
Introducció

Índex de la introducció

1. L'escuma dels vins escumosos. Importància organolèptica	9
1.1. Les bombolles.....	10
1.2. Mesura de la qualitat de l'escuma	19
1.2.1. Factors externs a la qualitat del vi. Efecte de la copa de degustació.....	20
1.2.2. Mesures objectives de la qualitat de l'escuma.....	22
1.2.3. El Mosalux.....	24
1.2.4. Altres sistemes de mesura	29
2. Influència de la composició química del vi sobre l'escuma	31
2.1. Influència dels col·loides (proteïnes, glicoproteïnes i polisacàrids).....	32
2.2. Els lípids	37
2.3. L'etanol.....	39
2.4. Altres (ions, àcids orgànics, sucres, aminoàcids...)	42
3. Influència dels factors vitícoles sobre la qualitat de l'escuma.....	47
3.1. Influència de la varietat vinífera	47
3.2. Influència del grau de maduració	49
3.3. Altres factors vitícoles a tenir en compte	49
4. Influència de la metodologia d'elaboració del vi base sobre la qualitat de l'escuma.....	52
4.1. Obtenció del most.....	52
4.2. Eliminació de fangs	55
4.3. La fermentació alcohòlica	56
4.4. La fermentació malolàctica	57
4.5. Les clarificacions	59
4.5.1. Les gelatines	60
4.5.2. La cola de peix.....	62
4.5.3. La caseïna	63
4.5.4. Les proteïnes vegetals.....	63
4.5.5. Els alginats.....	65
4.5.6. El taní enològic.....	65
4.5.7. La bentonita	66
4.5.8. Els tractaments amb carbó actiu	70
4.5.9. El gel de sílice	71
4.5.10. La polivinil-polipirrolidona (PVPP).....	72
4.5.11. Altres combinacions (bentocaseïna i mescla de bentonita i alginats).....	72

4.6. Estabilització del vi pel fred.....	73
4.7. La filtració del vi.....	74
4.8. Efecte del SO ₂	76

5. Influència de la segona fermentació i de la cria en botella

sobre la qualitat de l'escuma	78
5.1. La presa d'escuma.....	79
5.2. La cria en botella i l'autòlisi de llevats.....	81
5.3. Influència dels adjuvants de tiratge.....	86
5.4. Influència de la soca de llevat	89
5.5. Cas especial de fermentació en botella amb llevats immobilitzats	90

6. Mètodes de determinació, fraccionament i caracterització

dels col·loides del vi	92
6.1. Quantificació de la proteïna total en mostos i vins	94
6.1.1. Nitrogen total pel mètode de Kjeldahl	94
6.1.2. Mètode de Biuret.....	95
6.1.3. Mètode de Lowry	95
6.1.4. Espectres d'absorció UV.....	95
6.1.5. Mètode de Bradford	96
6.1.6. Altres mètodes	97
6.1.7. Resum de quantificació de diferents autors	98
6.2. Mètodes utilitzats per a la separació i caracterització de proteïnes en mostos i vins.....	99
6.2.1. Cromatografia líquida de proteïnes (FPLC)	100
6.2.1.1. Filtració per gel o exclusió molecular	101
6.2.1.2. Bescanvi iònic	101
6.2.1.3. Altres rebliments	102
6.2.2. Electroforesi en gels de poliacrilamida.....	102
6.2.3. Electroforesi capil·lar	105
6.2.3.1. Electroforesi capil·lar de zona o lliure.....	106
6.2.3.2. Altres modalitats d'electroforesi capil·lar	108

1. L'escuma dels vins escumosos; Importància organolèptica

L'aparença de l'escuma, tot i semblar obvi, és una de les característiques organolèptiques més importants dels vins escumosos. El primer que veu el consumidor en abocar un vi escumós dins una copa és l'espectacle generat per l'escuma. Una escuma de qualitat es caracteritza per la finesa de les bombolles, la seva persistència, i la presència d'un cordó de bombolles més o menys llarg (Poinsaut, 1991; Malvy *et al.*, 1994; Liger-Belair, 2001a).

L'escumabilitat i la permanència de l'escuma són dues propietats essencials per a la caracterització d'un vi escumós (Maujean *et al.*, 1990). Per tal de definir millor aquestes propietats cal pensar en el comportament d'aquest tipus de vi quan s'aboca dins una copa de cristall. El primer que s'observa, sota l'efecte de la turbulència, és precisament la fase d'escumabilitat, que es correspon amb l'aparició d'una escuma abundant a la superfície del líquid dins la copa. És de curta durada, ja que des del moment en que es deixa d'abocar el vi, la seva alçada comença a disminuir fins que és possible veure el líquid de la superfície.

Gairebé des del primer moment en que se serveix el vi es pot observar el desprendiment de bombolles. Sol fer-se en forma de cordons o rosaris verticals, des del líquid cap a la superfície. La permanència de l'escuma es defineix com la capacitat per a que aquest desprendiment duri més o menys temps. És una característica molt important ja que és el fenomen que permet fer una descripció detallada de l'aspecte i el comportament de les bombolles. A més, permet establir també el nombre total de cordons, considerat aquest com un dels factors de qualitat del vi escumós (Poinsaut, 1991). El temps d'existència del cordó està lligat tant a la intensitat de l'efervescència com a la composició del vi. La permanència de l'escuma es correspon amb un estat estacionari en el que la velocitat de desaparició de les bombolles a la superfície és igual a la d'incorporació de noves bombolles al cordó.

En un vi escumós, la qualitat del producte està relacionada amb el tamany de les bombolles formades dins la copa. Així, petites bombolles que ascendeixin de forma lenta cap a la superfície són preferibles a unes bombolles massa grans (Liger-Belair *et al.*, 1999). La formació i permanència d'un collar d'escuma a la superfície líquida és considerat també com a un factor de qualitat (Obiols *et al.*, 1998; Liger-Belair *et al.*, 1999; Peron *et al.*, 2000; Liger-Belair *et al.*, 2001b). Tot i que no existeixen estudis al respecte, probablement el tamany de les bombolles influeixi en el desprendiment

d'aromes i en les sensacions en boca durant la degustació (Liger-Belair *et al.*, 1999), tot i que és obvi per simple apreciació organolèptica que en el seu conjunt sí que és així.

1.1. Les bombolles

Les bombolles d'un vi escumós són, per la seva pròpia naturalesa, fràgils i efímeres, en tant que atractives. A part del color o del sabor, l'efervescència és un factor primordial en l'apreciació de la qualitat d'un vi escumós, tan en l'aspecte visual com en l'olfactiu. La finesa de les bombolles, la seva persistència a la superfície del líquid i el pessigolleig que provoquen dins la boca són uns criteris essencials a tenir en compte en la fitxa de degustació d'un vi escumós.

El mateix Leonardo da Vinci, en el segle XVI, es dedicà a l'estudi de la velocitat de les bombolles en ascensió en funció del seu tamany i en diferents matrius líquides. Al llarg del temps la bibliografia existent al respecte ha augmentat considerablement, però només des de fa uns anys hi ha un gran interès en l'estudi sobre la formació i l'estabilitat de les bombolles en begudes carbòniques.

En el sentit estrictament químic, un vi escumós és una solució hidroalcohòlica sobresaturada en diòxid de carboni que conté una gran diversitat de molècules, des de les més senzilles fins les més complexes. En el moment d'abocar-lo, l'escuma és molt abundant i està formada per bombolles d'uns quants milímetres de diàmetre. Passats uns segons aquesta escuma disminueix fins donar lloc a un collaret fi de bombolles a la perifèria de la copa. Per a comprendre millor la importància relativa d'un compost o un altre en la morfologia i el temps de vida del cordó de bombolles, es treballa amb solucions model en les que s'afegeixen les diferents macromolècules procedents del vi (Senée *et al.*, 1999) o altres substàncies que poden trobar-se en aquest.

A continuació es descriuen les distintes etapes de la "vida" d'una bombolla en un vi escumós, a saber: naixement, desadsorció, ascensió dins el líquid i, finalment, explosió a la superfície.

Formació i desadsorció de les bombolles

En el transcurs de la presa d'escuma (segona fermentació alcohòlica), que es dona dins la botella, els llevats consumeixen el sucre que s'ha afegit, alliberant diòxid de carboni. Així, s'estableix un equilibri entre el CO₂ que es troba dissolt en el vi i el que

està en estat gasós atrapat al coll de la botella. Quan la destapem, el CO₂ gasós s'escapa brusquement de manera que l'equilibri termodinàmic es trenca donant lloc a una sobresaturació de CO₂ en el líquid. Aleshores, aquest CO₂ dissolt retorna progressivament per difusió a la fase gasosa a través de la superfície lliure i mitjançant l'emissió de bombolles (Maujean, 1989).

La formació d'una bombolla en el vi s'anomena nucleació. En principi, podria donar-se a qualsevol punt del líquid, cas de la nucleació homogènia, però el grau de sobresaturació del gas no és prou gran com per permetre aquesta aparició espontània. Segons la llei de Laplace, que relaciona la diferència de pressió entre el vi i el gas amb la tensió de superfície i el radi de curvatura de la bombolla ($\Delta P = 2 \cdot \sigma \cdot R^{-1}$), la pressió del CO₂ hauria de ser de l'ordre de 2000 atm, quan dins la botella és només de 5 a 6 atm. Per aquest motiu, el que donarà lloc a l'aparició de bombolles seran les petites cambres d'aire que han quedat atrapades en les impureses microscòpiques presents en dissolució (pols del suro, partícules residuals d'adjuvants de tiratge, microcristalls d'hidrogenotartrat de potasi...) i en les microcavitats del vidre de la copa o la botella que no han quedat completament mullades en el moment d'abocar el vi (Maujean, 1989; Douillard *et al.*, 2000). Es tracta, doncs, d'una nucleació heterogènia.

En la nucleació heterogènia, les molècules de CO₂ dissoltes en el vi entren per difusió en aquestes cambres d'aire de manera que apareix una bombolla, el tamany de la qual va augmentant amb el temps. Només quan la força d'Arquímedes esdevé superior a la força capil·lar que manté fixada la bombolla al punt de nucleació, aquesta podrà desprendre's. De totes maneres, una petita cambra de gas queda sempre atrapada, de forma que permet el naixement d'una nova bombolla seguint el mateix procés que l'anterior, i així de forma successiva. El volum de la bombolla en el moment de desprendre's és proporcional al radi de la microcavitat. Per aplicació de la llei de Laplace es troba que el radi mínim (anomenat radi crític) de la microcavitat per a que es pugui formar una bombolla és de 0.2 μ m. L'emissió de bombolles es dona de forma regular als diferents punts de nucleació donant lloc a l'aparició d'una columna o cordó de bombolles. A les figures 1 i 2 es representen esquemàticament els processos de difusió del CO₂ en la nucleació heterogènia i les forces que actuen sobre una bombolla lligada a una microcavitat.

A causa de la importància de l'efecte de la copa de degustació sobre el desprendiment de bombolles, se'n parlarà amb més detall a l'apartat 1.2.1 de la Introducció.

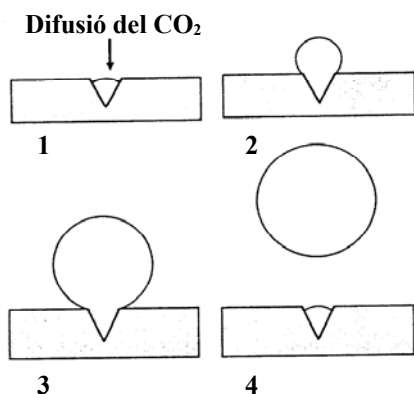


Figura 1 - Representació esquemàtica de la formació d'una bombolla en una microcavitat. (Casey, 1988, 1995)

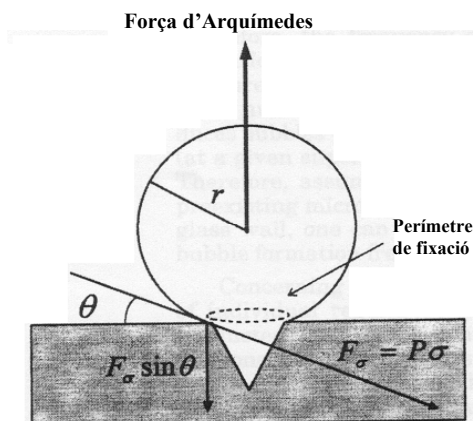


Figura 2 - Representació esquemàtica de les forces que actuen sobre una bombolla lligada a una microcavitat. (Bisperink *et Prins*, 1994)

Amb l'ajut d'un muntatge fotogràfic adequat poden obtenir-se fotografies del desprendiment de les bombolles i determinar-ne, per exemple, la freqüència de formació i desprendiment (Liger-Belair *et al.*, 1999). S'ha observat que aquesta és diferent segons el punt de nucleació considerat (és funció del tamany i forma de les micro-cavitats preexistents en el vidre de la copa) però constant per a un mateix punt, en un període de temps raonable. S'han mesurat freqüències que van des de menys de 1 Hz fins més de 25 Hz. El fet que les mateixes bombolles causin una disminució del contingut de CO₂ a la matriu líquida provoca, a la llarga, una disminució d'aquesta freqüència de desprendiment. Es tradueix també en un augment progressiu de la distància entre les bombolles d'un mateix cordó. A les figures 3 i 4 poden veure's alguns exemples d'aquest desprendiment.

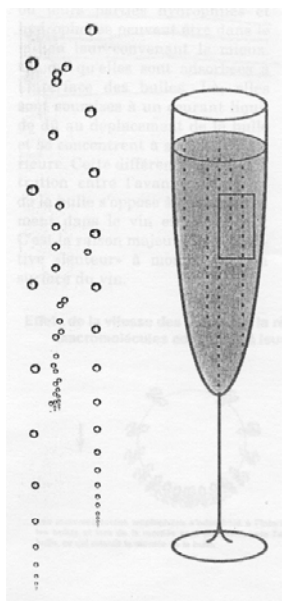


Figura 3 - Fotografia de diferents cordons de bombolles on es veuen distintes freqüències de desprendiment en una mateixa copa.



Figura 4 - Partícula de la superfície del vidre on s'indueix una nucleació heterogènia. (fig.3 & fig.4: Douillard *et al.*, 2000)

Ascensió

Una vegada despreses les bombolles del seu punt de nucleació, el CO₂ disolt continua difonent dins elles fent que el seu tamany segueixi augmentant, com també la seva acceleració en el trajecte cap a la superfície, ja que tots dos paràmetres són proporcionals a la superfície de la bombolla (Douillard *et al.*, 2000). La particularitat que en el cas de les bombolles d'un vi escumós aquestes augmentin el seu radi durant l'ascensió (la variació és linial i diferent en funció de la freqüència de desprendiment) fa que siguin un objecte d'estudi elegant i senzill per a comprendre, de forma qualitativa, la dinàmica de les bombolles en una solució sobresaturada.

Aquest augment de tamany i de l'acceleració fa que les bombolles experimentin una deformació provocada per les forces de viscositat i per la pressió inercial lligada al desplaçament de líquid per la bombolla. Si es té en compte però paràmetres tals com el radi de la bombolla, la viscositat, la velocitat de desplaçament, la tensió de superfície i la densitat, que comparen l'efecte de cohesió de la bombolla causat per la tensió superficial provocada per les dues contribucions anteriors, es veu que són suficientment petits i menyspreables, i pot considerar-se que la simetria de les bombolles d'un vi escumós és pràcticament esfèrica durant l'ascensió.

Entre les diferents forces que actuen a sobre d'una bombolla en ascensió hi trobam, a més de la força d'Arquímedes, la força de drenatge lligada al moviment del fluïd que es troba al voltant de la bombolla, que fa que s'hagi de tenir en compte una nova força suplementària anomenada força de massa afegida lligada a la variació de la quantitat de moviment del líquid desplaçat. Aquesta força, que s'oposa al moviment, no és mai superior a un 2 o 3% de la força d'Arquímedes, i simplificant, pot considerar-se negligible. D'aquesta manera l'equació de moviment queda reduïda a una igualtat entre la força d'Arquímedes (F_A) i la de drenatge (F_D):

$$F_A = \frac{4}{3} \pi R_b^3 \Delta \rho g \quad ; \quad F_D = 6 \pi \eta R_b v \quad \Rightarrow \quad \boxed{v = \frac{2}{9} \eta^{-1} R_b^2 \Delta \rho g}$$

R_b = radi bombolla ; $\Delta \rho$ = diferència de densitats líquid/gas ; g = acceleració de la gravetat

η = viscositat del vi ; v = velocitat de Stockes

Així, és d'esperar que la velocitat de les bombolles sigui una funció quadràtica del seu tamany. Les mesures experimentals de la velocitat d'ascensió de les bombolles mostren que efectivament existeix aquesta relació quadràtica amb el seu radi (Liger-Belair *et al.*, 1999; Liger-Belair *et al.*, 2000). No obstant això, aquesta velocitat

d'ascensió es veu que es inferior a la prevista segons les lleis de l'hidrodinàmica assumint un flux de Stokes.

Per explicar aquest fet es té, per una banda, que al no tractar-se d'una ascensió infinita, el vidre de la paret de la copa pot modificar el flux de líquid al voltant de la bombolla. D'altra banda, les molècules amb propietats tensioactives presents en el líquid, durant la progressió de les bombolles, van adsorbint-se a la seva superfície augmentant-ne la rigidesa, de forma que en modifiquen les condicions hidrodinàmiques amb el resultat d'una disminució de la seva velocitat (Liger-Belair *et al.*, 2001a). Es forma una capa d'adsorció que disminueix de forma considerable la tensió de superfície de la bombolla. Moltes d'aquestes molècules són de naturalesa anfipàtica, és a dir, amb una part hidròfila que se situa a la part líquida de la interfase i una part hidròfoba situada a la part gasosa (és el cas, per exemple, d'algunes proteïnes i de les glicoproteïnes).

Les molècules adsorbides a la superfície poden ser empeses pel flux de líquid cap a la part de baix de la bombolla, de forma que apareix un gradient de tensió superficial, i que contribueix en la disminució de la seva velocitat d'ascensió (veure figura 5). Ybert *et Di Meglio* (1998) han trobat una relació experimental entre la velocitat de les bombolles i la seva concentració superficial en proteïna (usant albúmina de sèrum boví, BSA), en l'estudi de la velocitat d'ascensió de bombolles de radi fix.

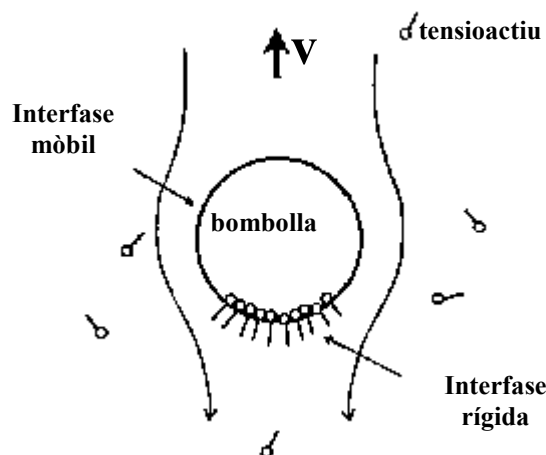


Figura 5 - Representació esquemàtica de l'efecte de les molècules tensioactives en l'ascensió d'una bombolla (Liger-Belair, 2001a)

En l'ascensió, el comportament d'una bombolla d'un tamany determinat, en un vi escumós, se situa entre els dos límits extrems corresponents als casos d'una bombolla saturada en molècules tensioactives (hidrodinàmicament equivalent a una esfera rígida)

i al d'una bombolla sense tensioactius (equivalent a una esfera fluïda) . Hi ha un efecte de dilució dels tensioactius a la superfície lligat a l'augment progressiu del tamany de la bombolla. El resultat net és que l'estat de superfície de la bombolla es manté pràcticament constant durant el trajecte d'ascensió dins la matriu líquida (Liger-Belair G. *et al.*, 2000). En canvi, en l'estudi de l'ascensió de bombolles de tamany fix es veu que a mesura que van adsorbint-se els tensioactius presents en solució, la mobilitat interfacial disminueix progressivament fins anular-se. El trajecte recorregut és més curt com més petita és la bombolla i més elevada sigui la concentració de tensioactius en solució.

