil control. Durante la rima, si se detecta alguna desviación o defecto, las botellas de cava no ofrecen la posibilidad de manipulación, pues según el reglamento de la D.O., son estas mismas botellas con las que debe comercializarse el vino espumoso. Por esta razón, es importante para las bodegas, disponer de datos objetivos que demuestren que el cava en rima ya ha podido alcanzar las características propias de la categoría comercial, que la bodega espera concederle.

Los resultados de este trabajo permiten al sector contar con herramientas y nuevos datos objetivos para conocer el estado autolítico de las lías en función del periodo de crianza biológica que ha transcurrido, a partir de: i) el examen de las lías por microscopía electrónica de transmisión (TEM), ii) de datos de las propiedades superficiales por microscopía de fuerza atómica (AFM), iii) a partir del análisis químico de ciertos compuestos cedidos por las lías como los nucleósidos o los indoles.

Los cambios estructurales y morfológicos de las células muertas de la levadura se han determinado en tres series de cava a lo largo de la crianza biológica (hasta 48 meses). Los únicos resultados que se consideran relevantes son los que se han repetido en las tres series de cava, puesto que puede suponerse que responden a un comportamiento estándar de la célula. Las observaciones más destacables son:

La pared celular sólo se degrada parcialmente y con el tiempo su estructura estratificada se modifica. El orden de los cambios que se observan en la pared son: se separa la membrana plasmática de la capa interna de la pared celular debido a la plasmólisis, aumenta la zona periplásmica situada entre la membrana y la pared. La zona media amorfa del interior de la pared se va degradando a partir de los 18 meses de envejecimiento y el material microfibrroso aparece más difuso. A partir de los 30 meses en adelante, la pared de la célula se presenta como una estructura enmarañada de fibras, aunque se mantiene sin roturas a lo largo de los 48 meses de crianza. Según los autores consultados, de la pared celular se ceden ciertos componentes más solubles en medio acuoso como los

proteomananos, lo cual se corresponde con la pérdida observada por TEM de las microfibrillas (zona más electrodensa).

El contenido citoplasmático disminuye con el tiempo de crianza. En un principio se observa una desorganización y, posteriormente, un vaciado progresivo del citoplasma.

A los 9 meses ya se visualiza la rotura de la membrana plasmática lo que justificaría el vaciado de componentes posterior. Con la técnica TEM se ha podido detectar los ribosomas en el espacio periplásmico, lo que facilita el paso de los nucleósidos al vino.

Además, por primera vez en condiciones enológicas se ha descrito la evidencia morfológica de microfagia en *S. cerevisiae*. Durante la fase estacionaria la levadura no sólo utiliza la macroautofagia para prolongar su supervivencia, sino también la microfagia, lo cual hasta el momento sólo era un supuesto en la fermentación del vino.

Los ensayos realizados con la microscopía de fuerza atómica (AFM), después de seleccionar *tapping* como modo de trabajo en aire y una fuerza vertical máxima de 5nN, permiten cuantificar la elasticidad de la superficie de las células como una característica prometedora para medir los cambios producidos en las levaduras, que repercuten en la pared celular. El promedio obtenido del módulo de Young, parámetro que cuantifica la elasticidad del material, es  $75.6 \pm 42.6$  MPa (>3.500 mediciones) para las lías de 9 meses y  $65.3 \pm 23.1$  MPa para las levaduras de 48 meses (>4.000 medidas). Estos valores indicarían que la pared celular de las células de 9 meses es más rígida que las de las levaduras de 48 meses, ya que los materiales con un módulo de elasticidad más alto son más rígidos y no se deforman tan fácilmente, en comparación con materiales con un módulo de elasticidad menor. Mediante AFM también se han observado algunas lías que parecen estar unidas entre sí, lo que podría apuntar que las células hubieran quedado unidas como una respuesta fisiológica que permitiera la búsqueda de nutrientes o también como respuesta a un medio ambiente estresante. Estas uniones se conservan a lo largo del envejecimiento (9 meses) y, según nuestro conocimiento es la primera vez que se visualizan por AFM. Antes de calificar a este parámetro como adecuado para valorar el grado autolítico de las células sería conveniente aplicarlo a un mayor número de muestras, dado que no existen antecedentes de aplicación de AFM a células muertas de *Saccharomyces cerevisiae*. Es de suponer que la disminución de elasticidad se debe a la pérdida de material de la pared celular. Según resultados de la aplicación de AFM a células vivas, se podría interpretar que la pérdida de elasticidad, por lo menos en parte, se podría deber a la rotura de los enlaces cruzados de los  $\beta$ -glucanos o a la cesión de quitina.