Explosió a la superfície

Quan la bombolla arriba a la superfície, a la part de l'aire, la capa líquida que la delimita està formada per dues interfases (aire/vi i vi/CO₂) mentre que a la part del vi només es té la interfase vi/CO₂. La força d'Arquímedes fa que la bombolla floti a la superfície del vi. En aquest punt, el drenatge provocat per la força de gravetat fa que la capa líquida que constitueix la part emergent disminueixi el seu grossor, el que pot arribar a causar el seu trencament. El drenatge depèn sobretot de la viscositat d'aquesta capa líquida (Robillard *et al.*, 1993). Quan el gruix de la capa és suficientment petit, les dues interfases que la limiten al costat de l'aire poden arribar a estar prou pròximes com per a que aparegui una interacció entre elles. A causa de la disposició de les molècules tensioactives, la interacció és normalment repulsiva (repulsió elèctrica entre les parts hidròfiles dels tensioactius de naturalesa anfipàtica, efecte del volum exclòs...) i fa que aparegui el que s'anomena pressió de disjunció (Douillard *et al.*, 2000). Així, aquesta repulsió tendeix a estabilitzar la capa líquida front a la disminució del seu gruix causat pel drenatge fent que, si la pressió és suficientment important, es mantengui una capa de gruix constant.

La disminució del gruix de la capa líquida és dóna en qüestió de dècimes de segon i fa que la concentració de macromolècules en el seu interior augmenti ràpidament podent arribar a concentracions de l'ordre de 20 g/l (1000 vegades superior a la del vi), donant lloc a la formació d'agregats (Peron *et al.*, 2000). El seu efecte sobre les propietats de les bombolles encara no està ben estudiat.

Pel que fa a la forma de les bombolles quan arriben a la superfície, l'existència de la capa líquida que les delimita fa que la llei de Laplace s'hagi d'aplicar dues vegades al costat de l'aire (dues interfases) mentre que al costat del vi només s'aplica una vegada (interfase CO₂/vi). Així, el radi de curvatura de les bombolles a la seva part

superior és el doble que a la part inferior. Si es considera la interfase aire/vi, que té forma convexa, la tensió superficial imposa una transició suau de formes abans que s'ajunti a la superfície plana del vi. Hi ha, doncs, un punt d'inflexió a partir del qual la curvatura de la interfase s'inverteix i esdevé còncava (Douillard *et al.*, 2000).

Com s'ha dit anteriorment, a la part de l'aire, el drenatge del vi de la capa líquida que delimita la bombolla provoca una disminució del seu gruix que pot causar, fins i tot, la seva ruptura. La desaparició de les bombolles també pot ser provocada per l'intercanvi de gasos que es dona entre el vi, la bombolla i l'aire (veure figura 6). Quan el flux de gas és més important cap a l'exterior de la bombolla, el seu tamany disminueix de forma que la pressió a l'interior augmenta. Això provoca una disminució de l'entrada de gas cap al seu interior i augmenta encara més el flux cap a l'atmosfera, pel que la bombolla desaparèixerà per reabsorció (fenomen observable a simple vista).

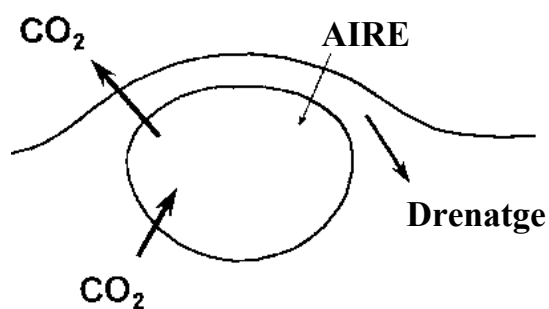


Figura 6 - El tamany i la vida d'una bombolla depenen de la intensitat relativa dels diferents fluxos gasosos i líquids (Douillard *et al.*, 2000)

Pot passar que la disminució del volum de la bombolla i el conseqüent augment de la concentració de tensioactius a la interfase facin que la disminució de la tensió de superfície sigui tan ràpida que la diferència de pressió ($\Delta P = 2 \cdot \sigma \cdot R^{-1}$) disminueixi en lloc d'augmentar (Douillard *et al.*, 2000). Per tant, el flux de gas cap a l'exterior és menor mentre que el del sinus del vi cap al seu interior es veu facilitat i no es dona l'anterior reabsorció. Quantitativament, l'efecte de la variació de l'àrea sobre la tensió de superfície es mesura amb el mòdul de compressibilitat ($\beta = d\sigma/d\ln A$) i els càlculs mostren que les bombolles tendran tendència a estabilitzar-se si $\beta > \sigma/2$. És una situació que no es difícil d'aconseguir i que es dona per a la majoria de les bombolles que arriben a la superfície.

A la superfície, dues bombolles pròximes poden desaparèixer per coalescència (Robillard *et al.*, 1993; Douillard *et al.*, 2000) quan la ruptura de la capa líquida es dona entre elles dues, o per desproporció (envelliment de Ostwald) quan una bombolla més petita es «desinfla» dins una més grossa. En el primer cas, la unió entre les dues

bombolles es fa per la seva part còncava i a causa de la pressió menor en aquesta zona que a la part atmosfèrica, que afavoreix el seu apropament. És precisament aquesta aproximació entre les bombolles el que permet la formació d'un collar de bombolles al voltant del vidre de la copa, on les més properes a la paret s'hi troben fixades a través del seu menisc. L'envelliment d'Ostwald fa referència a la difusió de CO_2 entre dues bombolles quan aquestes estan en contacte. Òbviament, segons la llei de Laplace, la difusió es farà de la bombolla més petita (major pressió del gas) cap a la més gran (menor pressió), que esdevindrà encara major (veure figura 7). És per aquest motiu que es parla de desproporció. Cal tenir en compte que la variació de tamany de les bombolles depèn de les característiques de les interfases, de manera que si el mòdul de compressibilitat és suficientment gran en comparació amb els valors de tensió superficial el fenomen d'envelliment d'Ostwald no es donarà. A vegades s'observen bombolles de varis mil·límetres de diàmetre la formació de les quals seria possible per a valors molt baixos del mòdul de compressibilitat.

Envelliment d'Ostwald (desproporció)

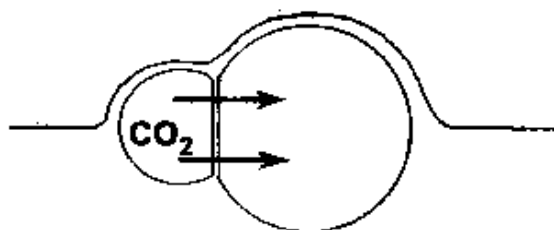


Figura 7 - Difusió de CO_2 de la bombolla menor cap a la de major tamany, segons la llei de Laplace (Douillard *et al.*, 2000)

Quan una bombolla es trenca a la superfície del vi a causa del drenatge, les diferències de curvatura al voltant de la cavitat formada per l'altra meitat de la bombolla genera uns gradients de pressió que es tradueixen en l'aparició de tot un seguit de corrents hidrodinàmics (Liger-Belair *et al.*, 2001b). Quan la cavitat es tanca, un fil d'aigua és projectat a alta velocitat cap amunt i es trenca en petites gotetes que retornen a la simetria esfèrica (veure figura 8). L'esclat de la bombolla principal causa l'emissió d'un tren d'ona circular.

L'explosió ininterrompuda de bombolles a la superfície provoca la suspensió d'un nuvol de gotetes molt fines a l'aire, donant lloc a la formació d'un concentrat de molècules tensioactives que abans es trobaven en la matriu líquida. Com que molts dels compostos aromàtics presents en el vi escumós tenen propietats més o menys tensioactives, és segur que l'esclat de les bombolles a la superfície té un paper molt important pel que fa a la detecció d'aromes en la degustació d'aquests vins.

Si s'observa amb atenció el comportament de les bombolles a la superfície es veu com el seu temps de vida augmenta progressivament i cada vegada hi ha menys esclats. L'explicació es troba en els moviments de convecció en el líquid i en l'ascensió continuada de les bombolles, que provoquen la migració de les molècules amb propietats tensioactives cap a la superfície, on hi queden adsorbides, augmentant-ne la rigidesa (Liger-Belair *et al*, 2001a). Així, tan el drenatge com la disminució de tamany que precedeixen al trencament de la superfície de les bombolles al costat de l'aire es veuen considerablement ralentits. Hi ha una progressiva estabilització de les bombolles que fa que desapareixin molt més a poc a poc.

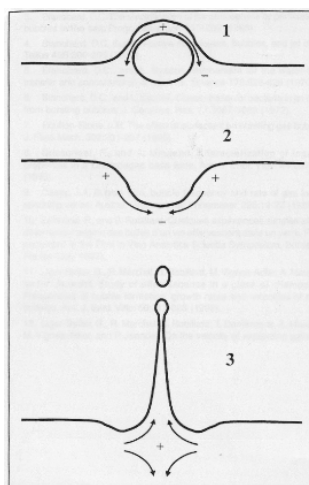


Figura 8 - Comportament esquemàtic d'una bombolla durant el procés d'explosió a la superfície (Liger-Belair *et al.*, 2001b)

Passat un temps després d'haver abocat el vi escumós, la vida de les bombolles és força més gran i poden observar-se els fenòmens provocats pels corrents superficials: les bombolles s'organitzen en formes cargolades d'aspecte semblant al d'una galàxia en espiral.

Una vegada establert l'equilibri dinàmic entre la formació de bombolles en els distints punts de nucleació de la copa i les que esclaten a la superfície, poden veure's els efectes colaterals provocats per una bombolla en el moment d'esclatar en el sinus d'una monocapa de bombolles formada a la superfície líquida del vi (en la que esclaten cents de bombolles per segon). Es veu com les bombolles situades al voltant de la que acaba d'esclatar són fortament atretes cap a la part inferior de la cavitat vacanta deixada per aquesta (Liger-Belair *et al.*, 2001c). Aquest fenomen dona lloc a la formació d'estructures en forma de flor a causa de la deformació de les bombolles veïnes provocada pel moviment de fluïd com a conseqüència dels gradients de pressió formats al voltant de la cavitat (veure figura 9). La superfície d'aquestes bombolles arriba a

augmentar fins al voltant d'un 15 % i la fase de deformació té una duració de l'ordre de 10^{-4} s.

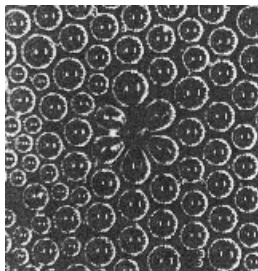


Figura 9 - Vista superior de la avitat deixada per una bombolla que acaba d'esclatar, i deformació de les bombolles contigües (Liger-Belair *et al.*, 2001c)

1.2. Mesura de la qualitat de l'escuma

L'anàlisi de les propietats escumants d'un vi exigeix disposar d'un sistema de mesura que permeti valorar i distingir les distintes expressions escumants del vi. El mètode pot basar-se en la determinació de mesures físiques utilitzant tècniques instrumentals o bé una valoració sensorial mitjançant l'observació atenta del fenomen escumant que transcorre dins la copa. En el primer cas es tracta de mesures objectives i presenta l'avantatge de poder aconseguir la seva repetibilitat una vegada fixades unes condicions analítiques estàndard. L'inconvenient, en canvi, es troba en que en funció del mètode utilitzat els resultats no són extrapolables al fenomen físico-químic que té lloc dins la copa.

D'altra banda, l'anàlisi sensorial avalua l'escuma en el seu entorn natural. Es tracta, però, d'una mesura subjectiva que dependrà, a més dels diferents factors externs al vi com ara les característiques de la copa de degustació i la manera d'abocar-lo (Poinsaut, 1991; Robillard et Duteurtre, 2000), de la persona que en aquell moment està intentant apreciar les anteriors propietats. El degustador ha de ser un exemple de rigor i d'objectivitat si pretén comparar diferents vins. En aquest tipus d'anàlisi s'elaboren uns protocols amb l'objectiu de definir unes condicions que garanteixin al màxim la repetibilitat dels resultats emesos per un o varis avaluadors per a un mateix vi.

Com que elaborar un producte de qualitat i conservar-lo són dues coses diferents, a continuació es parlarà dels factors externs al vi que en poden modificar els criteris qualitatius d'efervescència i d'apreciació de l'escuma, sobretot la importància de la copa de degustació.

1.2.1. Factors externs a la qualitat del vi. Efecte de la copa de degustació

La copa és l'instrument que posa en contacte el vi amb els nostres òrgans sensorials. Ha de permetre que aquests puguin exercir les seves funcions en les millors condicions i per tant ha de sotmetre's tant a les exigències dels ulls, com del nas i de la boca. La forma de la copa, el volum, la seva naturalesa i la forma de servir-se'n afectaran les sensacions que poguem experimentar (Peynaud, 1987).

Els diferents paràmetres externs al vi que poden causar variacions a nivell de les condicions de degustació són molt variats: aptituds i predisposició del degustador, entorn on es realitza la degustació (com ara la presència de partícules de pols a l'atmosfera), condicions de presentació i manera de servir el vi, i finalment les característiques de la copa usada per a la degustació (Darsonville, 2001).

Tot i que s'han fet estudis realment aprofundits sobre la influència de la copa en la degustació de vins, sobretot pel que fa a la percepció d'aromes (Fischer *et* Loewe-Stanienda, 1999), nosaltres ens centrarem de forma gairebé exclusiva en l'efecte de la copa sobre les propietats efervescents en la degustació de vins escumosos.

Anteriorment s'ha vist que la formació de bombolles està lligada a la presència de microcavitats en el vidre (nucleació heterogènia). És per aquest motiu que alguns autors han aconsellat modificar el fons de la copa realitzant-hi un lleuger despoliment (Peynaud, 1987) en forma de circumferència, en el centre, d'uns cinc mil·límetres de diàmetre per tal d'induir aquesta gènesi. De fet, el despoliment pot fer-se de diferents maneres (Darsonville, 2001), però el que és essencial és la presència de microcavitats per tal d'afavorir la formació de bombolles. Aquest mateix autor parla, a part de la percepció visual de l'efervescència i de l'escuma, de l'efecte en la degustació en boca: si la formació de bombolles és nul·la o molt petita serà aleshores dins la boca que tindrà lloc i de manera brusca el desprendiment de gas, fet que resulta particularment desagradable. Es nota, a més, una impressió d'agressivitat en que l'acidesa és predominant; hi ha un trencament de l'armonia i l'equilibri gustatiu.

Pel que fa a l'abocament del vi dins la copa, quan aquest es fa suaument i de forma que el vi baixi a través de la paret, s'observa com la disminució de l'escuma inicial és gairebé sempre regular, així com també la formació d'un collar de bombolles a la superfície (Robillard *et* Duteurtre, 2000). A més, l'estabilitat de l'escuma és major si s'aboca el vi en dos temps (volums iguals i amb una diferència de 30 segons entre ells),

sense que s'hagi pogut trobar una explicació satisfactòria d'aquesta constatació (Hardy, 1992).

La forma de la copa també és important. Tot i que el volum d'escuma inicial formada és pràcticament el mateix, en una copa de major diàmetre la superfície d'intercanvi vi / aire és també més gran, pel que la difusió lliure del CO₂ és més ràpida. Així, és d'esperar que l'efervescència s'acabarà abans. És per aquest motiu que s'aconseja l'ús de copes tipus flauta, més llargues i més estretes que les copes usades per a vins tranquils, per a la degustació de vins escumosos (Darsonville, 2001).

Proves realitzades sobre l'efecte de la temperatura de les copes i del vi no revelen diferències significatives en les propietats escumants (Robillard *et* Duteurtre, 2000). Només en el cas extrem d'haver deixat un cert temps una copa en el congelador s'observa l'efecte de la humitat: l'aigua que s'ha depositat sobre la superfície del vidre n'ha mullat les microcavitats responsables dels punts de nucleació heterogènia de forma que no és permet la formació de cambres d'aire i, conseqüentment, tampoc la gènesi de les bombolles.

Per la seva gran importància, cal fer referència a la forma de netejar les copes. És preferible fer-ho a ma, rentades amb aigua calenta lleugerament sabonosa (evitar l'excés de detergent i l'ús de productes abrillantadors), esbandir-les amb aigua també calenta, si pot ser desmineralitzada o desionitzada per evitar la deposició de sals càlciques (Darsonville, 2001), i deixar que s'escorrin cap per avall. Si es renten a màquina cal anar molt amb compte amb els productes d'esbandit ja que normalment contenen substàncies per a que els objectes rentats, una vegada secs, apareguin més brillants. S'ha observat un efecte clarament negatiu sobre l'estabilitat de l'escuma (Robillard *et* Duteurtre, 2000), suposadament per dissolució en el vi de residus d'aquestes substàncies. En quant a l'efervescència, tot i no haver-hi grans diferències, les bombolles apareixen més grosses ja que s'ha pogut observar com la superfície del vidre queda recoberta per un producte de característiques hidròfobes que presentarà, per tant, una major afinitat pel CO₂ dissolt en el vi. Es remarca que, fins i tot després de rentar correctament varies vegades una copa així contaminada, costa bastant recuperar les propietats de superfície inicials.

Finalment, s'ha de considerar l'efecte de l'eixugat. Si es fa de forma natural, amb la copa cap per avall, a temperatura ambient i en un entorn net, no solen alterar-se les característiques de la superfície del vidre. En canvi, l'ús de draps de tela o de paper podrien deixar restes, l'efecte dels quals és imprevisible: actuant com a punts de

nucleació heterogènia, l'efervescència pot veure's incrementada; en canvi, si es troben a la interfase líquid/gas poden actuar com a destructors de les bombolles. Els fabricants de copes recomanen guardar-les dins un armari de vidre, en un entorn sec i sense olors, i de peu, mai girades cap per avall (Fischer *et* Loewe-Stanienda, 1999; Darsonville, 2001).

Es veu, doncs, que la copa té una importància cabdal en l'expressió de les qualitats escumants d'un vi. Això fa difícil l'evaluació i la comparació d'aquestes característiques, no ja entre diferents grups de degustació sinó també per la variabilitat introduïda en un mateix comitè avaluador. És absolutament necessari tenir una cura especial amb les copes d'anàlisi i seguir de forma estricta un criteri preestablert per a la seva manipulació. Alguns experts en la degustació de vins escumosos solen portar amb ells una o varies copes, sempre les mateixes, i de les quals se n'encarreguen personalment (Darsonville, 2001). Ho fan amb un doble objectiu: disminuir els riscos de variabilitat lligats al fet de que en dues copes distintes no té per què observar-se un mateix comportament de l'escuma, i perquè d'aquesta manera els és possible l'acumulació de coneixements a partir dels adquirits en cada una de les sessions d'avaluació, com si de la construcció d'una base de dades es tractàs.

1.2.2. Mesures objectives de la qualitat de l'escuma

L'avaluació de la concentració de CO₂ en un vi escumós pot fer-se mitjançant mètodes volumètrics (alcalinització del CO₂ i posterior valoració) o per mètodes manomètrics, mesurant l'increment de pressió en la cambra d'aire del recipient tancat que conté el vi, una vegada acidificat amb àcid tartàric i agitat (Moreno-Arribas *et al.*, 1996).

Per a avaluar l'efervescència i l'escuma en el seu conjunt existeixen també diferents mètodes (Polo *et al.*, 1996). N'hi ha que es basen en la mesura de la cinètica de desprendiment de CO₂. En aquest sentit, s'ha proposat l'ús d'una equació cinètica de primer ordre que s'ajusti a aquesta forma de desprendre's el CO₂. D'aquesta manera es pot calcular una constant de velocitat del fenomen: per a una mateixa concentració de CO₂ en un vi, serà millor aquell que tengui una constant de velocitat menor ja que el desprendiment serà més lent i per tant la seva persistència major. Altres autors (Maujean *et al.*, 1988) han mesurat aquesta cinètica en funció de la massa d'una dissolució àcida desplaçada pel CO₂ després de la botella a intervals regulars de temps. Primer es desprèn el CO₂ lliure o espontani i després, per efecte de l'agitació, el denominat CO₂ provocat.

Altres mètodes es basen en la mesura de la quantitat d'escuma i la seva persistència. Bikerman (Bikerman, 1938) es dedicà a estudiar la formació d'escuma, entesa aquesta com a una propietat física d'un líquid que ha de ser independent de la quantitat d'aquest i del sistema de mesura utilitzat. Per fer-ho utilitzà un tub graduat de vidre amb un vidre porós a la seva part inferior, a través del qual es fa passar un corrent d'aire. La relació entre el volum d'escuma formada i el volum d'aire que ha passat a través del vidre en un temps determinat és el que anomena unitat de capacitat escumant i que considera com el temps de vida d'una bombolla. Edwards *et al.* (1982), en lloc d'aire, utilitzen CO₂ a un flux constant i conegut. A partir de l'escuma formada per un volum determinat de vi, es mesura el volum de líquid retingut a l'escuma, corresponent a la diferència entre el volum total i el volum de líquid remanent no mesclat amb l'escuma.

L'automatització del mètode de Bikerman, i fonamentant-se en els seus principis, ha permès a la Station Œnoteknique de Champagne la comercialització d'un equip anomenat Mosalux[®], el qual ha estat utilitzat per nombrosos autors per a la caracterització del comportament escumant del most, el vi o els vins escumosos (Maujean *et al.*, 1990; Robillard *et al.*, 1993; Malvy *et al.*, 1994; Andrés-Lacueva *et al.*, 1996a, 1996b; López-Barajas *et al.*, 1997, 1998, 1999; Senée *et al.*, 1998). Altres investigadors disposen també d'un sistema automatitzat propi, basat en el mètode de Bikerman i en la idea bàsica del Mosalux (Moreno-Arribas *et al.*, 2000; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2001).

Per a la mesura de certs paràmetres relacionats amb l'escuma i l'efervescència s'han utilitzat també sistemes d'imatges per visió artificial (Viaux *et al.*, 1994; Marchal *et al.*, 2001). Primer s'obté la informació mitjançant l'ús d'una o més càmeres i després es processa aquesta informació, normalment utilitzant un equip informàtic. És l'anomenada Visió Assistida per Ordinador (VAO). Així, es pot mesurar, per exemple, el nombre i tamany de les bombolles a la superfície del líquid, l'amplada de l'anell o collar de bombolles format a la superfície de la copa i el col·lapse de l'escuma (Moreno-Arribas *et al.*, 1996). Els sistemes d'imatges per visió artificial presenten un gran avantatge en comparació amb els altres: es mesura el comportament de les bombolles en el seu entorn real, o sigui, directament en la copa. Per aquest motiu s'utilitzen copes estandaritzades, de tipus flauta, com les usades en la degustació de vins escumosos ja que com s'ha vist amb anterioritat la copa té una gran influència en l'expressió de les propietats escumants del vi.

1.2.3. El Mosalux[®]

El Mosalux (del grec *mosa*: escuma, i del llatí *lux*: llum) és un aparell concebut i fabricat en els laboratoris d'enologia de la Facultat de Ciències de Reims en col·laboració amb la Station Œnotechnique de Champagne (Maujean *et al.*, 1988, 1990). Permet estudiar i mesurar l'escumabilitat i la permanència de l'escuma en unes condicions determinades i estandaritzades d'efervescència artificial. El principi del seu funcionament és la interrupció, per part de la pròpia escuma, d'un feix de llum infraroja. Aquesta escuma és generada per la injecció de diòxid de carboni a través d'un vidre porós.

Amb el Mosalux es poden mesurar les propietats efervescentes de qualsevol producte destinat a fer escuma (Poinsaut, 1991). Cal dir que la tècnica del Mosalux ha estat inspirada per treballs realitzats amb cervesa, l'escuma de la qual és molt diferent a la dels vins. Certament, quan la cervesa s'aboca dins la copa dona lloc a una escuma molt abundant i estable. Així, l'escuma que forma dins una proveta pot considerar-se com a prou representativa de la formada en una copa. En el cas d'un vi això no està tan clar (Douillard *et al.*, 1999), però a causa de la variabilitat introduïda per les copes de degustació en l'expressió de les propietats escumants del vi (veure apartat 2.1.2.1), ha estat necessària l'aparició d'un mètode de referència que permeti una valoració objectiva d'aquestes propietats. D'aquesta manera, a més, poden comparar-se de forma més fiable els resultats obtinguts per diferents investigadors.

Descripció i principi de funcionament de l'aparell

El Mosalux està constituït per un mòdul de mesura connectat a un ordinador (veure figura 10). L'element principal del mòdul de mesura és una proveta de vidre de 40 mm de diàmetre i 430 mm d'alçada. A la seva part inferior hi ha un vidre porós i un petit tub lateral que permet la injecció de CO₂, a través del vidre anterior, en el vi que es vol analitzar. A l'esquerra de la proveta s'hi troba una font emissora de llum infraroja, i a la dreta hi ha un receptor que emet un senyal de 0-10 V inversament proporcional a l'alçada de l'escuma. El flux de CO₂ es controla mitjançant un regulador. Aquest gas s'injecta per la part inferior de la proveta, la qual conté 100 ml del vi o líquid que es es vol analitzar (han de ser mostres desgasificades). La injecció a una pressió i un flux prèviament fixats provoquen la formació d'escuma dins la proveta, l'alçada de la qual és mesurada pel sistema emissor-receptor d'infrarojos i traduïda en forma de gràfic d'alçades per l'ordinador.

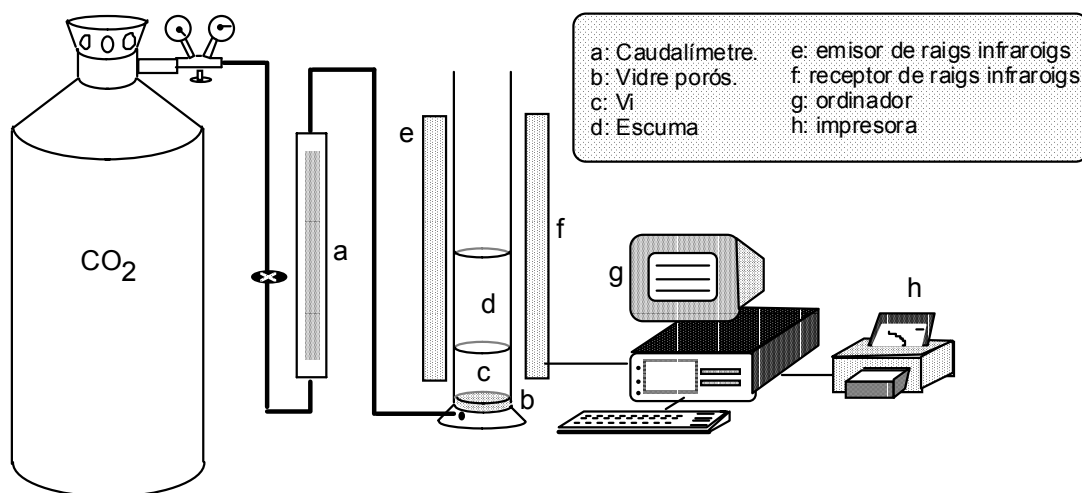


Figura 10 - Esquema del Mosalux (Canals, 1997)

Paràmetres determinats

El gràfic obtingut amb el Mosalux representa l'evolució de l'alçada de l'escuma en funció del temps. Mantinent sempre constants la pressió i el flux de gas, l'alçada d'escuma augmenta primerament fins arribar a un màxim i després disminueix fins establir-se a una alçada determinada. Quan ja no s'observen variacions significatives de l'alçada es para el flux de CO_2 i es mesura el temps de desaparició completa de l'escuma. A la figura 11 es representa una corba típica d'evolució de l'alçada de l'escuma obtinguda amb el Mosalux.

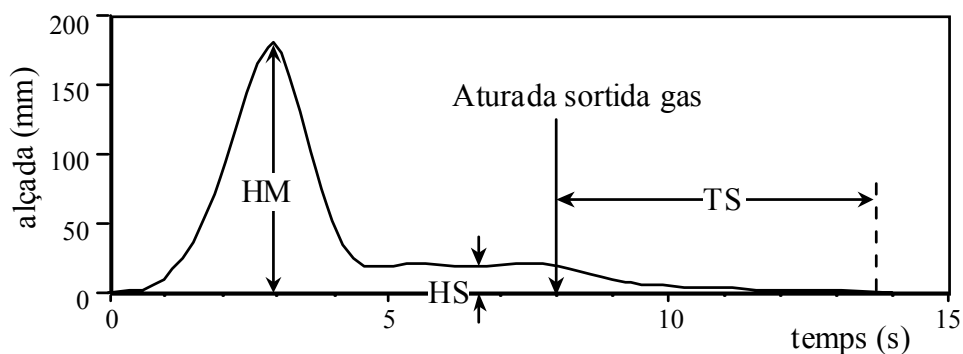


Figura 11 - Corba típica d'evolució de l'escuma (Canals, 1997)

Els tres paràmetres determinats són, doncs:

- Alçada màxima de l'escuma, *HM*: s'anomena també escumabilitat i es correspon amb l'alçada màxima de l'escuma obtinguda just després d'haver abocat el vi escumós a la copa.

- Alçada estable (o permanència) de l'escuma, HS : sense variar les condicions de pressió i flux de CO_2 , l'alçada d'escuma disminueix fins establir-se a l'alçada HS . Es correspon amb la permanència dels cordons de bombolles a la copa i amb la presència d'un collar de bombolles a la superfície del líquid. És un indicador de la capacitat per produir una escuma estable.
- Temps d'estabilitat de l'escuma, TS : és el temps necessari per a la desaparició completa de l'escuma quan es para la injecció de CO_2 . Representa el temps de desaparició de les bombolles a causa del drenatge, a la superfície del líquid. Amb aquest paràmetre es completa la caracterització de l'estabilitat dels cordons de bombolles a la copa.

Robillard *et al.* (1993) proposen un altre procediment per a la mesura de les propietats escumants, utilitzant el mateix mètode, en funció dels següents paràmetres: expansió de l'escuma (E), estabilitat de l'escuma (L_f) i coeficient de Bikerman (Σ). Com que aquests paràmetres, sobretot el coeficient de Bikerman, també han estat utilitzats posteriorment per altres autors (Dussaud *et al.*, 1994; Gallart *et al.*, 1997; López-Barajas *et al.*, 1997; Senée *et al.*, 1999), s'explicaran a continuació.

L'expansió de l'escuma (E) es defineix com el quocient entre els volums d'escuma formada (F_v) i de líquid inicial (L_v). No es tracta de l'expansió màxima sinó que és l'expansió per a un temps fixat d'injecció de gas (80 segons, en aquest experiment). La figura 12 mostra un perfil habitual d'alçades de l'escuma en aquestes condicions.

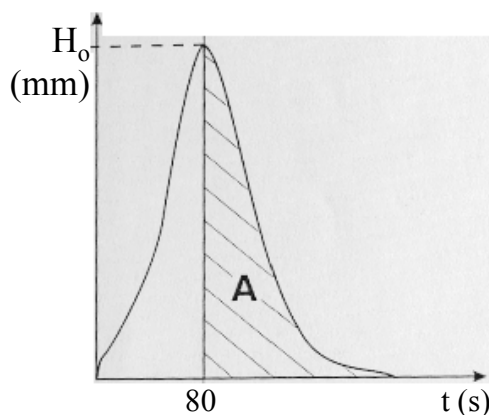


Figura 12 - Evolució típica de l'escuma durant la injecció de gas (0-80s), i quan aquesta s'atura ($t > 80s$).

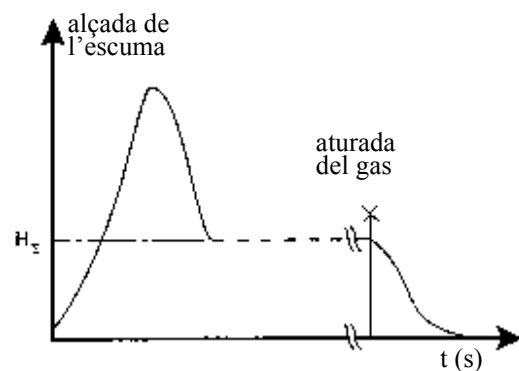


Figura 13 - Evolució de l'escuma en la determinació del coeficient de Bikerman. (Fig.12 & Fig.13: Robillard *et al.*, 1993)

L'estabilitat de l'escuma (L_f) vé donada com el quocient entre l'àrea (A) sota la corba una vegada parat el flux de CO_2 i l'alçada inicial de l'escuma (H_0):

$$L_f = H_0^{-1} \int H \cdot dt = A \cdot H_0^{-1} \quad (\text{estabilitat de l'escuma})$$

Finalment, el coeficient de Bikerman és una mesura del balanç entre la formació i destrucció de l'escuma en condicions dinàmiques. El flux i la pressió de gas són inferiors respecte dels establerts en la determinació dels altres dos paràmetres. La parada del flux de CO_2 es fa quan l'alçada de l'escuma es manté constant durant 2 minuts. És una mesura del temps promig de duració de les bombolles a l'estat estacionari: $\Sigma = F_v / Q$. En aquest cas, F_v és el volum d'escuma en aquest estat estacionari i Q el flux de CO_2 a pressió constant. El seu valor és independent de la pressió de gas i del grau de porositat del vidre fritat. A la figura 13 es veu el perfil d'evolució de l'escuma en aquestes condicions.

Els mateixos autors també tenen en compte alguns detalls que s'escapaven en el procediment descrit per Maujean (1990), com ara el volum exacte d'escuma existent i els problemes derivats de l'ús d'una pressió i flux de CO_2 baixos, o quan la columna no es troba sobresaturada en CO_2 . En aquest casos apareix un collar d'escuma relativament estable a sota de la columna d'escuma principal, mentre dura la injecció de gas, la qual cosa provoca una alteració dels valors mesurats.

En un estudi comparatiu (Gallart *et al.*, 1997) entre els paràmetres HM (alçada màxima), HS (alçada estable) i TS (temps d'estabilitat de l'escuma) mesurats per Maujean *et al.* (1990) i els paràmetres E (expansió), L_f (estabilitat de l'escuma) i Σ (coeficient de Bikerman) descrits per Robillard *et al.* (1993), troben que els que caracteritzen millor la capacitat escumant dels vins estudiats són HM, Σ i TS. Consideren que Σ és preferible a HS ja que el seu valor és independent de les condicions de determinació.

Hi ha autors que tenen en compte dues etapes en la fase de desaparició de l'escuma (Senée *et al.*, 1999) quan es para el flux de gas. La primera, designada per L_{f1} , correspon al temps de disminució ràpida de la quantitat d'escuma, i una segona, designada per L_{f2} , que mesura el temps de desaparició de les últimes bombolles a la superfície i que sol ser molt superior a L_{f1} . Dónen una explicació qualitativa d'un i altre: com que l'evaporació de l'etanol, ja que el tub de mesura està obert a l'aire en les condicions de mesura del Mosalux, pot alterar l'estabilitat de la fina capa líquida de les bombolles a la interfase aire/líquid, les mesures es repeteixen en un sistema tancat. El

paràmetre L_{f1} està fortament influenciat pel drenatge provocat per efecte de la gravetat i pot comparar-se amb els valors obtinguts per a una columna oberta, mentre que els valors per a L_{f2} són comparables als obtinguts en un sistema de mesura tancat. Queda sense resoldre, però, el problema que s'amaga en la dificultat de poder establir una relació entre el comportament d'una única capa en el cas de les bombolles residuals i el d'una columna tridimensional d'escuma.

Aplicacions

Anteriorment s'ha dit que amb el Mosalux es poden mesurar les propietats efervescents i escumants de qualsevol producte destinat a fer escuma. En el cas dels mostos, la seva anàlisi directa no és possible ja que donen lloc a una escuma massa abundant i grossera, amb unes bombolles de diàmetre excessiu, a vegades del mateix diàmetre que la proveta, i el sistema de detecció no permet mesurar una escuma d'aquestes característiques. Per solucionar aquest problema és suficient afegir una determinada proporció d'alcohol al most (Poinsaut, 1991; López-Barajas *et al.*, 1997).

Els vins sí que poden analitzar-se directament. Es pot veure, per exemple, l'efecte sobre l'escuma de les diferències en les tècniques d'elaboració, com també l'efecte de l'ús dels diferents productes (i l'efecte de la seva concentració) habituals en qualsevol dels diferents estadis d'aquesta elaboració (Maujean *et al.*, 1990; López-Barajas *et al.*, 1998). Així mateix, també és possible observar l'efecte de la presa d'escuma, és a dir, la segona fermentació en botella per a l'elaboració d'escumosos (Andrés-Lacueva *et al.*, 1996). Amb aquest mateix propòsit, Pueyo *et al.* (1995) utilitzen el mètode de Bikerman, que segueix els mateixos principis del Mosalux.

Amb el Mosalux es pot veure com l'escumabilitat d'un vi escumós està estretament relacionada amb les del vi base corresponent (Maujean *et al.*, 1990; Poinsaut, 1991) i que la concentració de proteïnes hi juga un paper destacat (Brissonet *et al.* 1991, 1993; Malvy *et al.*, 1994). A més, s'ha vist que les substàncies implicades en l'escumabilitat no ténen per què ser exactament les mateixes que intervénen en la permanència de l'escuma (Senée *et al.*, 1998, 1999).

1.2.4. Altres sistemes de mesura

Una variació del sistema utilitzat en el Mosalux ha estat realitzada per l'*Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC* (Pueyo *et al.*, 1996), però basant-se igualment en la representació de la variació de l'alçada de l'escuma en funció del temps, segons el mètode ideat per Bikerman. El canvi consisteix en utilitzar un flux d'aire i un sistema emissor-receptor d'ultrasons al que se li ha instal·lat una guia d'ones que actua com a diafragma per a evitar els falsos senyals procedents del tub de vidre gasificador. L'automatització d'aquest equipament ha estat feta per Moreno-Arribas *et al.* (2000).

Un cas particular dels sistemes d'imatges per visió artificial, molt recent i que ha proporcionat una gran quantitat d'informació, és la macrofotografia d'alta velocitat (Liger-Belair G. *et al.*, 1999, 2000, 2001b, 2001c). Amb aquest sistema s'han mesurat, per exemple, la freqüència de formació de bombolles, la seva cinètica de creixement, la velocitat d'ascensió cap a la superfície en el sinus de la matriu líquida i els fenòmens que tenen lloc a la superfície en el moment d'esclatar una bombolla. Per evitar interferències de la llum exterior en el sistema fotogràfic, tot el muntatge és introduït en una cambra obscura. A part de la mateixa copa i d'una càmera adaptada a les condicions de treball, el sistema de mesura consta d'una llum de flash, una làmina de plàstic translúcida per a que la llum sigui homogènia i un paper graduat situat al cristall de la copa per a mesurar l'escala. Amb un estroboscopi (sistema de llum de flash de freqüència variable) es mesura la freqüència de formació de les bombolles, tot ajustant la freqüència de flash de l'aparell a la d'aquestes. Així, cada una de les fotografies d'un cordó de bombolles pot interpretar-se com a una successió de fotografies d'una mateixa bombolla. D'aquesta forma pot trobar-se quin és l'increment de tamany d'una bombolla i la seva velocitat durant l'ascensió en el líquid.

A un nivell més particular, i relacionat amb les bombolles i les propietats de les seves interfases, s'han fet diferents estudis, com ara mesures del gruix de la capa líquida d'una bombolla a la interfase líquid/aire i mesures el·lipsomètriques i de la seva tensió superficial i (Puff *et al.*, 1998; Senée *et al.*, 1999, 2001; Péron *et al.*, 2000, 2001). Aquestes dues últimes serveixen com a indicadors de l'adsorció de compostos amb propietats tensioactives a la superfície. Pel que fa a les diferències entre un i altre mètodes, les mesures per el·lipsometria es revelen més sensibles en quant a la detecció de la formació d'una capa d'adsorpció. S'ha de tenir en compte, però, que el solvent usat en els experiments no és el mateix, de manera que les molècules adsorbides en un cas no ténen per què ser-ho en l'altre. A mode de conclusió, s'ha constatat que la

mesura de la cinètica de variació de la tensió superficial avalua de forma satisfactòria el conjunt de macromolècules d'una mostra. No obstant, aquesta variació no és del tot proporcional a la concentració de les macromolècules.