La determinación de los catabolitos del ARN en los vinos espumosos (uridina, guanosina, adeosina, inosina, xantina, hipoxantina y ácido úrico), mediante la técnica UPLC-MS/MS, se justifica por la liberación de los ribosomas a la zona periplásmica los cuales se dejan de visualizar con el tiempo. En este caso se ha tenido en cuenta que el indicador químico ideal del estado autolítico de las levaduras sería un compuesto que procediera directamente de la degradación celular. Por esta razón, no sólo se han determinado los catabolitos en tres series de cavas mientras las lías estaban en contacto con el vino, sino que además, a los 9 meses, se degollaron dos series de cavas y se almacenaron en paralelo con las de sus correspondientes rimas. Estas muestras también envejecen, pero no en contacto con las lías (apartado 3.2.1) y permiten la comparación de la evolución de los catabolitos del ARN con y sin la presencia de células muertas en contacto con el vino.

De los tres nucleósidos determinados, sólo la uridina se detecta y cuantifica con fiabilidad en todas las muestras. Este catabolito aumenta de forma lineal con el tiempo de crianza en las tres series de cava. Además se ha comprobado que su origen son las lías en contacto con el vino, puesto que en las muestras almacenadas sin lías su contenido no aumenta. Los otros nucleósidos, adenosina, guanosina e inosina, no han podido detectarse o bien cuantificarse en todas las muestras.

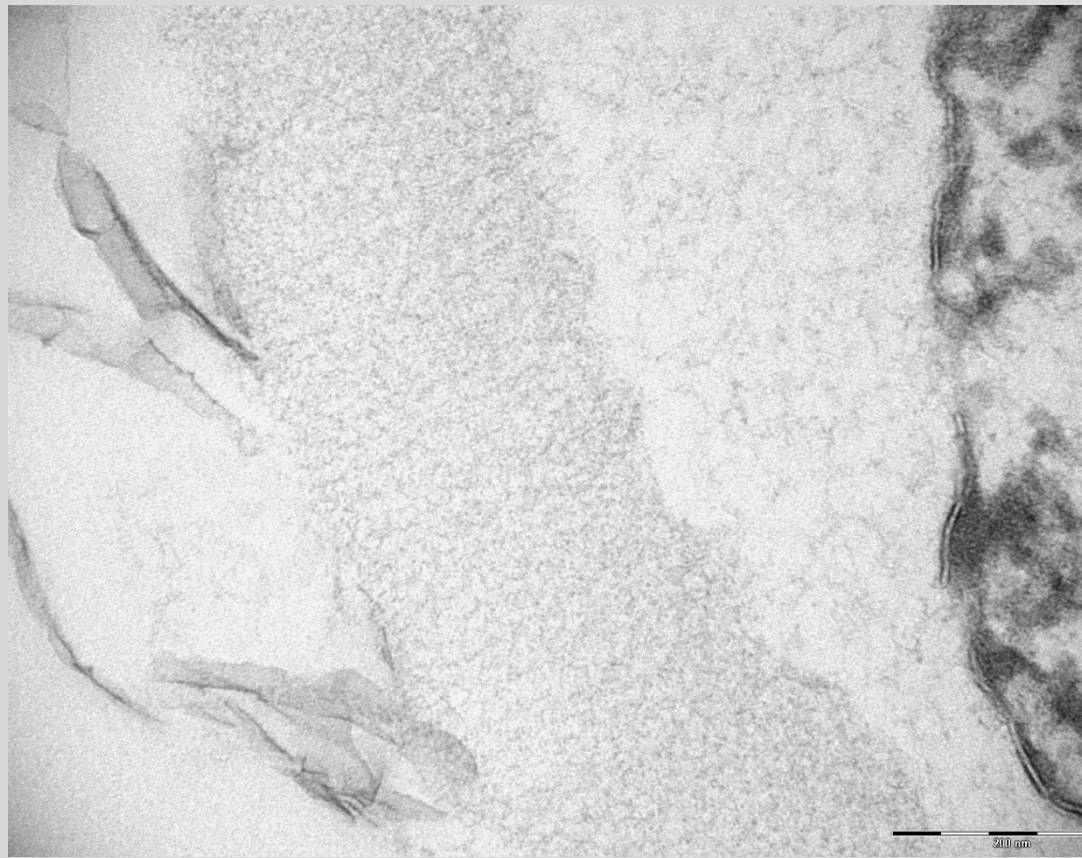
Las purinas parecen tener un origen fermentativo, especialmente la hipoxantina y el ácido úrico, pero su contenido con el tiempo no varía siguiendo un modelo de regresión determinado para las tres series de cava. La xantina es la base púrica más abundante y su contenido se mantiene constante teniendo en cuenta que en cada punto de muestreo se abren botellas diferentes del mismo vino, es decir que las pequeñas variaciones que se observan podrían ser debidas a la variabilidad entre botellas.