Per acabar, una altra tècnica utilitzada és la de microscopia d'angle de Brewster (BAM) la qual proporciona imatges dels dominis bidimensionals de la capa d'adsorpció, mitjançant l'exploració de la seva superfície (Péron *et al.*, 2001).

2. Influència de la composició química del vi sobre l'escuma

L'escuma dels vins escumosos és una qüestió complexa, en la que es dona un balanç entre tot un conjunt de factors positius i negatius que afecten la seva qualitat (Robillard, 1995).

La composició química del vi és segurament el principal factor que condiciona la qualitat intrínseca de la seva escuma i efervescència (Maujean *et al.*, 1990; Robillard *et al.*, 1993; Pueyo *et al.*, 1995; Andrés-Lacueva *et al.*, 1996). Per aquest motiu, qualsevol operació que pugui provocar un canvi en la composició, concentració o qualitat d'algun dels elements que constitueixen un vi escumós es traduirà en un malbaratament, una inhibició o bé una millora de la seva escuma. Tota la informació relacionada amb els factors i elements que l'afecten pot resultar de gran interès i utilitat per a l'elaborador.

També ténen un efecte important la duració i la temperatura a la que s'ha realitzat la presa d'escuma (segona fermentació), el tipus de llevat utilitzat i l'ús de clarificants (Poinsaut, 1991; Marchal, 2000) o d'adjuvants de tiratge per a facilitar el remogut de les botelles (Hardy, 1993a), operació en la qual els diferents pòsits formats són traslladats cap al coll de la botella per a ser eliminats posteriorment.

En les bombolles, l'estabilitat de les interfases líquid/gas, sigui aquest CO₂ o bé aire quan arriben a la superfície, està lligada a la presència de partícules col·loïdals en solució (Senée *et al.*, 1998). Això afectarà, consegüentment, l'aspecte global de l'escuma, ja que el nombre i el tamany de les bombolles condicionen les característiques escumants d'un vi. És per aquest motiu que la formació d'una capa d'adsorció, per part de les diferents molècules amb propietats tensioactives del vi, a la interfase gas/líquid de les bombolles, és d'una gran importància en l'estabilització de l'escuma (Puff *et al.*, 2001).

Els tensioactius són molècules que produeixen una disminució de la tensió superficial. En la composició d'un vi hi ha diferents tipus de substàncies que presenten aquesta propietat (Bosch *et al.*, 1989). Entre les més comunes hi trobam molècules petites com l'etanol, el glicerol, l'àcid tartàric i alguns àcids grassos; i altres més grans com ara aminoàcids, polisacàrids, proteïnes, lipoproteïnes i glicoproteïnes. El que caracteritza aquests compostos sol ser la presència, en la seva estructura, de dos grups antagònics respecte l'aigua: un hidrofòbic i un altre hidrofílic, el que determinarà la seva orientació en les interfases vi/gas. L'origen dels anteriors biotensioactius és,

principalment, vegetal (ràim) i dels propis llevats (fermentació i conservació del vi en contacte amb ells).

Es veu, doncs, que el coneixent i l'estudi de l'estructura de les molècules implicades en les propietats efervescentes i escumants dels vins és molt necessari ja que d'aquesta manera es podran orientar les pràctiques vitícoles i enològiques per tal de controlar millor les qualitats organolèptiques de l'escuma. A continuació s'estudiarà la influència de cada un d'aquests compostos.

2.1. Influència dels col·loides (proteïnes, glicoproteïnes i polisacàrids)

Les proteïnes formen part del grup de biomolècules presents en el vi que, per les pròpies característiques, tenen capacitat per formar capes d'adsorció i estabilitzar les interfases vi/gas a les concentracions habituals d'etanol d'aquests (Bosch *et al.*, 1989; Robillard, 1995; Douillard *et al.*, 1999). Sembla, per tant, que puguin tenir un paper destacat en la formació d'escuma en el cas dels vins escumosos.

Com que els diferents compostos polipeptídics, proteïnes, glicoproteïnes i proteoglicans són molt variats en els vins, sobretot pel que fa a la seva composició i característiques, la determinació de la concentració de proteïna sempre ha presentat problemes (Douillard *et al.*, 1999). Cap dels mètodes utilitzats fins ara en la seva determinació no pot considerar-se completament específic per a proteïnes a causa de la presència de substàncies interferents. El mètode de Bradford, que és el més utilitzat en enologia per a la quantificació directa de proteïnes, presenta la interferència d'altres substàncies com ara l'etanol i els compostos fenòlics (Marchal *et al.*, 1997). Es per aquest motiu (importància de l'efecte de la matriu), i per la varietat de mètodes de determinació de proteïna utilitzats, que cal anar amb compte quan es pretén avaluar i interpretar de forma global l'efecte de les proteïnes sobre l'escuma.

No obstant això, en els diferents experiments realitzats fins ara s'han pogut establir sempre correlacions entre les propietats escumants i la presència de proteïnes. Per exemple, Maujean *et al.* (1990) observen una bona correlació entre la concentració total de proteïna i el paràmetre HM d'escumabilitat, mentre que no es pot correlacionar amb el temps de desaparició de l'escuma (TS). Amb proves d'addició de diferents dosis de bentonita (utilitzada per a eliminar les proteïnes del vi i prevenir l'aparició d'enterboliments) en vins i mostos, observen un efecte clarament desfavorable per l'escuma per a dosis superiors a 10 g/hL. Els estudis fets per Brissonnet *et* Maujean

(1991, 1993) mostren que l'aportació de bentonita disminueix de manera sensible la quantitat de proteïnes en el vi, a la vegada que s'observa un increment de la inestabilitat de l'escuma. Quan afegeixen proteïnes aïllades d'un *champagne* al mateix *champagne* original, el volum d'escuma, en el temps, és major en relació a la mostra a la que no s'han afegit proteïnes.

Altres resultats i relacions experimentals s'han obtingut mitjançant l'anàlisi de "vins d'escuma", d'ultrafiltració de vins i d'anàlisis estadístiques de correlacions amb la composició química del vi.

El vi d'escuma s'obté recullint l'escuma formada a partir del vi, en injectar en continu diòxid de carboni (Brissonet *et* Maujean, 1991, 1993). Aquest vi conté d'un 10 a un 30% més de proteïna que el vi del qual prové. Són precisament les proteïnes de major hidrofobicitat les que estan preferentment presents en el vi d'escuma, el que mostra que no totes les proteïnes participen de manera idèntica en les propietats escumants. S'ha observat també un enriquiment en altres substàncies, com ara ferro i alguns polisacàrids. En qualsevol cas, la seva presència a l'escuma no té per què implicar un eventual efecte en l'estabilització de les bombolles.

La ultrafiltració tangencial de vins permet obtenir un efluent enriquit en macromolècules, i particularment en proteïnes, i un ultrafiltrat empobrit en aquests constituents (Malvy *et al.*, 1994). L'addició d'aquestes dues fraccions al vi original permet variar-ne la concentració proteica i macromolecular. Es veu com les propietats escumants, definides pels tres paràmetres del Mosalux (HM, HS, TS), dels vins reconstituïts a partir de les fraccions d'ultrafiltrat i ultraconcentrat, i del vi original, estan ben correlacionades amb la presència de proteïna i de macromolècules. L'assaig s'ha realitzat en una única mostra de vi base.

Existeixen varis estudis on es relacionen estadísticament les propietats escumants d'un vi amb la seva composició química (Pueyo *et al.*, 1995; Andrés-Lacueva *et al.*, 1996a; López-Barajas *et al.*, 1997, 1998, 1999). Se solen tenir en compte una gran quantitat de paràmetres, a part dels mesurats mesurats habitualment en un vi (grau alcohòlic, acidesa total i volàtil, pH, SO₂, glucosa i fructosa, àcids majoritaris...), com ara els diferents compostos nitrogenats, sucres i polisacàrids, compostos volàtils, compostos fenòlics i àcids grassos. A continuació es descriuen alguns dels resultats relacionats amb la concentració de proteïnes.

En mostos, López-Barajas *et al.* (1997) troben que existeix una bona correlació entre la concentració de proteïnes i l'escumabilitat (HM).

Pueyo *et al.* (1995) han comparat l'alçada estable i l'estabilitat de l'escuma de deu vins base i deu caves, amb 73 dels seus paràmetres químics. En els vins base s'observa una correlació negativa de la concentració de proteïna amb l'alçada estable de l'escuma, mentre que no es relaciona de forma significativa amb la seva estabilitat. Per contra, en el cas dels vins escumosos, la correlació és positiva amb l'estabilitat de l'escuma, però no hi ha cap relació amb l'alçada estable.

En un estudi anàleg (Andrés-Lacueva *et al.*, 1996a), realitzat amb 44 mostres de vins base, s'ha observat una correlació positiva amb l'alçada de l'escuma però negativa amb l'estabilitat. Aquests resultats contrasten amb els precedents i inciten a tenir molta prudència en les seves interpretacions.

Així, aquest tipus d'aproximacions estadístiques aporten només correlacions, i el nombre forçosament restringit de mostres no permet anar massa lluny en la interpretació dels resultats. A més, en el cas dels *champagnes* les correlacions han estat sempre positives (Douillard *et al.*, 1999), mentre que en caves els resultats no segueixen una tendència clara. S'hauria de plantejar, doncs, la qüestió dels efectes de les varietats de raïm, les condicions de cultiu i els canvis en els procediments d'elaboració, en el moment d'interpretar els resultats observats.

Com s'ha vist, les correlacions estadístiques no són suficients. Això fa pensar que cal recórrer a l'estudi de solucions model per intentar establir una relació de causa-efecte entre la presència de proteïnes i les propietats escumants.

En solucions model s'ha pogut observar que les proteïnes s'adsorbeixen en les interfases líquid/gas (aire i/o CO₂) de la capa líquida que delimita les bombolles, contribuint d'aquesta manera en la seva estabilització, on s'hi troben en concentracions de saturació (Dussaud *et al.*, 1994b; Puff *et al.*, 1998). L'estabilització es pot realitzar mitjançant diferents mecanismes, però sobretot per l'augment de la viscositat i l'elasticitat de la capa interfacial (mesura del mòdul de compressibilitat) i els efectes estèrics que mantenen a una certa distància les interfícies de la làmina líquida.

Si la tensió superficial és la que assegura la cohesió del líquid, afavorint la formació de bombolles, el més immediatament mesurable és la disminució d'aquesta tensió quan es dona l'adsorció de proteïnes a la interfície aigua-gas (Puff N. *et al.*,

1998). En el cas del vi, la dificultat d'aquesta mesura vé donada pel fet que l'etanol també s'adsorbeix, disminuint el valor de la tensió. Els mateixos autors han intentat determinar l'estructura de la capa d'adsorció formada pel cas concret de la κ -caseïna en presència d'un 12.5% d'etanol (percentatge habitual en els vins), observant que aquesta proteïna s'adsorbeix dues vegades més en presència d'etanol que en la seva absència. En canvi, les mesures de tensió superficial en equilibri suggereixen tot el contrari.

El model d'estructura de la capa d'adsorció és, de forma qualitativa, el següent: les cadenes polipeptídiques parcialment desplegadas de les proteïnes adsorbides formen una xarxa en que les molècules s'enreden parcialment amb les seves veïnes. A la interfície, aquesta xarxa deixa lloc per a les molècules de solvent o d'etanol, en el cas d'una solució hidroalcohòlica. La pressió de superfície és, per tant, la suma de les dues contribucions anteriors.

La conclusió d'aquests estudis amb solucions model és que les proteïnes poden adsorbir-se molt bé en presència d'etanol i conferir a les interfícies de les bombolles propietats estructurals que les estableixen. La qüestió està en saber si això passa també en el cas dels vins escumosos, fet que pareix possible a partir dels resultats obtinguts en tota la sèrie d'estudis realitzats. Tal vegada, però, en aquests casos seria millor considerar el terme macromolècula, menys restrictiu que el de proteïna, tenint en compte que els vins són mesclades complexes de molècules i macromolècules.

Un cas especialment interessant és el de les glicoproteïnes, ja que la seva estructura, formada per una part proteica i una part glucídica, o sigui, dos dominis clarament diferenciats en quant a característiques d'hidrofilia i hidrofobicitat, fa que siguin un bones candidates per a la formació de capes d'adsorció a les interfases de les bombolles (Bosch *et al.*, 1989; Moine-Ledoux, 1997; Senée *et al.*, 1999).

En aquests tipus de molècules, els carbohidrats tenen un efecte protector sobre la proteïna de cara a la seva desnaturalització provocada per l'etanol, de forma que n'incrementen la solubilitat. L'ordre de magnitud d'aquesta protecció és proporcional al nombre de grups hidroxil (Senée *et al.* 1999).

El seu origen, com en el cas de les proteïnes, pot ser vegetal (del propi raïm) o dels llevats. S'engloben dins la fracció poliosídica dels vins i mostos. Les manoproteïnes estan considerades com els elements més representatius de les glicoproteïnes del vi (Waters *et al.*, 1994). Aquestes manoproteïnes, juntament amb els glucans, són els principals constituents de la paret cel·lular dels llevats, i són

alliberades per aquests tant a la fase de creixement (inici de la fermentació alcohòlica) com en la d'autòlisi i conservació sobre lies (Charpentier *et* Feuillat, 1993).

Les manoproteïnes són proteoglicans constituïts per un 10 a un 20% d'una part proteica i per aproximadament un 80% de D-manosa, associats a alguns residus de D-glucosa i de N-Acetil-D-glucosamina (Saulnier *et al.*, 1991). Presenten una gran varietat de masses moleculars (5000 a 450000 Da) i de punts isoelèctrics (Van Risum *et al.*, 1991).

En quant a les seves propietats, s'ha evidenciat un efecte protector de cara a l'estabilitat proteica del vi i de les precipitacions tartàriques (Moine-Ledoux, 1997; Moine-Ledoux *et al.*, 1997). Aquesta activitat protectora respecte de la formació d'enterboliments proteics es tradueix en l'ús de quantitats inferiors de productes destinats a eliminar proteïnes en el vi (principalment bentonita) respectant-ne, per tant, la composició química original. En els vins escumosos, una vegada acabada la segona fermentació del vi, el procés d'autòlisi dels llevats durant la conservació en la botella provoca un enriquiment en glicoproteïnes (Charpentier *et* Feuillat, 1993). En un experiment d'enriquiment artificial amb un autolisat de llevats (Moine-Ledoux *et* Dubourdieu, 1996) s'observa, després de 7 o 8 mesos d'envelliment, una major qualitat de l'escuma (finura i persistència) i una major qualitat aromàtica. De fet, les manoproteïnes interaccionen amb una gran quantitat de molècules aromàtiques (Lubbers *et al.*, 1994) augmentant-ne o disminuint-ne la volatilitat, essent el seu contingut proteic el principal responsable de la fixació d'aquests compostos.

Respecte de l'activitat protectora de cara a la prevenció de les precipitacions tartàriques, tot i que no s'hagi comentat de manera explícita, és obvi l'efecte en les propietats escumants d'un vi. La presència de cristalls de tartrat pot fer que aquests actuïn com a punts de nucleació heterogènia de les bombolles, alterant el fenomen d'efervescència.

Senée *et al.* (1999) estudiaren les propietats escumants i les cinètiques de drenatge de les capes líquides interfacials de les bombolles en solucions hidroalcohòliques de glicoproteïnes de llevat, comparant-les amb les de diferents vins. La principal observació és que el comportament escumant d'aquestes solucions model, en funció de la seva concentració en glicoproteïnes, pot ser equiparat al dels vins. Durant el procés de drenatge en una bombolla es constata, en funció també d'aquesta concentració, la formació d'agregats a la capa líquida interfacial, fenomen que es correspon amb un increment important de l'estabilització d'aquesta interfase. La

formació d'agregats s'explica per la disminució del gruix de la capa, el que provoca un increment de la concentració de macromolècules superior al seu límit de solubilitat, cosa que no passa en el sinus de la matriu líquida. En quant als paràmetres d'escuma, la principal diferència amb els vins és l'absència d'escuma residual en les dissolucions en les que la concentració de glicoproteïna és petita. En canvi, quan aquesta concentració s'incrementa també augmenten els valors de tots els paràmetres relacionats amb l'escuma, a l'igual que el gruix de la pel·lícula líquida interfacial.

Es veu, per tant, que les propietats de les glicoproteïnes en general, i de les manoproteïnes en particular, són, a més de nombroses, molt positives de cara a la qualitat global del vi. La seva participació en les característiques escumants, tot i no ser decisiva, és clara i de gran importància. L'estudi de les glicoproteïnes i dels fenòmens relacionats amb la seva presència en el vi poden aportar informació de gran valor, sobretot per a l'elaborador, ja que li permetran dirigir les pràctiques enològiques de forma més eficient.

2.2. Els lípids

Des de fa temps s'ha estudiat l'efecte dels lípids en l'escuma de la cervesa i la bibliografia existent al respecte és abundant. El cas dels vins escumosos és més recent.

En els primers experiments fets en aquest sentit, Maujean *et al.* (1990) estudiaren, amb l'ajuda del Mosalux, la influència de l'addició de diferents concentracions dels àcids grassos octanoic i decanoic sobre les propietats escumants d'un vi tranquil. Els resultats mostren que tant un com l'altre afecten poc l'escumabilitat, mentre que la permanència de l'escuma millora. En quant a la seva estabilitat, aquesta disminueix de forma considerable amb la concentració d'àcid gras afegit. Conclouen que els resultats són coherents si es té en compte que qualsevol substància tensioactiva, pel fet d'alterar la tensió superficial i disminuir la viscositat de la interfase líquida de les bombolles, disminueix també l'estabilitat d'aquestes últimes i, per tant, la de l'escuma.

Per tal de determinar l'efecte d'alguns dels compostos que intervenen en les propietats escumants de vins de *champagne*, Brissonet *et* Maujean (1991) han quantificat distints lípids en els vins base, en l'escuma procedent d'aquests vins i en el vi residual que serví per obtenir l'escuma. Troben que la concentració de lípids de cadena curta és major a l'escuma, mentre que els de cadena llarga es troben en una major concentració en el vi residual. Bosch *et al.* (1989) troben que hi ha una

acumulació dels lípids a l'escuma. Els resultats es relacionen amb l'activitat de superfície d'aquests compostos però no estudien l'efecte sobre l'estabilitat de l'escuma.

La influència dels lípids sobre l'estabilitat de l'escuma de vins de *champagne* ha estat estudiada per Dussaud *et al.* (1994) i Robillard *et al.* (1995). Aquests autors han identificat i quantificat, en el vi, diferents tipus de lípids amb la idea d'extreure'ls i purificar-los per a estudiar després l'efecte de la seva addició sobre l'estabilitat de l'escuma i les propietats interfacials dels vins. El fet, però, de no poder obtenir uns extractes completament purs (l'existència de contaminants pot tenir també un efecte sobre les propietats escumants) ha fet que hagin decidit utilitzar una mescla de lípids comercials purs i veure el seu efecte en el vi mitjançant l'addició de diferents quantitats d'una mescla hidroalcohòlica d'aquests. Els resultats mostren que només s'estableix un efecte negatiu sobre l'escuma a curt temps (30 minuts d'interacció). En canvi, passades 72 hores després de ser afegits al vi, no s'observa cap canvi en el valor dels paràmetres escumants, independentment de la concentració de lípids afegits.

En el mateix estudi, després d'obtenir vins de diferents concentracions alcohòliques (evaporació de la matriu i restitució amb mescles d'etanol i aigua), únicament quan el contingut d'alcohol és baix s'observa un cert efecte dels lípids sobre els paràmetres escumants, causant una disminució de tots ells. L'alcohol influeix en l'estat físic en que poden trobar-se els lípids (forma molecular, o agregats micel·lars). A concentracions més elevades d'etanol, el comportament de l'escuma està regit sobretot per aquest, revelant-se com el principal compost que actua en la interfase gas/líquid interferint, a més, en l'adsorció d'altres substàncies amb propietats tensioactives.

Segons aquests autors (i a partir dels resultats trobats per altres investigadors en l'estudi de cerveses), l'explicació de les observacions anteriors es basa, de forma qualitativa, en l'evolució en el temps de l'estat físic dels lípids. Se suposa que quan ha passat poc temps de l'addició dels lípids al vi, aquests es troben poc dispersats, formant micel·les. Per a temps més llargs, els mateixos lípids (ja dissolts a causa de la presència d'etanol) es trobarien formant complexos amb diferents molècules, com podria ser el cas de proteïnes, de forma que el seu efecte destructor de l'escuma es veuria considerablement disminuït.