La melatonina, sus isómeros y otros indoles relacionados con su metabolismo son compuestos de creciente interés en Enología. Actualmente existe controversia, tanto en la elección del método de análisis, como en su origen. Unos autores creen que puede proceder de la propia baya, mientras que otros defienden su origen fermentativo. Probablemente todos tienen razón y el problema es la labilidad de estos compuestos o que rápidamente se transforman en otros metabolitos. No obstante la razón de su inclusión en este trabajo fue porque los vinos espumosos se elaboran a partir de dos actividades metabólicas de *S. cerevisiae*, dos fermentaciones, lo que permitía presumir un mayor contenido de estos compuestos que en los vinos tranquilos, si se asume un origen en las levaduras. Esta parte del trabajo incluye la puesta a punto de un método analítico, mediante la técnica UPLC-MS/MS, para la determinación simultánea de 9 indoles (apartado 4.3.3.1) y su aplicación a vinos espumosos. Por otra parte, también se diseñó un nuevo muestreo (apartado 3.2.1 y Figura 3.4) que



permitió poner de manifiesto los contenidos de índoles en diversas muestras cava en rima (bodega) y muestras reales de mercado. De los 9 índoles analizados (5-metoxitriptofol (5MTL), triptófano (Trp), etil éster de triptófano (TEE), n-acetilserotonina (NSER), melatonina (MEL), serotonina (SER), 5-hidroxitriptófano (5-OHTRP), ácido 5-hidroindolacético (5OHIA) y ácido 5-metoxindolacético (5MIA)) sólo se han detectado cuatro de ellos en las muestras de cava: triptófano, etil éster del triptófano, metoxitriptofol y N-acetilserotonina (los dos últimos determinados por primera vez en vino). Posiblemente la rima facilite la degradación rápida de la melatonina y/o sus isómeros. En la bibliografía consultada, los datos de melatonina y/o sus isómeros pertenecen a vinos no identificados por su tipo o tiempo de crianza. Por otra parte este trabajo ha permitido confirmar que el principal isómero descrito de la melatonina no es un isómero, sino que se corrobora que se trata del éster etílico del Trp, el TEE, y que éste presenta una correlación negativa con el Trp en vinos espumosos. El contenido de Trp desciende a medida que las muestras tienen más crianza siguiendo una línea de tendencia exponencial ( $\text{Trp} = 276.36 e^{-0.068t}$   $R^2 = 0.8$ ). Para unos límites de decisión del 95%, los cavas Gran reserva está por debajo del límite de decisión inferior (LDI) situado en 55.8  $\mu\text{g/l}$ . El TEE también disminuye con el tiempo y presenta una línea de tendencia exponencial ( $\text{TEE} = 2.6705e^{0.067t}$   $R^2 = 0.8$ ). Para unos límites de decisión del 95% los contenidos de TEE en cavas Gran reserva se sitúan por debajo del límite de decisión inferior (LDI) de 0.6  $\mu\text{g/l}$  de forma estadísticamente significativa. Por lo tanto, se apunta que los índoles triptófano y su éster etílico permitirían tipificar la categorías Gran reserva, cuando se determinen en cantidades inferiores a 55.8  $\mu\text{g/l}$  y 0.6  $\mu\text{g/l}$ , respectivamente. Mediante análisis estadístico multivariado realizado con los índoles TEE, Trp, MTL y NSER, se ponen de manifiesto similitudes y diferencias de perfil. Se puede observar que las muestra se asemejan más por el tipo y categoría de vino (vino base, espumosos de la etapa post-fermentativa, Cava, Reserva y Gran reserva) que por la bodega, lo que puede implicar una menor importancia de la cepa de levadura que del tiempo de crianza en contacto con las lías de las mismas.