El mecanisme de destrucció de l'escuma per part dels lípids fou descrit per Ross l'any 1969. Inicialment els lípids es trobarien formant micel·les dins la matriu líquida. A mesura que el temps transcorre hi hauria un traspàs continuat d'aquests cap a la interfase líquid-gas, fet que provocaria que aquesta interfase fos cada vegada més prima

fins rompre's definitivament (coalescència). A la figura 14 es representa de forma esquemàtica com seria aquest procés.

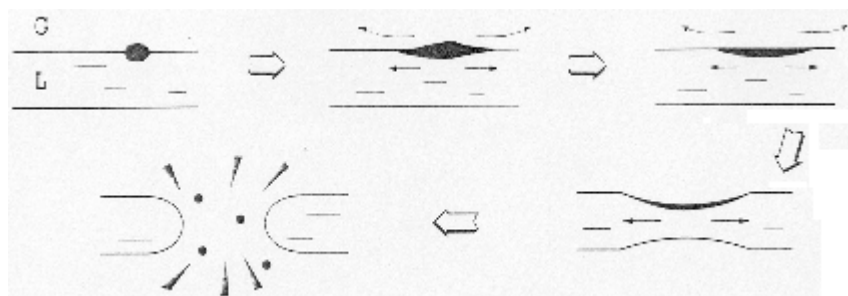


Figura 14 - Trencament, per part dels lípids, de la capa líquida interfacial.

Per tant, s'ha d'anar en compte a l'hora d'interpretar els resultats anteriors. Els distints lípids estudiats, i que s'han addicionat al vi per tal de determinar-ne l'efecte sobre les propietats escumants, no són els propis d'aquest, i és sabut que la seva estructura química influeix significativament en les propietats de superfície. A més, cal pensar en l'efecte de la matriu sobre el seu comportament, tant en el sinus del líquid com a la interfase líquid/gas, i en el fet que no es coneix quin seria el comportament de l'escuma en un vi que no contengui cap lípid.

2.3. L'etanol

L'etanol és un dels compostos amb propietats tensioactives majoritàriament present en el vi. La seva elevada concentració és, doncs, la que determinarà principalment el comportament escumant d'aquest (Dussaud *et al.*, 1994a; Robillard, 1995; Péron *et al.*, 2000). Segons Maujean *et Marchal* (2000), aquesta és també la causa de que el seu efecte sigui preponderantment negatiu en l'estabilització de la interfase vi/gas de les bombolles, en comparació amb altres begudes efervescents com la cervesa.

Com que els vins són una mescla complexa de diferents substàncies, actualment no és possible determinar quines d'elles, en un moment donat, es troben adsorbides a les interfases de les bombolles. Per aquest motiu no és possible establir una relació entre la seva concentració i les mesures de tensió superficial de la interfase de les bombolles. No obstant, els resultats obtinguts en vins mostren, en aquest sentit, que els valors són molt semblants als mesurats en solucions hidroalcohòliques de la mateixa concentració d'alcohol (Senée *et al.*, 1999), el que indica que és precisament l'etanol el principal factor que intervé en aquest fenomen. Malgrat això, la mesura de les propietats escumants amb el Mosalux estableix una gran diferència entre un vi i una solució

hidroalcohòlica, referent a l'estabilitat de l'escuma: en aquesta última, el temps de permanència de bombolles residuals a la superfície del líquid és nul.

En l'elaboració de vins escumosos, la segona fermentació provoca un increment de la concentració d'etanol respecte de la del vi base de partida. L'efecte d'aquest increment sobre les propietats escumants ha estat comparat, utilitzant el Mosalux, amb el d'addició d'una quantitat equivalent d'etanol al mateix vi base de partida (Maujean *et al.*, 1990). En un cas i altre s'observa una disminució del mateix ordre de l'escumabilitat, en comparació amb el valor corresponent al vi base original. Pel que fa a l'estabilitat de l'escuma, el valor de TS és menor, respecte del vi inicial, en el cas d'addició d'etanol; en canvi, en el vi que ha experimentat la segona fermentació s'obté un valor superior, el que indica que aquest paràmetre es veu alterat per altres fenòmens que tenen lloc durant la fermentació dins la botella.

Actualment se sap que l'etanol té dos efectes principals sobre les proteïnes (Canals, 1997; Senée *et al.*, 1999): és un dissolvent pobre, i actua com a agent desnaturalitzant afeblint-ne els enllaços hidrofòbics, de manera que la part hidrofòbica de les cadenes proteïques en estat desnaturalitzat queda exposada a l'etanol. En quant a l'efecte sobre els lípids, l'etanol influeix en l'estat físic en que aquests poden trobar-se (formes lliure, micel·lar, o complexada, com és el cas de les lipoproteïnes) i n'alterarà, per tant, les propietats. Així, tant en el cas de les proteïnes com el dels lípids, la participació d'aquests en les propietats superficials de les interfases de les bombolles es veurà alterada per l'etanol, de manera que en resultarà afectat el comportament escumant global.

Amb l'objectiu d'il·lustrar com afecta l'etanol a l'estructura i les propietats de la capa d'adsorció de les proteïnes, i poder apropar-nos al que passa realment en un vi escumós, Puff *et al.* (1998) estudien el cas concret de la κ -caseïna en solucions hidroalcohòliques. Observen que per a una concentració donada d'aquesta, té lloc un augment de la quantitat de proteïna adsorbida per unitat de superfície a mesura que s'incrementa la concentració d'alcohol. Els valors de tensió superficial també augmenten, en comparació amb el valor obtingut quan únicament es té la proteïna en solució. Aquests resultats són coherents amb el fet que, a la interfase, l'espai ocupat per la xarxa de proteïnes ha estat manllevat a la fracció de superfície abans disponible per a l'etanol. Es veu, per tant, que l'etanol modifica tant les propietats del solvent, com les interaccions entre la proteïna i el solvent, i l'estructura de la capa d'adsorció.

Aprofundint l'estudi anterior, els mateixos autors (Puff *et al.*, 2001) estudien com afecta l'etanol l'adsorció, a la interfase aire/líquid, de la κ -caseïna i la invertasa (sacarasa) del raïm, en comparació al conjunt d'altres molècules del vi. Per a un contingut d'etanol del 12,5% (que és la que pot tenir un vi qualsevol), l'augment de la tensió superficial provocat per una o altra proteïnes és molt petit, el que indica que es troben adsorbides en poca quantitat en comparació amb el cas d'una dissolució sense etanol. En canvi, mesures realitzades amb altres tècniques revelen que, a la mateixa concentració d'alcohol, el conjunt de proteïna adsorbida és com a mínim igual a la quantitat adsorbida en absència d'etanol. Per explicar aquest fet es recorre a un model on les proteïnes es trobarien formant una xarxa en la que l'etanol només pot adsorbir-se a les zones vacants deixades per aquestes, el que permet explicar els baixos valors de tensió superficial mesurats en el cas de les proteïnes en una solució hidroalcohòlica. En canvi, si es compara la variació del coeficient de dilatació en funció de la tensió superficial i l'efecte de la concentració d'etanol (que en el cas d'un vi les variacions són mínimes), els resultats es contradiuen novament amb l'observat en l'experiment anterior. Els resultats mostren que el model de comportament de la invertasa no és bo per a explicar els fenòmens d'adsorció a la interfase vi/aire.

Per tal de poder estudiar l'efecte d'altres compostos en la capa d'adsorció formada a la interfase aire/vi en un *champagne*, Peron *et al.* (2000) el que fan és diluir les mostres 4 vegades amb aigua. D'aquesta manera hi ha una disminució de la contribució de l'etanol en la tensió superficial prou gran com per poder mesurar amb una millor precisió quina és la influència i el comportament d'aquestes altres substàncies amb propietats tensioactives. Es troba que són, sobretot, les macromolècules amb una massa molecular superior a 10^4 Da les que tenen una major influència en les propietats de superfície. S'observa també que certes molècules que no presenten activitat superficial en el vi esdevenen actives després de diluir el vi amb aigua.

A partir del conjunt de resultats exposats es veu que l'etanol té un paper molt important en tots els fenòmens que intervenen en la caracterització de les propietats escumants d'un vi, si bé el seu mecanisme d'acció no ha estat, de moment, perfectament establert. Cal, doncs, aprofundir en aquest estudi, encara que la complexa composició del vi faci que aquesta recerca no sigui una cosa fàcil.

2.4. Altres (ions, àcids orgànics, sucres, aminoàcids...)

Hi ha una gran quantitat d'altres substàncies normalment presents en el vi la influència de les quals, sobre les propietats escumants, no ha estat tan estudiada com la dels compostos anteriors. Entre elles hi trobam ions metàl·lics, àcids orgànics aminoàcids i petits pèptids, polisacàrids, etc. Cal dir que la majoria d'estudis que relacionen aquests compostos amb les característiques escumants d'un most, un vi o un vi escumós es basen en l'establiment de correlacions estadístiques a partir de la determinació de la seva concentració i els valors dels diferents paràmetres que permeten definir la qualitat de l'escuma.

Maujean *et al.* (1990) s'interessaren en els treballs realitzats per altres autors referents a l'efecte en les propietats efervescents d'alguns dels cations que poden trobar-se presents en el vi, com ara el calci, el magnesi, el ferro i el coure. En determinaren l'efecte de la seva addició al vi sobre la proporció de CO₂ immobilitzat en l'efervescència natural d'aquest una vegada acabada la segona fermentació, i en els paràmetres proporcionats pel Mosalux en l'efervescència provocada. Tant el calci com el magnesi tenen un efecte negatiu; en canvi, el ferro i el coure no presenten cap efecte significatiu. Pel que fa a les mesures amb el Mosalux, l'efecte dels diferents cations sobre l'escumabilitat és pràcticament nul, mentre que els valors per a l'estabilitat i la permanència de l'escuma són superiors amb l'addició de ferro o coure, en comparació amb el vi control, i inferiors en el cas del calci i el magnesi.

En l'anàlisi de l'escuma dels vins, Brissonet *et Maujean* (1991) observen que aquesta es troba enriquida en ions de ferro, en polisacàrids i en proteïnes.

La seva influència global sobre el comportament de l'escuma ha estat posada de manifest per Robillard *et al.* (1993). A partir del fet que tant els valors d'escumabilitat com d'estabilitat de l'escuma disminueixen amb la filtració del vi, mentre que el coeficient de Bikerman (que mesura del temps de vida de les bombolles en condicions dinàmiques) no presenta variacions importants, han volgut veure quina és la influència dels diferents compostos implicats en un i altre cas. Per fer-ho, han comparat el comportament d'un vi amb el d'una solució model (solució hidroalcohòlica en la que s'ha ajustat la concentració d'etanol, àcid tartàric, àcid làctic, glicerol, alguns ions i pH, a la del vi original). Els valors d'escumabilitat i estabilitat de l'escuma són molt diferents en un cas i altre; en canvi, el coeficient de Bikerman és gairebé el mateix (i diferent del mesurat en una solució hidroalcohòlica pura). Això pareix indicar que les macromolècules i altres substàncies amb propietats tensioactives presents en el vi són

les que determinen el comportament general de l'escuma, mentre que aquests altres compostos que formen part de la matriu del vi (àcid tartàric, glicerol, ions salins...) intervenen, principalment, en el comportament de l'escuma en condicions dinàmiques.

Utilitzant un mètode per a la caracterització de pèptids en el vi (Bartolome *et al.*, 1997), ha pogut comprovar-se que la composició peptídica dels vins escumosos procedents de quatre varietats viníferes conreades a la regió del Cava (macabeu, xarel·lo, parellada i chardonnay) és molt similar. Això fa que aquest no pugui ser un factor discriminatiu en quant a les diferències relacionades amb el seu comportament escumant. Martínez-Rodríguez *et al.* (2000) comproven, en relació a l'alliberament de compostos nitrogenats durant l'autolisi de llevats en un vi model, que es dona un enriquiment en polipeptids, els quals es degraden amb el temps, i de manera successiva, en pèptids i aminoàcids per l'acció de diferents enzims. Els diferents canvis que es donen en la concentració dels anteriors compostos durant l'elaboració i la cria dels caves ha estat estudiada per diferents autors (Suárez *et al.*, 1979; Charpentier *et al.*, 1993; Moreno-Arribas *et al.*, 1996b, 1998).

Pel que fa a l'anàlisi multivariant i altres tècniques estadístiques per a establir relacions entre la composició química i les característiques escumants, López-Barajas *et al.* (1997), han estudiat el cas dels mostos procedents de les mateixes varietats blanques anteriors. Veuen que les característiques de l'escuma, mesurades amb el Mosalux, depenen tant de la varietat de raïm com de la collita considerada, en funció del grau de maduració i dels distints paràmetres relacionats: concentració total de sucres, pH, acidesa total, concentració de proteïnes, polifenols totals, fenols flavonoides i no flavonoides, fructosa i glucosa.

Amb la intenció de donar una explicació dels resultats, aquests autors estableixen, a més, relacions entre el valor dels paràmetres escumants i les mesures de tensió superficial. S'observa una relació positiva entre l'escumabilitat (HM) i el coeficient de Bikerman, és a dir, la "vida" de les bombolles. En canvi, les mesures de tensió superficial es correlacionen negativament amb l'escumabilitat (el baix valor del coeficient de correlació no permet, però, establir una relació inequívoca). La concentració de SO₂ i l'acidesa total estan també relacionats negativament amb l'escumabilitat. L'explicació podria trobar-se en el fet que el SO₂ actua com a agent desnaturalitzant de les proteïnes (Maujean *et al.*, 1990), mentre que el grau d'acidesa en modifica la solubilitat (Brissonet *et al.*, 1993). Podran alterar, per tant, l'adsorció de les proteïnes a la interfase líquida de les bombolles i la seva capacitat d'estabilització, el que es traduirà en un canvi en el comportament escumant general. El

SO₂, sobretot, però també l'àcid tartàric, s'utilitzen com a additius en el tractament del raïm durant la verema, de manera que la qualitat de l'escuma està lligada a les diferents pràctiques enològiques tant sobre el raïm, com després en el vi (López-Barajas *et al.*, 1998).

Pueyo *et al.* (1995) han estudiat la relació entre la composició química i les característiques escumants de vins i caves. D'un total de 73 variables analitzades, els compostos en els que la concentració es correlaciona millor de cara a la predicció de l'alçada estable de l'escuma en els vins són: l'àcid tartàric i la glucosa (correlacionats positivament) i la concentració de proteïna, (correlació negativa). D'entre els diferents àcids grassos determinats, només el contingut en àcids linolènic i undecanoic es correlaciona bé amb l'estabilitat de l'escuma. En els caves, els compostos amb un efecte més relevant en l'estabilitat de l'escuma són: la concentració total de SO₂, l'isobutanol i l'acidesa total (correlació negativa), i la γ -butirolactona, el contingut en xilosa en els polisacàrids i la concentració de proteïna (correlacions positives). Els àcids palmític, oleic i esteàric i la concentració de 1-hexanol es correlacionen positivament amb l'alçada d'escuma.

En un altre estudi estadístic realitzat amb 44 vins varietals (macabeu, xarel·lo i parellada), Andrés-Lacueva *et al.* (1996) utilitzen el Mosalux per a la mesura de les propietats escumants. Els valors dels coeficients de correlació trobats són bastant baixos, pel que només tenen en compte el seu signe (positiu o negatiu). Entre els resultats més relevants, veuen que HM es correlaciona positivament amb l'acidesa total, l'àcid màlic, la fructosa i la glutamina, a més del percentatge d'alcohol i la concentració de proteïna. En canvi, les correlacions del contingut en glucosa i àcid làctic són negatives. En quant als valors de HS, aquests es correlacionen amb els de HM, i als factors abans enumerats s'han d'afegir, a més, la prolina i l'etanolamina, que estan correlacionats positivament. Pel que fa a l'estabilitat de l'escuma, TS no es correlaciona amb HS i HM, i observen que la quantitat de proteïna, la d'aminoàcids en general, el pH, l'àcid cítric, l'àcid galacturònic, l'acetaldehid, l'acetat d'etil, el diacetal i els alcohols isoamílics presenten una correlació negativa amb els valors de TS.

Mitjançant aquests tipus d'anàlisis estadístiques s'han establert equacions matemàtiques amb l'objectiu de poder preveure el comportament escumant del most i el vi en funció dels valors dels paràmetres més usuals de control de qualitat (López-Barajas *et al.*, 1997, 1998, 1999), com ara: pH, acidesa total, acidesa volàtil, concentració d'etanol, densitat, conductivitat, concentració de sucres, SO₂ (lliure, combinat i total) i mesures d'absorbància a 280 i 420 nm. Aquests s'han relacionat amb

els valors d'escumabilitat (HM), del coeficient de Bickerman (Σ) i de tensió superficial. La disponibilitat d'una base de dades com més gran possible permet, a les diferents equacions, proporcionar un assessorament qualitatiu sobre la predicció del comportament escumant. Poden ser aplicades en distints tipus de vins, en funció del seu origen: celler elaborador, varietat de raïm, efecte de la terbolesa i la filtració, etc.

En qualsevol cas, cal anar en compte a l'hora d'interpretar i extreure conclusions a partir dels resultats obtinguts mitjançant l'establiment d'aquestes correlacions estadístiques ja que únicament es tracta d'això, de correlacions numèriques. Encara que pugui establir-se una correlació significativa entre la concentració d'un compost determinat i el comportament d'un paràmetre escumant concret, això no implica que la substància en qüestió presenti característiques surfactants i que, per tant, participi directament en les propietats de superfície a les interfases. A més, a vegades pot ser més important l'estructura mateixa del compost sobre aquestes propietats que no pas la seva concentració (Polo *et al.*, 1996).

L'efecte de la matriu pot provocar, fins i tot, que hi hagi contradiccions entre els resultats trobats per uns autors o altres (Douillard *et al.*, 1999), a més de les diferències observades, en funció de la tècnica utilitzada, per uns mateixos autors.

A manera de resum, a la taula 1 es presenten alguns dels resultats més rellevants que s'han obtingut (*) referents a la relació entre la concentració de certs compostos del most, vi o cava, o d'algunes de les seves característiques, i els paràmetres escumants mesurats:

Influència sobre l'escuma del most		
	Relació positiva	Relació negativa
H M	glucosa, fructosa, índex de maduració, proteïnes, pH, SO ₂ combinat, Abs _{280nm} , polifenols, fenols flavonoides i no flavonoides, metanol.	acidesa total, SO ₂ lliure, glicerol
HS o □	índex de maduració, glucosa	-----
TS	índex de maduració	-----
Influència sobre l'escuma del vi		
	Relació positiva	Relació negativa
H M	etanol, fructosa, acidesa total, proteïnes, glutamina, àcid màlic, SO ₂ lliure, polisacàrids (totals, àcids i neutres), àcid succínic, acetat d'etil, metanol	glucosa, àcid làctic, àcid cítric, acidesa volàtil, glicerol, alcohol isobutílic, alcohols isoamílics
HS o □	etanol, glucosa, fructosa, àcid tartàric, àcid màlic, àcid làctic, SO ₂ lliure, Abs _{280nm} , prolina, etanolamina, metanol, àcid palmitoleic	proteïnes
TS	àcid làctic, àcid undecanoic, àcid linolènic	proteïnes, aminoàcids, pH, SO ₂ lliure, acidesa total, àcid màlic, àcid cítric, àcid galacturònic, polisacàrids totals, fenols no flavonoides, acetaldehid, acetat d'etil, diacetal, alcohols isoamílics, Abs _{520nm} .
Influència sobre l'escuma del cava		
	Relació positiva	Relació negativa
H M	polisacàrids, contingut en nitrogen de les proteïnes, aminoàcids lliures	-----
HS o □	mateixos compostos que per a HM i àcid palmític, àcid oleic, àcid esteàric, 1-hexanol	-----
TS	proteïnes, □-butirolactona, contingut en xilosa dels polisacàrids	acidesa total, SO ₂ total, isobutanol

Taula 1 - Compostos i factors relacionats amb els paràmetres escumants proporcionats pel Mosalux.

(*) Pueyo *et al.*, 1995; Andres-Lacueva *et al.*, 1996; López-Barajas *et al.*, 1997, 1998, 1999; Moreno-Arribas *et al.*, 2000.

3. Influència dels factors vitícoles sobre la qualitat de l'escuma

El raïm constitueix la matèria primera per a l'elaboració del vi. La seva composició està predeterminada per tota una sèrie de factors. Entre els més importants, destaquen les característiques pròpies de la varietat vinífera, les del terreny on ha estat cultivada, la climatologia (insolació i freqüència de les pluges) i el rendiment per cep i superfície cultivada (Peynaud *et* Ribéreau-Gayon, 1971). La seva incidència es veu reflectida, sobretot, en el grau de maduració del raïm. Cal tenir en compte també les intervencions fetes per l'home, com ara el reg i l'ús de productes fertilitzants i fitosanitaris. Els atacs d'alguns microorganismes com fongs i bacteris pot alterar de forma significativa aquesta composició (Marchal *et al.*, 2001), amb efectes que són, la majoria de vegades, clarament negatius.

Tradicionalment s'ha vist que el comportament de l'escuma dels *champagnes* és diferent de la dels caves. Les regions on es produeixen un i altre presenten unes característiques globals molt diferents. Això fa pensar en la importància que poden tenir els factors edafoclimàtics sobre la composició química del raïm, la qual condicionarà les característiques del vi resultant i el conjunt de les seves propietats organolèptiques. López-Barajas *et al.* (1998) han vist, mitjançant l'establiment de correlacions estadístiques, que les característiques físico-químiques dels mostos determinen el comportament escumant dels vins resultants.

No existeixen gaires estudis que relacionin aquests paràmetres amb el comportament escumant posterior del vi. El més fàcilment determinable és l'efecte de la varietat vinífera, ja que malgrat les importants variacions que poden tenir les condicions de l'entorn d'un any a altre, aquestes afectaran per igual a les diferents varietats sembrades.

3.1. Influència de la varietat vinífera

Hi ha varietats viníferes que presenten una major concentració de proteïnes que altres (Feuillat *et al.*, 1995); en particular, algunes varietats molt aromàtiques com el muscat, el gewürztraminer o el riesling. Encara que no es disposi de dades sobre la seva capacitat escumant, el seu ús en l'elaboració de vins escumosos podria donar lloc, tal volta, a una millora de la qualitat de l'escuma, a més de la influència òbvia en l'aroma.

De les tres varietats blanques autòctones cultivades a la regió del Cava (macabeu, xarel·lo i parellada), l'experiència acumulada amb els anys ha permès

constatar que el xarel·lo és la que dona lloc a una millor escuma. Utilitzant el Mosalux, Andrés-Lacueva *et al.* (1996a) observen, en vins base per a cava, que aquesta varietat és la que presenta uns valors més elevats d'escumabilitat, i unes millors característiques escumants en general, en concordància amb l'observat per Pueyo (1994). Uns autors i altres coincideixen en que probablement sigui el major contingut proteic dels vins elaborats amb la varietat xarel·lo el que influeix de forma més significativa en les propietats escumants. Canals (1997) observa també que, d'aquestes tres varietats, el xarel·lo és la que presenta una concentració de proteïna més elevada.

La varietat blanca chardonnay, típica de la regio de Champagne, també està permesa, des de fa un cert temps, per a l'elaboració de cava. En l'estudi de les propietats escumants de mostos de les mateixes varietats blanques que en el cas anterior, incloent-hi el chardonnay, López-Barajas *et al.* (1997) observen que són els elaborats amb aquesta varietat els que presenten una millor escumabilitat. En canvi, en els vins en rama i els vins base procedents de la fermentació d'aquests mostos, l'escumabilitat varia, segons la varietat, en funció de la collita considerada (López-Barajas *et al.*, 1998). En quant als altres dos paràmetres, no s'observa cap relació entre la varietat vinífera i l'estabilitat de l'escuma o els valors dels coeficient de Bikerman. Moreno-Arribas *et al.* (2000) observen que els vins base i els caves (en diferents moments de la criaça) elaborats amb chardonnay presenten uns valors majors de l'alçada màxima i l'alçada estable de l'escuma en comparació amb els elaborats amb altres varietats blanques.

També s'ha estudiat el comportament dels cupatges de vins de diferents varietats (López-Barajas *et al.*, 1998). A més de determinar experimentalment els valors dels distints paràmetres escumants, els calculen també de forma teòrica, a partir dels valors trobats en els vins monovarietals i en funció de la proporció en que participa cada una de les varietats. De forma general, s'ha pogut comprovar que els cupatges estan en equilibri respecte dels vins monovarietals que els conformen, és a dir, els valors teòrics dels paràmetres de l'escuma són molt similars als mesurats de forma experimental. El conjunt de resultats pot ser d'utilitat per a l'elaborador de vins de cara a obtenir un bon equilibri en les seves característiques escumants.

En un estudi realitzat amb caves, es troba també que els que presenten uns valors millors de l'escumabilitat són els fets amb la varietat chardonnay (Andrés-Lacueva *et al.*, 1996b), mentre que en les altres varietats no s'observen diferències significatives. També presenta els valors més alts per a l'alçada estable de l'escuma. En canvi, és la varietat que proporciona uns temps menors d'estabilitat de l'escuma. Això fa pensar, d'acord amb l'observat per Maujean *et al.* (1990), que els compostos implicats en un o

altre fenomen no tenen per què ser els mateixos. Els valors més alts per a l'estabilitat de l'escuma corresponen a les varietats xarel·lo i parellada.

El pinot noir és una varietat negra que a la regió del Cava només està permesa, de moment, per a l'elaboració de vins escumosos rosats (i no en els "blanc de blancs"). En canvi, és la varietat majoritària a la Champagne. En el seu estudi sobre la composició proteica de diferents varietats, Canals (1997) observa que aquesta varietat té una concentració de proteïna elevada, pel que és d'esperar que presenti una bona escumabilitat. Aquesta suposició estaria d'acord amb el que tradicionalment s'ha dit: l'escuma dels *champagnes* és millor que la dels caves.

3.2. Influència del grau de maduració

El grau de maduració del raïm és un dels factors més importants de cara a la qualitat del vi (Ribéreau-Gayon, 1998a). A més, la predicció i la determinació de la data de verema solen fer-se en funció del valor de diferents paràmetres relacionats amb aquesta maduració (Maujean *et al.*, 1983).

Les característiques del most vénen donades, sobretot, pel grau de maduració del raïm i dels distints paràmetres relacionats: concentració de sucres, acidesa total i pH, a més de la concentració d'altres substàncies com proteïnes, polisacàrids i polifenols. López-Barajas *et al.* (1997) han comprovat que el comportament de l'escuma dels mostos depèn de la collita considerada, en funció, precisament, de les pròpies característiques. Utilitzen el valor donat per l'índex de maduració, definit aquest com el quocient entre la concentració de sucres i l'acidesa total expressada en grams per litre d'àcid tartàric. Segons els resultats experimentals, els mostos amb un índex de maduració comprès entre 4 i 5,5 són els que presenten una millor qualitat de l'escuma.

3.3. Altres factors vitícoles a tenir en compte

És molt important conèixer les característiques climàtiques, edàfiques i geomorfològiques de l'àrea que es vol cultivar per tal de maximitzar el potencial enològic tant de les parcel·les com de les varietats cultivades (Herreo *et al.*, 2000). Les condicions climàtiques com la insolació i la pluviometria, així com les característiques del sòl, influiran en el grau de maduració del raïm i en la qualitat de la verema.

La concentració d'alguns dels compostos relacionats amb les propietats escumants, com el cas de les proteïnes, pot ser diferent d'una collita a una altra, tant pel que fa a la concentració com a la seva distribució (Paetzold *et al.*, 1990). Segons Maujean *et al.* (1983), la temperatura és el paràmetre que presenta una major influència en l'acumulació de sucres.

S'ha constatat que la productivitat de la vinya influeix de forma clara en la concentració de determinats compostos. Pel que fa a les proteïnes, quant més petita sigui la producció per cep, major serà la concentració proteica del most (Feuillat *et al.*, 1995).

En quant als tractaments efectuats en la vinya, l'ús de fertilitzants potàssics, per exemple, té un efecte sobre la distribució de certs cations i àcids orgànics en les distintes parts del gra de raïm i en l'acidesa del vi resultant (Soyer *et al.*, 1995).

El raïm, a la vinya, pot ser atacat per distints microorganismes, com ara fongs i bacteris. Un cas especialment interessant, per la seva incidència a distints nivells és la podridura, és a dir, la infecció pel fong *Botrytis cinerea*. La seva presència provoca canvis notables en la composició química del most i el vi per acció de diferents activitats enzimàtiques i proteolítiques junt amb l'alliberament extracel·lular de D-glucans i de la lacasa (Donèche, 1993). Col·loquialment es parla de raïm o de verema botrititzada. Les conseqüències d'un atac per botrytis són varies: un ralentiment de la fermentació alcohòlica, una menor filtrabilitat del vi, l'apreciació de diferències olfactivas i gustatives, etc. En els vins escumosos s'observa freqüentment l'absència d'un collar de bombolles a la superfície (Bocquet *et al.*, 1995).

En quant a l'efecte sobre el comportament de l'escuma, Marchal *et al.* (2001) utilitzen un equip que permet mesurar les alçades de l'escuma i de líquid quant el vi s'està abocant de manera automatitzada dins la copa. Observen com la velocitat a la que l'alçada de líquid augmenta depèn fortament del grau d'infecció del raïm, mentre que per a l'escuma no es veuen diferències significatives. A més, el temps de detecció de l'aparició de líquid és menor quan el vi està infectat. En les condicions establertes, disminueixen també els temps d'emplenat de la copa i l'alçada de l'escuma després d'emplenar-la, mesurada aquesta quan ha passat un temps fixat. Amb el Mosalux es veu que l'escumabilitat és menor comparada amb els vins procedents d'una verema sana. Tot i les grans diferències observades en el comportament de l'escuma, el contingut proteic del vi gairebé no varia amb el grau d'infecció del raïm, si bé cal dir que les concentracions detectades són molt baixes.

Així, doncs, existeixen tot un conjunt de factors que poden alterar la qualitat del raïm. Els estudis que els relacionen amb les propietats escumants no són gaire nombrosos, però el fet de tractar-se de la matèria primera per a l'elaboració del vi, fa que, sense cap dubte la seva influència sigui molt important.

4. Influència de la metodologia d'elaboració del vi base sobre la qualitat de l'escuma

Les dues regions principals d'elaboració de vins escumosos a nivell mundial són la de Champagne i la del Cava. Tot i que en les dues zones l'elaboració es fa majoritàriament seguint el mateix sistema (anomenat mètode *champenoise* a França, i mètode tradicional a la Regió del Cava), les similituds es donen principalment a nivell de la fermentació en botella i de la manipulació d'aquestes. Pel que fa a l'obtenció del vi base, existeixen diferències considerables entre un i altre lloc, començant ja per les varietats de raïm utilitzades.

Com s'ha vist fins ara, les característiques escumants d'un most, un vi o un vi escumós depenen de la seva composició química respectiva. A més, les diferents partícules sòlides presents en suspensió en el vi poden tenir també un efecte sobre l'escuma i l'efervescència (Senée *et al.*, 1998). Per tot això, la metodologia d'elaboració del vi està estretament lligada al seu comportament escumant, ja que les nombroses i variades intervencions sobre el raïm, el most i el vi alteraran d'una manera o altra, i de forma més o menys important, la seva composició global.

A la figura 15 es mostra de forma esquemàtica el procés d'elaboració d'un vi base. A continuació es consideraran alguns dels processos més representatius d'aquesta metodologia, centrada, sobretot, en l'elaboració de vins escumosos.

4.1. Obtenció del most

En el sistema de vinificació en blanc, l'extracció del most a partir del raïm es fa mitjançant l'operació de premsat. Aquest pot fer-se de forma directa a partir dels raïms sencers, o bé després d'un trepitjat i/o derrapat de la verema.

El trepitjat consisteix en trencar mecànicament les pells dels grans de raïm amb l'objectiu d'alliberar-ne la polpa (Peynaud, 1996). Ha de ser suficientment intens com per facilitar la separació del suc, però sense desgarrar ni dilacerar les parts sòlides. En la verema mecànica (prohibida a la regió de Champagne, però cada vegada més usual a la del Cava), com que les rapes queden al cep, hi ha ja des del primer moment un alliberament de most a causa del trencament de la pell del gra (per la part que l'uneix a la rapa), afavorit, a més, pel fet que el raïm és aixafat com a conseqüència del propi pes.

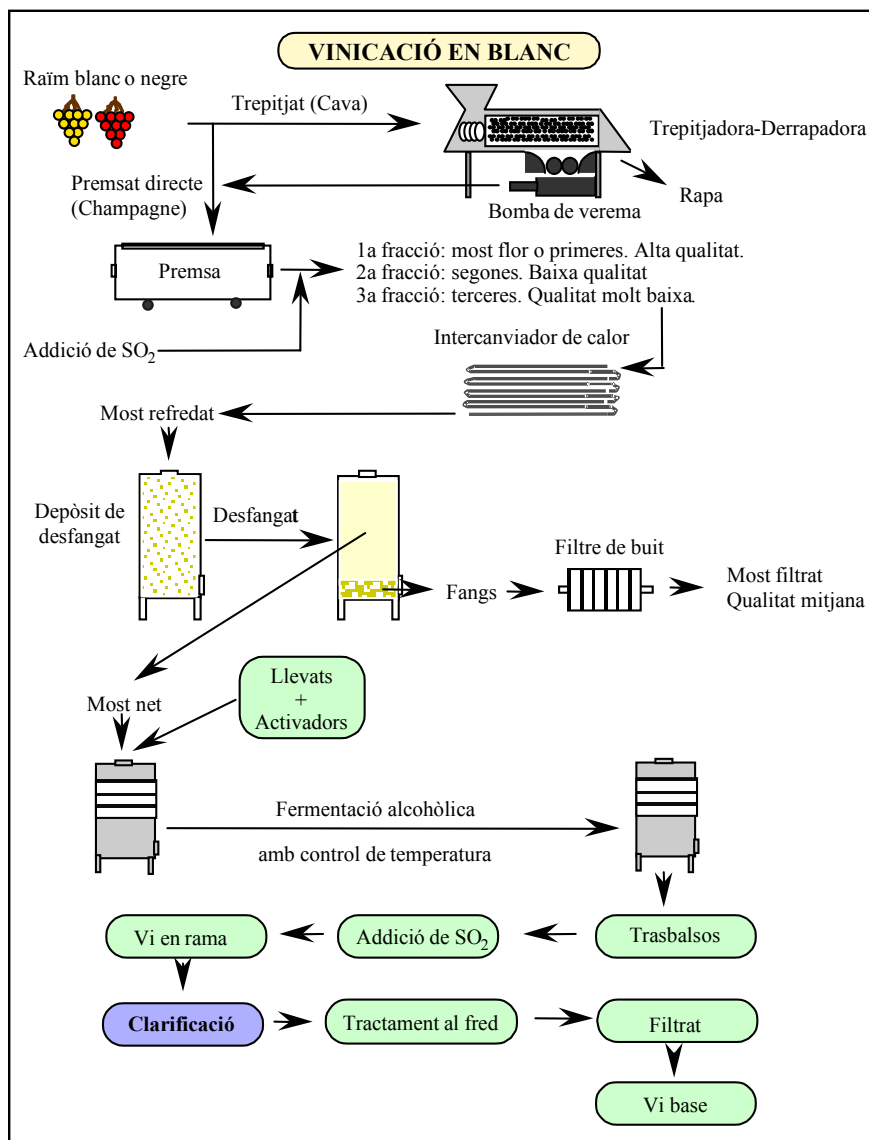


Figura 15 - Esquema de vinificació en blanc per a l'elaboració d'un vi base

A la regió de la Champagne, el fet d'utilitzar varietats negres en l'elaboració d'escumosos, fa que el trepitjat del raïm sigui una pràctica prohibida; la maceració que inevitablement es dona provocaria un augment de la intensitat del color del most, amb un impacte visual acusat. En canvi, a la regió del Cava, a part de ser cada vegada més elevat el percentatge de verema recollida de forma mecànica, el trepitjat és una operació corrent ja que les varietats de raïm utilitzades són, de forma gairebé exclusiva, blanques.

La realització del trepitjat permet treballar amb una major comoditat en el moment d'emplenar les premses i aprofitar al màxim la seva capacitat: la quantitat de most que s'escola abans de començar el premsat és més gran que en el cas d'introduir els raïms sencers directament. D'altra banda, però, la presència de la rapa dins la premsa, afavoreix el drenatge del most escorregut, i per aquest motiu normalment no

s'acostuma a realitzar el derrapat. En el cas de la verema mecànica, el fet de no haver-hi les rapes condiciona el premsat, i per això a vegades s'afegeix algun tipus de suport dins la premsa per tal d'afavorir un escolat més ràpid.

En quant a l'efecte sobre la qualitat del most, després del premsat aquest presentarà una terbolesa més gran si es fa un trepitjat previ del raïm, i el volum de fangs serà superior. Els fangs es trobaran, principalment, a la fracció de most escolat abans de començar el premsat. S'ha comprovat, però, que la presència de les rapes durant el premsat limita la concentració de proteïnes termo-inestables responsables del trencament proteic en els vins blancs (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998), per combinació d'aquestes amb els polifenols, principalment els tanins, de la rapa. Això es traduirà posteriorment en l'ús d'una dosi inferior de bentonita per a eliminar-les.

La funció del premsat és permetre l'extracció del most mitjançant l'exercici de pressió sobre el raïm. Tant en el trepitjat com en el premsat s'ha d'evitar l'extracció d'altres líquids vegetals, ja que part de les substàncies que els componen (polifenols, oxidases, sals inorgàniques, tanins...) poden provocar un malbaratament del conjunt de característiques organolèptiques. A més de conferir al most sabors herbacis, astringents i grossers, n'acceleren l'envelliment i disminueixen la capacitat escumant dels vins resultants (Hardy, 1992). Concretament, una pressió o un trepitjat massa intensos afavoreix l'extracció de compostos fenòlics de les parts sòlides del raïm, fet que pot resultar negatiu per a l'escuma ja que la seva reacció amb les proteïnes presents en el most pot provocar-ne l'eliminació per precipitació.

Existeixen distints tipus de premses (verticals, horitzontals, de plats, pneumàtiques, contínues, etc). El més important, però, és l'ús que se'n fa i les possibilitats de fraccionament del most que ofereixin: la qualitat d'una premsa pot jutjar-se en funció de la composició del most obtingut, la qual vé determinada pel grau de maceració que comporti.

A la regió de la Champagne, és habitual que el premsat es faci amb cicles escalonats de pressió, amb un augment progressiu de la seva intensitat a cada nou cicle. També es realitza un fraccionament del most al llarg dels diferents cicles. Utilitzant el Mosalux, s'ha observat que l'escumabilitat de la fracció procedent dels primers hectolitres de most escorregut (5% v:m, aproximadament) és molt petita, gairebé nul·la (Poinsaut, 1991). El màxim, per contra, s'observa al final del primer cicle de premsat. Al final de cada un dels cicles posteriors s'observa també un valor màxim per a l'escumabilitat, però clarament més baix en comparació amb el primer cicle. Els valors

mesurats pels altres dos paràmetres, HS i estabilitat de l'escuma (TS), segueixen la mateixa tendència. En tots els casos, el most que s'escola a l'inici de cada cicle és el que dona lloc als valors més baixos dels paràmetres escumants, i al llarg del procés de premsat s'observa una disminució progressiva de tots ells. Amb això es conclou que, a més de substàncies favorables per a l'escuma, el most conté substàncies amb propietats antiescumants. És possible, però, extreure-les de forma separada amb un fraccionament adequat durant el premsat sempre i quant el raïm no s'hagi malmès durant la verema.

Es veu, per tant, que les tècniques i els procediments enològics utilitzats en l'extracció del most influiran en la concentració de certes substàncies i en l'efecte que aquestes poden tenir sobre les propietats d'algunes altres. Hi ha, doncs, una estreta relació amb l'efecte sobre les característiques escumants.