# Capítulo 6



## 6. Conclusiones



## 6. Conclusiones

---

El desarrollo de este trabajo ha permitido encontrar indicadores del estado autolítico de las lías de la segunda fermentación de los vinos espumosos con crianza biológica, como el cava. Unos procedentes de la observación del estado estructural de las lías por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM), y otros son posibles indicadores químicos determinados por UHPLC-MS/MS, como algún nucleósido y ciertos índoles.

En definitiva, las conclusiones a las que se ha llegado son las siguientes:

1. Por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se constata que la pared celular se mantiene sin roturas, incluso con 4 años de contacto con el cava, aunque se desorganice su ultraestructura y desaparezcan sus microfibrillas. Con la degradación, también hay una separación progresiva entre la membrana plasmática y la capa interna de la pared y, en consecuencia, un aumento de la zona periplasmática, en función del tiempo de crianza. Durante este estudio se han realizado observaciones inéditas hasta el momento, como la microautofagia, la rotura de la membrana plasmática, y la aparición de ribosomas en la zona periplasmática, lo que demostraría que la mayoría de las células están plasmolizadas a los 9 meses de crianza biológica.
2. La técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) ofrece la elasticidad de la superficie de las lías como parámetro cuantitativo. La menor rigidez de la pared a lo largo de la crianza se constata y es medible, aunque la técnica sea aún demasiado exclusiva para ser usada de forma rutinaria en la monitorización de los cambios ultraestructurales de la célula.
3. La uridina es el único catabolito del ARN que claramente se correlaciona con el tiempo de rima y que se halla en el vino procedente de la autólisis de las levaduras: su contenido aumenta significativamente con la crianza y se ha demostrado que su procedencia es la degradación del ARN celular, puesto que en las muestras almacenadas sin lías su contenido no varía.
4. Se han detectado por primera vez en vinos espumosos los índoles N-acetilserotonina y metoxitriptofol, pero ninguno de los isómeros de melatonina ni la propia melatonina. Se ha observado que los contenidos de N-acetilserotonina, metoxitriptofol, triptófano y su éster etílico disminuyen desde vino base a Cava. Estos dos últimos índoles están relacionados positivamente: cuando la cantidad de triptófano disminuye hasta 56  $\mu\text{g/l}$ , su etil éster también se reduce, en este último caso hasta niveles inferiores a 0.6  $\mu\text{g/l}$ . Estos valores

podrían tipificar los cavas Gran reserva, que para ser acordes con su categoría tendrían que situarse en cantidades por debajo de estos niveles.