4.2. Eliminació de fangs

El most, acabat d'extreure, té un aspecte tèrbol. Conté en suspensió diferents tipus de partícules: terra, fragments de pells de raïm i de rapa, restes cel·lulars procedents de la polpa del raïm, residus insolubles de productes de tractament de la vinya, etc (Flanzy, 1998). La seva eliminació es realitza en el procés de desfangat.

El desfangat és una operació per a disminuir la maceració, abans de la fermentació, mitjançant una certa clarificació del most. Pot fer-se de forma estàtica (per simple sedimentació, facilitada o no mitjançant l'ús de diferents additius), o bé de forma mecànica per filtració al buit, centrifugació o per flotació.

La quantitat de fangs, i la seva velocitat de sedimentació, en cas d'un desfangat estàtic, depenen de la varietat de raïm, de la seva maduresa i estat sanitari i, sobretot dels tractaments previs realitzats sobre el raïm: trepitjat, derrapat, escorregut i premsat (Peynaud, 1996). En quant a la composició química dels fangs, es considera que estan formats principalment per polisacàrids insolubles (cel·lulosa, hemicel·lulosa i substàncies pèctiques) i una petita quantitat de compostos nitrogenats, sobretot proteïnes insolubles (Alexandre *et al.*, 1994). Contenen, a més, sals minerals i una presència remarcable de lípids procedents de les membranes cel·lulars, amb una major proporció d'àcids grassos insaturats respecte dels saturats, principalment els àcids linoleic, palmític i oleic (Ribéreau-Gayon, 1998).

La incidència del desfangat sobre les característiques organolèptiques del vi és important: millora aromàtica i gustativa (Lavigne, 1996), major estabilitat del color, millor apreciació de les característiques varietals del raïm, etc. S'ha de tenir en compte, però, que amb els fangs s'elimina una part dels llevats presents de forma natural en el most, a més d'alguns nutrients necessaris per a aquests. Per aquest motiu, la intensitat del desfangat pot provocar que es retrassi l'inici de la fermentació i que la seva cinètica sigui més lenta (Flanzy, 1998). Un desfangat massa intens podria ser, fins i tot, la causa d'una aturada de fermentació. La inoculació externa de llevats i de suplementos nutricionals minimitza aquests problemes potencials.

Encara que no es disposi de dades sobre la incidència directa en les propietats escumants, no és difícil suposar que aquestes es veuran afectades pel resultat de la composició química global que es tindrà en funció de la intensitat del desfangat.

4.3. La fermentació alcohòlica

La fermentació alcohòlica és la transformació del most de raïm en vi. Consisteix en la transformació, per part dels llevats, dels sucres presents en el most i la producció d'etanol i CO₂, com a productes principals. Altres productes secundaris són el glicerol, l'àcid acètic i l'àcid succínic, a més de tota una sèrie de compostos presents en concentracions menors: àcid làctic, àcid pirúvic, 2,3-butanodiol, alcohols superiors, etc (Fleet, 1994). Hi ha, doncs, un canvi radical en la composició química inicial, que influirà de forma molt significativa en el conjunt de característiques organolèptiques del vi. L'efecte de l'etanol, com a principal producte de la fermentació, sobre els altres compostos, i la influència en les propietats escumants del vi, ja ha estat comentada anteriorment.

L'activitat dels llevats està condicionada per diferents factors: temperatura a la que es realitza la fermentació, disponibilitat d'oxigen per a que puguin multiplicar-se, i requeriments nutricionals, especialment pel que fa referència als compostos nitrogenats. La presència de certes substàncies en el medi estracel·lular, produïdes fins i tot pels propis llevats, poden tenir un efecte inhibidor de la seva activitat.

La fermentació pot tenir lloc de forma espontània, a partir dels llevats presents de forma natural en el raïm, o bé es pot procedir a una inoculació externa amb llevats aïllats prèviament. El tipus de llevat utilitzat i les seves característiques condicionaran el conjunt de propietats organolèptiques del vi resultant, en funció dels canvis realitzats en

la composició química del most. La selecció de la soca de llevat s'ha fet, normalment, a partir de les observacions empíriques de la seva incidència en el vi. No obstant, avui en dia, tot i ser una tècnica molt recent, és possible la modificació genètica de llevats per tal de que aquests expressin una o varies característiques determinades (Blondin, 2001).

Els llevats que porten a terme la fermentació alcohòlica pertanyen, principalment, al gènere *Saccharomyces*. S'ha vist que llevats d'altres gèneres presents en el raïm i en la fermentació del most ténen activitat proteolítica, podent-ne reduir la concentració de proteïnes fins a un terç (Dizy *et Bisson*, 2000). La porositat i la composició de la paret cel·lular dels llevats influeix en l'alliberament de macromolècules al medi extracel·lular. Particularment, Boivin *et al.* (1998) han vist que una menor terbolesa del most es tradueix en una menor glicosilació de les manoproteïnes de la paret cel·lular dels llevats. Per tant, la seva concentració en el vi, com a conseqüència de la degradació (autòlisi) de la paret del llevat, també serà menor.

Per fet que el vi, una vegada acabada la fermentació, té un aspecte tèrbol i presenta riscos de desestabilització, es realitzen tota una sèrie d'intervencions per tal de millorar-ne l'aspecte i prevenir alteracions posteriors, tot incidint en la seva composició química. Per aquest motiu, no hi ha gaires estudis sobre les propietats escumants del vi acabat de fermentar i la seva relació amb els paràmetres fisicoquímics del most del que procedeixen. En un estudi en el que és comparen les propietats escumants de diferents mostos amb les dels vins en rama (sense clarificar) resultants (López-Barajas *et al.*, 1998), s'observa que algunes de les característiques dels mostos defineixen el comportament escumant dels vins resultants. No obstant, els valors dels paràmetres escumants obtinguts amb el Mosalux no permeten establir cap relació directa entre uns i altres. L'explicació es dona en base a la varietat de l'estructura química dels compostos presents tant en el most com en el vi, i el conjunt d'equilibris existents entre els distints paràmetres fisicoquímics que intervenen durant la fermentació.

4.4. La fermentació malolàctica

La fermentació malolàctica és la transformació de l'àcid màlic del vi en àcid làctic i desprendiment de CO₂. La realitzen les bacteries làctiques, i normalment es dona després de la fermentació alcohòlica. Per les pròpies característiques del dos àcids implicats, aquesta fermentació provoca una desacidificació natural del vi.

Els vins escumosos com el cava i el *champagne* han de presentar una certa acidesa per tal d'assegurar-ne la frescura i el manteniment d'aquesta durant l'envelliment. A més de la disminució de l'acidesa per la fermentació malolàctica, s'ha de tenir en compte el fet que el mètode d'elaboració d'aquests vins inclou algunes dilucions (addició dels licors de tiratge i d'expedició) que per sí mateixes suposen una disminució de l'acidesa. Es tracta, per tant, d'un paràmetre que cal tenir en compte per a l'obtenció d'un producte de qualitat.

En funció de l'acidesa i les característiques inicials del vi base que s'utilitzarà per a l'obtenció del vi escumós, és decisió de l'elaborador que la fermentació malolàctica es doni o no. A la regió de Champagne els vins solen presentar una acidesa elevada, pel que normalment es prefereix portar-la a terme, de forma ben controlada. En canvi, a la regió del Cava, com a conseqüència d'unes diferents condicions de maduració del raïm, els vins base són poc àcids i normalment es recorre a algun sistema d'inhibició d'aquesta fermentació (ús de SO₂ o de lisozima). En aquesta regió, fins i tot és una pràctica freqüent la correcció de l'acidesa, augmentant-la per addició d'àcid tartàric o àcid cítric al most o al vi.

En qualsevol cas, però, s'ha d'evitar que la fermentació malolàctica es doni dins la botella, durant la segona fermentació alcohòlica, o després, durant l'envelliment en contacte amb els llevats. Això implicaria serioses dificultats al moment d'efectuar els remoguts, alteracions del sabor amb l'aparició de notes làctiques, augment de l'acidesa volàtil, sobrepressions, i, ocasionalment, una aturada de la fermentació alcohòlica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1988; Hardy, 1992b). Es tracta, òbviament, de problemes greus.

Per evitar que aquesta fermentació es doni, tradicionalment s'ha recorregut a l'ús de SO₂ gràcies al seu conegut efecte inhibitor tant sobre els llevats com sobre les bacteries (Blouin, 1997). A causa dels problemes colaterals que comporta, s'ha intentat limitar-ne l'ús. Amb els avenços tècnics recents es pot realitzar una filtració esterilitzant del vi (aquest, però, resulta empobrit en altres substàncies). Des de fa uns anys es parla de la utilització de la lisozima, per ser també un agent inhibitor dels microorganismes (Gerbaux *et al.*, 1997). El seu efecte sobre les propietats escumants del vi ha estat estudiat recentment per Marchal *et al.* (2002). S'observa clarament un efecte protector quan és afegida abans de realitzar un tractament desproteïntzant amb bentonita. Hi ha una recuperació de l'escumabilitat, comparat amb el cas d'ús exclusiu de bentonita, fins i tot per a dosis elevades d'aquesta, el que sembla indicar que la lisozima presenta també un efecte protector de cara a les proteïnes del vi.

La relació de concentracions entre àcid màlic i àcid làctic i el seu efecte sobre les característiques escumants del vi ha estat posada de manifest a partir de correlacions estadístiques. Andrés-Lacueva *et al.* (1996) troben que HM es correlaciona positivament amb la concentració d'àcid màlic i amb l'acidesa total. En canvi, la presència d'àcid làctic es relaciona amb una menor escumabilitat. Aquest resultat concorda amb els de López-Barajas *et al.* (1998), que observen que l'increment de la concentració d'àcid làctic es relaciona negativament amb l'escumabilitat; en canvi, però, ho fa de forma positiva amb el temps d'estabilitat de l'escuma.

4.5. Les clarificacions

El sistema de vinificació en blanc (que és el seguit en l'elaboració de vins escumosos) exigeix, per a l'obtenció d'un producte de qualitat, que el vi sigui completament límpid i brillant; per tant, cal prevenir qualsevol risc d'enterboliment. En la pràctica habitual, aquesta limpidesa s'aconsegueix mitjançant l'addició controlada de diferents productes al vi, tal i com es veurà tot seguit.

La clarificació d'un most o un vi es defineix com l'addició, en ells, d'unes determinades substàncies amb capacitat per flocular i sedimentar, arrastrant, a la vegada, les partícules que es troben en suspensió (Caillet, 1994). L'addició d'aquests productes, a més de l'acció clarificant, pot tenir també un efecte estabilitzant i suposar, fins i tot, una millora a nivell organolèptic. Per aquest motiu, la clarificació ha de tenir present dos aspectes molt importants: d'una banda el seu rendiment, i d'una altra, l'eficàcia en l'obtenció d'una bona limpidesa i un respecte de les qualitats organolèptiques. L'addició de productes de clarificació, a més d'eliminar substàncies, també pot provocar que part dels compostos afegits quedin en dissolució en el vi, alterant-ne, per tant, la composició i les característiques. La presència en el vi dels anomenats col·loides protectors (glucans, pectines i altres polisacàrids) dificulta l'acció del clarificant ja que s'oposen al procés de contacte entre aquest i les substàncies que es volen eliminar.

En la indústria enològica existeixen diferents tipus de clarificants. Solen classificar-se, normalment, en funció de si el seu origen és orgànic o mineral. A la taula 2 es mostra un llistat dels principals clarificants utilitzats en vinificació en blanc, a més de les dosis habituals en funció de si s'utilitzen en el most, en el vi o durant el tiratge, en l'elaboració d'escumosos.

Clarificants inorgànics	Ús habitual	Dosi (g/hL)
Bentonita	desfangat fermentació clarificació adjuvant de tiratge	20 – 50 10 – 50 20 – 150 2 – 4
Carbó enològic	desfangat fermentació clarificació	10–200 (decoloració) 5 – 20 10 – 100
PVPP	clarificació	20–30 (decoloració)
Gel de sílice	desfangat clarificació	50 – 100 5 – 50

Clarificants proteics	Ús habitual	Dosi (g/hL)
Gelatina	desfangat clarificació	5 – 15 1 – 5
Cola de Peix	clarificació	1 – 3
Caseïna	clarificació	10 – 50
Proteïnes Vegetals	clarificació	2 – 5
Altres clarificants orgànics	Ús habitual	Dosi (g/hL)
Taní enològic	clarificació	0.5 – 4
Alginats	clarificació adjuvant tiratge	4 – 8 0.5 – 2

Combinacions	Ús habitual	Dosi (g/hL)
Bentocaseïna	desfangat fermentació	100 – 150 20 – 100
Bentonita - Alginats	adjuvant tiratge	1 – 3

Taula 2 - Principals clarificants i adjuvants de clarificació usats en enologia

El comportament i la forma d'acció de cada un d'ells pot ser molt diferent, i per la importància que ténen en els objectius d'aquest treball, a continuació se'n fa una descripció detallada.

4.5.1. Les gelatines

Les gelatines són uns dels clarificants orgànics més utilitzats en l'actualitat. Segons el Codex Enològic Internacional, la gelatina és el producte de la hidròlisi més o menys intensa del col·lagen procedent de la pell, el teixit conjuntiu i els ossos dels animals. Com que el col·lagen està format per un grup heterogeni de proteïnes, les gelatines són també, en realitat, un conjunt de proteïnes. Estan constituïdes, sobretot, per glicina, prolina, hidroxiprolina i àcid glutàmic (Ribereau-Gayon *et al.*, 1998).

Al mercat, les gelatines poden trobar-se en forma líquida, granulada, en forma de fulles o de pols. La seva classificació sol fer-se en funció del tractament seguit en la preparació. Així, les gelatines sòlides poden ser solubles en fred o en calent, depenent

del grau d'hidròlisi que presenten, la qual pot fer-se mitjançant un tractament àcid a temperatura elevada, o bé per via enzimàtica. Les gelatines líquides i les presentades en forma de pols solubles en fred no contenen proteïnes d'alta massa molecular, mentre que les altres, només solubles en calent, sí ($M > 10^5$ Da).

Les gelatines destinades a un ús enològic solen ser d'origen boví o porcí, i són gelatines que presenten diferents graus d'hidròlisi, el que condicionarà tant les seves propietats com l'èxit de la clarificació (Marchal *et al.*, 1993). La variació i repartició de les diferents masses moleculars de les proteïnes constitutives, així com la seva càrrega, són les característiques que permeten explicar la seva acció en el vi. S'ha de tenir en compte també que una bona clarificació depèn del grau de polimerització de les molècules amb les que flocularà, principalment tanins (Caillet, 1994).

El comportament de la floculació i de la sedimentació està relacionat amb el grau d'hidròlisi de la següent manera: una gelatina poc hidrolitzada reacciona ràpidament donant lloc a la formació de complexos taní-gelatina voluminosos i estables. Aquests grans floculs sedimenten ràpidament, pel que la seva capacitat per eliminar altres substàncies en suspensió és petita. La limpidesa, per tant, pot no ser satisfactòria. És suficient una petita quantitat de tanins per a que es doni la floculació.

En canvi, una gelatina molt hidrolitzada permet eliminar una major quantitat de col·loides totals: la seva menor massa molecular fa que la sedimentació sigui més lenta i, per tant, el temps de contacte és major. D'altra banda, però, les curtes cadenes de proteïnes i pèptids podrien quedar en solució, en el vi, en forma de complexos tanins-proteïnes, els quals són susceptibles de precipitar més tard i donar lloc a enterboliments dins la botella. Això es coneix amb el nom de sobreencolat i té un efecte clarament negatiu en l'apreciació del vi per part del consumidor. Es veu, doncs, la necessitat de controlar el grau d'hidròlisi de la gelatina per tal que l'eficàcia de la clarificació sigui òptima, amb una minimització dels problemes colaterals.

En vins blancs, per evitar els problemes de sobreencolat, la gelatina sol utilitzar-se en combinació amb taní enològic, bentonita o gel de sílice. Aquests productes permeten l'eliminació de la gelatina en solució per reacció amb ella o per arrastrament durant la sedimentació. La combinació de gelatina i bentonita és molt utilitzada en l'elaboració de vins escumosos, ja que a més d'evitar els problemes de sobreencolat, s'ha vist que és més respectuosa amb la composició proteica del vi (Vanrell *et al.*, 2001). Això es tradueix en una millora de les propietats escumants, en comparació amb l'ús exclusiu de bentonita.

Marchal *et al.* (1993) observen, amb el Mosalux, que el comportament escumant d'un vi resulta significativament millorat amb l'ús combinat de gelatina amb gel de sílice o taní enològic com a adjuvants de clarificació, independentment del grau d'hidròlisi de la gelatina. La interpretació dels resultats no és fàcil ja que no s'ha vist una variació significativa de la concentració de substàncies que, en principi, són favorables per a l'escuma. No obstant, l'ús dels adjuvants modifica la concentració de compostos macromoleculars en solució (gelatina no floculada, proteïnes, polisacàrids, i polifenols endògens), els quals sí que intervenen de forma significativa en l'expressió de les característiques escumants del vi. No és possible preveure, però, la importància relativa de cada un d'ells a causa de les nombroses interaccions existents (efecte de la matriu).

4.5.2. La cola de peix

La cola de peix és un clarificant de naturalesa proteica utilitzat principalment en vins blancs (Caillet, 1994). Es prepara a partir del col·lagen procedent de la bufeta natatòria de diferents peixos. El que el diferencia de la gelatina és, sobretot, que pot utilitzar-se tal i com es troba a la natura, no cal hidrolitzar-la, i només se'n modifica la presentació. L'estructura terciària de les proteïnes que la constitueixen es manté intacta, no es degrada. La seva massa molecular és elevada, al voltant de 150 kDa, el que fa que siguin suficientment pesada com per a que sedimenti per ella mateixa. No dona, per tant, problemes de sobreencolat.

La cola de peix s'utilitza en concentracions al 1% de proteïnes pures. És convenient preparar-la en fred ja que a temperatures elevades podria hidrolitzar-se donant lloc a un producte de característiques semblants a les de la gelatina. Per evitar possibles degradacions, es recomana també no tardar en utilitzar-la una vegada preparada la solució.

Una de les seves propietats més destacada és que no necessita de l'addició de tanins per a flocular, encara que a vegades poden quedar alguns dels flòculs més lleugers en suspensió (Paetzold, 1991). Per evitar-ho, és suficient addicionar una petita dosi de taní. La floculació és lenta, però resisteix bé l'efecte col·loide-protector d'alguns polisacàrids en suspensió. A més, les dosis necessàries no són elevades i el vi apareix més brillant. La seva utilització ha estat una mica desplaçada en profit de l'ús combinat de gelatina i bentonita, que dona lloc a una sedimentació més ràpida. De totes maneres, si la cola de peix també pot utilitzar-se conjuntament amb bentonita, i la rapidesa de sedimentació en resulta afavorida.

4.5.3. La caseïna

La caseïna és una proteïna que s'obté per coagulació de la llet descremada (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998) i i en el mercat es presenta en forma de pols de caseïnat potàsic, soluble en aigua. És un clarificant especialment indicat en vins blancs ja que intervé tant sobre el color com el sabor, fent que el vi aparegui com a «més fresc». L'acidesa del medi és un factor decisiu de cara a la desnaturalització i coagulació de la caseïna, i al pH del vi és immediata. Té una acció preventiva i curativa dels fenòmens d'obscuriment i maderització provocats per la presència de polifenols oxidats o oxidables (Peynaud, 1996), els quals són eliminats per adsorció i posterior precipitació.

La utilització de la caseïna en clarificació és delicada però no dóna problemes de sobreencolat. De totes maneres, no es tracta d'un bon clarificant, i algunes vegades el vi presenta un aspecte tèrbol després del tractament. És per aquest motiu que normalment li segueix un tractament amb bentonita (Caillet, 1994).

L'ús de llet sencera, tot i que està prohibit als països de la Unió Europea, pot resultar eficaç en la decoloració de vins blancs que s'han obscurit massa i en l'eliminació de males olors, com ara l'olor a reduït o a floridura. El descremat de la llet disminueix la capacitat d'adsorció però augmenta el poder clarificant. Un litre de llet de vaca conté aproximadament 30 g de caseïna i de 10 a 15 g d'altres proteïnes (lactoalbúmines i lactoglobulines), les quals sí que poden donar problemes de sobreencolat quan la dosi d'utilització és massa alta (superior a 200 ~ 400 mL/hL).

4.5.4. Les proteïnes vegetals

Darrerament, però sobretot a causa dels recents casos d'encefalopatia espongiforme bovina (coneguda comunament amb el nom de malaltia de les «vaques boges»), i de la seva variant humana, els consumidors són cada vegada més reticents a l'hora d'utilitzar auxiliars tecnològics d'origen animal, especialment gelatines. Per aquest motiu, des de fa un cert temps s'han intensificat les investigacions sobre la recerca i utilització de clarificants proteics d'origen vegetal.

Les proteïnes, en general, són els constituents principals de les cèl·lules animals i vegetals, i cada una té una composició aminoacídica determinada. En el cas de les proteïnes vegetals, aquesta composició permet establir amb precisió la pertinença de la planta a un grup botànic donat (Godon, 1996). Per aquest motiu, es classifiquen en

quatre grans famílies, que coincideixen amb la seva classificació botànica: cereals, leguminoses, óleoginoses i altres. Les diferents classes de proteïnes vegetals es caracteritzen en funció del contingut proteic de l'extracte.

Per a poder-les usar en la indústria enològica és necessari modificar-ne algunes de les propietats físico-químiques originals (Lefebvre *et al.*, 2000), sobretot pel que fa a la seva solubilitat (hidròlisi a diferents temperatures o per via enzimàtica). S'han fet assajos (anàlisi de la terbolesa i del vòlum de sediments) en mostos, vins blancs, vins negres i vinagres, per tal de comparar l'efecte de diferents proteïnes vegetals (PV) amb el d'altres clarificants usats de forma habitual, especialment gelatines, i poder establir l'eficàcia de la clarificació (Maury 2001; Martínez, 2002; Lefebvre *et al.*, 2002). Els resultats mostren que l'acció d'algunes d'elles és comparable, o fins i tot millor, que en el cas de la gelatina. En vins negres, reaccionen amb els tanins presents en dissolució. Poden utilitzar-se, per tant, combinades amb aquests, i també amb clarificants minerals com la bentonita o el gel de sílice.

En quant als possibles riscos d'al·lèrgia lligats a la consumició de begudes clarificades amb proteïnes vegetals, els autors anteriors han comprovat que són inexistents ja que, a part del fet que només s'utilitzen com a auxiliar tecnològic, la recerca de possibles residus en el vi, després del tractament, n'ha confirmat la seva absència.

Marchal *et al.* (2000) han estudiat la clarificació de mostos i vins blancs amb proteïnes vegetals procedents del blat, concretament prolamines, conegudes comunment amb el nom de gluten. Es compara també l'efecte de diferents proteïnes vegetals amb el d'altres productes clarificants habituals. Observen que els diferents glutens testats presenten una gran dispersió de pesos moleculars, la qual és funció del mètode d'obtenció perquè les proteïnes nadiues són les mateixes. La seva eficàcia en la clarificació està íntimament lligada a la dosi utilitzada. En conjunt, els resultats obtinguts són prou encoratjadors com per a seguir treballant en la seva possible utilització normal en vins i l'efecte en la composició d'aquests.

Així, l'estudi sobre l'aplicabilitat tècnica i l'ús de les proteïnes vegetals en enologia és un tema d'actualitat vigent. S'ha de tenir en compte, però, que la seva utilització a nivell industrial no ha estat encara aprovada per les autoritats alimentàries.

4.5.5. Els alginats

La utilització d'alginats per a la clarificació de vins es coneix des de fa uns quaranta anys. Estan especialment indicats en l'elaboració de vins escumosos ja que faciliten el desplaçament dels pòsits originats per la segona fermentació i la criaça (llevats, adjuvants de tiratge i altres precipitats) cap al coll de la botella, operació anomenada remogut, i que seran eliminats després en el desgorjat (Hardy, 1993).

S'extreuen a partir de diferents tipus d'algues feofícies (algues marrons procedents, principalment, de les zones de l'atlàntic nord) per digestió alcalina i posterior purificació (Flanzy, 1996). Al mercat es troben en forma de sals alcalines de l'àcid alginic, sobretot la sal sòdica, encara que també pot trobar-se la forma potàssica (les dues són solubles en aigua, i donen lloc a solucions bastant viscoses). Els alginats càlcics, menys utilitzats, són molt poc solubles en aigua.

Contràriament als clarificants orgànics vists fins ara, els alginats no són de naturalesa proteica. Els utilitzats en la indústria enològica presenten una varietat de masses moleculars que van de 80 a 190 kDa, i presenten una eficàcia relativa en la clarificació del vi (Ribéreau Gayon *et al.*, 1998b). La seva flocculació es ràpida, sempre que el vi sigui suficientment àcid (pH inferior a 3,5); en canvi, però, la sedimentació sol ser lenta pel fet que els floculs són bastant lleugers. La clarificació és irregular i les substàncies minerals són poc fixades. L'addició conjunta amb gelatina n'accelera la sedimentació, obtenint una millor limpidesa. El principal interès de la utilització d'alginats és que es pot procedir a la filtració del vi poques hores després de la seva addició, el que pot suposar un estalvi important de temps.

4.5.6. El taní enològic

Els tanins no es consideren pròpiament com a clarificants, però són de gran utilitat quan s'utilitzen clarificants de naturalesa proteica, sobretot gelatines, per tal d'afavorir-ne la precipitació i prevenir els riscs de sobreencolat (Caillet, 1994).

Al mercat poden trobar-se una gran quantitat de productes comercials amb el nom genèric de taní enològic, però l'origen botànic dels distints tipus de tanins en condiona la composició química i, per tant, la seva utilitat (Vivas, 1997). Els d'ús enològic s'obtenen, principalment, a partir d'agalles provocades per les picades d'insectes en la fusta de certs arbres. També poden obtenir-se directament a partir de

fustes riques en aquests compostos (roure, castanyer) o de les llavors del raïm (Paetzold, 1991). Segons la seva composició química es parla de tanins condensats (o procianidines) i tanins hidrolitzables (gàlics i elàgics). En funció del sistema d'extracció es tenen tres tipus diferents de tanins: a l'aigua, a l'etanol i a l'éter. Els utilitzats en enologia solen ser els tanins extrets a l'éter.

Es tracta, per tant, de tota una família de compostos fenòlics amb propietats comuns, que es caracteritzen, sobretot, per la possibilitat de combinar-se amb les proteïnes (el que explica la sensació d'astringència quan reaccionen amb les proteïnes de la saliva). El seu ús pot comportar una disminució de les dosis de bentonita en la clarificació de vins blancs i rosats. Això es tradueix en un major respecte de la composició química original del vi ja que, com es veurà, la bentonita pot eliminar per adsorció inespecífica una gran quantitat de diferents substàncies.

A la regió de Champagne, la utilització de tanins sol fer-se en mostos (en el desfangat) i, a vegades, també en el tiratge. Maujean *et al.* (1990) han estudiat de forma qualitativa l'efecte de diferents dosis de taní sobre les propietats escumants d'un vi. S'observa que provoquen una lleugera disminució de l'escumabilitat, però, en canvi, l'estabilitat de l'escuma (TS) en resulta notablement incrementada (fins un 20%). L'addició d'una dosi menor de taní fa que la disminució de l'escumabilitat sigui major, però, en canvi, també és més gran el temps mesurat per a l'estabilitat de l'escuma.

4.5.7. La bentonita

La bentonita és una argila col·loidal que fou descoberta l'any 1888 a Fort Benton (Wyoming-Estats Units). Presenta la propietat d'inflar-se en contacte amb l'aigua donant lloc a un gel. El seu ús en enologia data dels anys trenta del segle passat.

Segons el Codex enològic internacional, la bentonita és un silicat d'alumini hidratat, la forma mineral del qual és, principalment, la montmorillonita. La seva estructura és laminar i està formada per capes de tetraedres en les que s'hi troba intercalada una capa d'octaedres (cada làmina té l'estructura Te-Oc-Te). Al centre dels tetraedres hi trobam els ions Si^{4+} (de vegades també ions Al^{3+}), mentre que en el centre dels octaedres hi ha els ions Al^{3+} o Mg^{2+} . A més, en un de cada tres octaedres aquests dos ions estan absents. Globalment hi ha, doncs, un dèficit de càrrega positiva el qual és compensat pel conjunt de cations intercanviables (Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , principalment) situats als espais interfoliars. En aquest espai és on es troben també les molècules d'aigua. A la figura 16 es representa esquemàticament l'estructura de la bentonita.

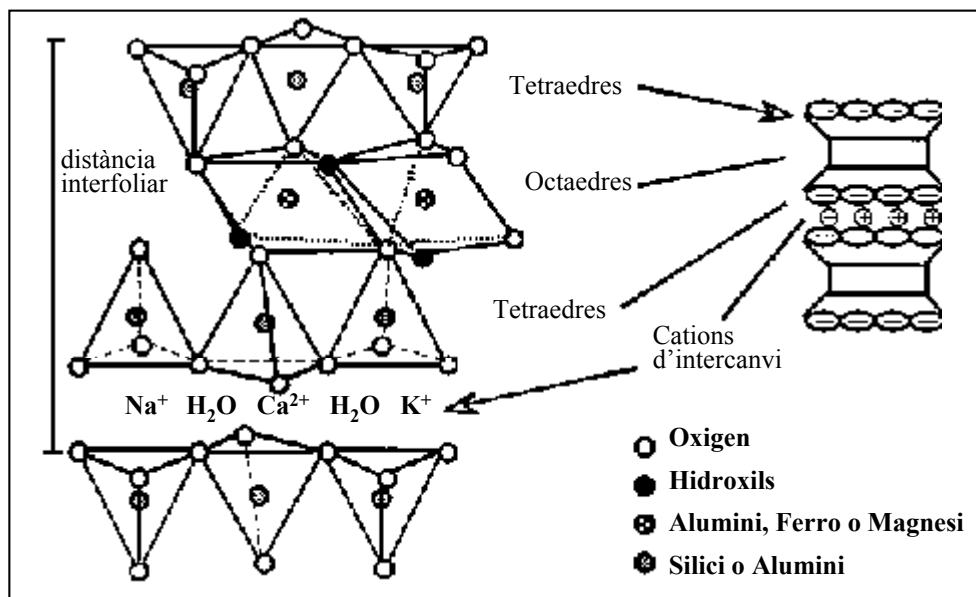


Figura 16 - Estructura de la bentonita (Canals, 1997)

Els cations intercanviables són molt importants ja que, a part del nom, conferiran unes característiques o unes altres a la bentonita, l'activitat de la qual ve donada per la seva capacitat d'intercanvi d'aquests cations (Poinsaut *et* Hardy, 1995a). Les bentonites seran sòdiques (molt reactives, amb gran capacitat d'inflament), càlciques o magnèssiques (menys reactives que les sòdiques i de menor capacitat d'inflament) en funció del catió majoritari. Com que es tracta d'ions intercanviables és possible activar aquestes últimes amb Na₂CO₃ de forma que sigui el Na⁺ el catió principal. Es parla, aleshores, de bentonites càlciques o magnèssiques activades.

Les bentonites es presenten en forma granulada o de pols. El seu color és molt variable (blanc, gris, beige, rosa, vert...) en funció de l'origen i naturalesa química de cada una. El tamany de partícula condicionarà la seva superfície específica externa (de 5 a 80 m²/g), mentre que el fet de presentar una estructura laminar permet desenvolupar una superfície específica interna molt elevada (fins a 800 m²/g).

A més de la pròpia constitució química, la capacitat d'inflament de la bentonita i el seu grau d'hydratació en condicionaran la reactivitat i comportament floculant (Marchal *et al.*, 1995). En el vi, la bentonita, carregada negativament, neutralitzarà les càrregues positives de certs col·loides, especialment proteïnes (al pH d'aquest presenten una càrrega neta positiva), a més d'altres substàncies carregades també positivament. Tot seguit, l'aglomeració de les partícules neutralitzades donarà lloc a la seva coagulació, i l'agrupament progressiu dels aglomerats en provocarà la floculació i

posterior sedimentació. S'ha vist també que l'ús de bentonita permet disminuir la concentració de diferents cations minerals com ara el coure.

En enologia, els tractaments amb bentonita poden fer-se en diferents estadis de l'elaboració del vi (Poinsaut *et* Hardy, 1995a). En mostos, durant el desfangat, en facilita la clarificació per eliminació de certs col·loides, adsorbeix la tirosinasa i elimina part dels productes fitosanitaris usats a la vinya. En vins, la seva acció principal és l'eliminació de les proteïnes responsables de certs enterboliments (trencament proteic), tot i que també té una acció clarificant, a més de facilitar la filtració, el tractament en fred i presentar una lleugera acció decolorant. Usada com a complement d'una clarificació amb gelatina, permet evitar els problemes de sobreencolat per eliminació de les partícules més lleugeres en solució. En l'elaboració de vins escumosos és un element essencial en la constitució dels adjuvants de remogut.

La bentonita no fa cap tipus de discriminació en l'eliminació de les diferents substàncies carregades positivament presents en la matriu líquida, a més de l'adsorció inespecífica, durant la sedimentació, d'altres compostos en solució. Així, el seu ús elimina un gran nombre de substàncies, tant útils com no desitjades (Poinsaut *et* Hardy, 1995c). La fermentació del most pot veure's facilitada mitjançant un tractament prefermentatiu de clarificació a causa de l'eliminació de compostos inhibidors de l'acció dels llevats. La utilització de bentonita en mostos, però, només sol fer-se quan no es disposa d'un equip de filtració de fangs ja que augmenta el rendiment del desfangat (la filtració dels fangs seria difícil per la colmatació ràpida dels filtres). En aquest sentit, la fórmula més utilitzada és la combinació de gelatina i gel de sílice.

Alguns elaboradors prefereixen utilitzar la bentonita al començament de la fase multuosa de la fermentació en lloc de en el vi acabat de fermentar, ja que d'aquesta manera no s'alteraran significativament les característiques conferides al nou producte. Sol usar-se normalment combinada amb caseïna. Durant la fermentació, hi ha un major contacte com a conseqüència dels corrents convectius, i després, la compactació dels sediments és també més gran, el que facilitarà els trasbalsos. Entre les proteïnes eliminades s'hi troba la tirosinasa (l'oxidasa natural del raïm). També s'eliminen substàncies amb propietats antibiòtiques secretades per certs microorganismes i productes de tractament de la vinya que podrien alterar l'activitat dels llevats de fermentació, a més d'alguns col·loides com els glucans (millora de la filtració).

En vins, la principal acció de la bentonita és l'eliminació de les proteïnes inestables que poden presentar riscos de precipitació i formació d'enterboliments una

vegada s'ha embotellat el vi (Marchal *et al.*, 1997a). Permet eliminar també compostos lipídics i certes substàncies responsables d'un excés de color quan la seva extracció durant la maceració ha estat important. La incidència en les característiques organolèptiques serà, per tant, important. Pel que fa a l'ús com a adjuvant de tiratge, en l'elaboració de vins escumosos, facilita els remoguts, permetent-ne la mecanització i un major estalvi de temps i d'espai a la cava.

La bentonita és capaç d'interaccionar també amb les molècules responsables de l'aroma del vi (Lubbers *et al.*, 1995). La seva capacitat per fixar-los varia d'una bentonita a una altra, però pot arribar a ser del 25%, una quantitat gens menyspreable. Mentre que el mecanisme de l'acció desproteïntzant de les bentonites es dona mitjançant un intercanvi de cations, en el cas de les compostos aromàtics la fixació té lloc per mecanismes d'adsorció en els que intervenen enllaços dèbils tipus pont d'hidrogen o interaccions hidrofòbiques.

L'efecte i la influència dels tractaments de clarificació amb bentonita en la composició macromolecular de mostos i vins ha estat estudiat per diferents autors, amb resultats diferents segons uns o altres. Maujean *et al.* (1990) recullen les referències bibliogràfiques que es descriuen tot seguit. S'ha vist que un tractament amb bentonita pot provocar una disminució del nitrogen total del 5 al 40%, i una disminució de la concentració de proteïnes del 20 al 60%, en funció de la dosi utilitzada (Ferency, 1966). Segons Blade *et Boulton* (1988), l'adsorció de les proteïnes per la bentonita és completa després de 30 segons de contacte. Altres autors (Andriamenantena, 1984) han observat que un tractament amb bentonita en una dosi de 50 g/hL provoca una disminució del 25% dels col·loides totals; en canvi, en una dosi de 30 g/hL, ja sigui en un most o un vi, Geoffroy (1984) troba que la disminució de la concentració de col·loides totals és, com a màxim, del 15%.

Pel que fa a l'efecte sobre les propietats escumants dels vins tractats amb bentonita, entre els primers estudis hi trobam també els realitzats per Maujean *et al.* (1990). Aquests observen que l'escumabilitat és menor després d'un tractament amb bentonita, com també la concentració proteica del vi. En canvi, l'estabilitat de l'escuma en resulta millorada (valors majors de TS). L'explicació es trobaria, segurament, en l'adsorció conjunta i inespecífica de compostos desfavorables per a l'escuma. La dosi de bentonita és un factor a tenir en compte. D'ella en depenen tant la quantitat de proteïnes eliminades com l'efecte sobre les propietats escumants. A partir de dosis de 50 g/hL s'observa un efecte clarament nefast sobre l'escumabilitat. A nivell d'elaboració, s'ha pogut constatar que el tractament d'un vi amb bentonita en dosis

superiors a 25 g/hL pot tenir uns efectes perjudicials sobre les propietats escumants, en general, i de l'escumabilitat, en particular. Un tractament en petita dosi (10 g/hl) no té un efecte significatiu sobre el comportament de l'escuma.

L'efecte de la bentonita sobre l'escuma és diferent si és utilitzada en el most o en el vi (Poinsaut, 1991). En el vi, l'efecte és molt més important: la disminució de l'escumabilitat és tres vegades superior en comparació amb el tractament realitzat en el most. En quant a la disminució de la concentració de proteïnes, aquesta és també inferior en el most (en tant per cent) que en el vi.

4.5.8. Els tractaments amb carbó actiu

Tot i que les referències sobre les propietats “sanitàries” dels carbons són bastant antigues (Hipòcrat, el Grec, el prescrivia com a substància per a curar el mal d'estómac, i Cristòfol Colom l'utilitzava per a la purificació de les reserves d'aigua potable), el seu ús en enologia és relativament recent.

L'origen dels carbons pot ser animal o vegetal, però és la seva capacitat per adsorbir diferents substàncies el que els fa especialment interessants (Paetzold, 1991). La quantitat de substàncies adsorbides serà major en funció de la superfície disponible d'aquest, i és per aquest motiu que actualment es parla de carbons actius. L'activació d'un carbó consisteix, precisament, en augmentar-ne aquesta superfície, la qual cosa s'aconsegueix de dues maneres complementàries. El trencament mecànic per a reduir al màxim el tamany de les partícules, fa que la superfície efectiva del conjunt sigui considerablement major en comparació amb la inicial, podent arribar, en alguns casos, a ser de 500, 1000 o fins i tot 1500 m² per gram de carbó. El secret d'aquest increment espectacular de la superfície es troba, però, en l'augment de la porositat de les partícules de carbó provocat per un tractament amb vapor, a temperatura elevada. Es formen tot un conjunt de canals microscòpics, entrecreuats tridimensionalment, que permet que les molècules que es pretenen eliminar puguin penetrar a l'interior de l'entramat, quedant-hi adsorbides.

En el camp de l'enologia, els carbons presenten diferents utilitats (Marchal *et al.*, 1997b; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998b; Lopez *et al.*, 2001). La seva capacitat decolorant permet la clarificació dels vins blancs en els que el color ha evolucionat massa, o bé corregir una extracció excésiva de color en l'elaboració dels *blanc de noirs*. Permet, també, el tractament dels vins maderitzats (enfosquiment d'un vi blanc que es manifesta

per un color groc massa intens, o fins i tot marró), a més de tenir una certa acció desodoritzant pel que fa a l'eliminació de les molècules responsables d'algunes olors desagradables que el vi pot presentar de forma accidental.

En un estudi comparatiu dels efectes de l'addició de carbó actiu o de bentonita sobre les propietats escumants d'un vi utilitzant el Mosalux (Maujean *et al.*, 1990), s'observa que, afegits en la mateixa dosi, el carbó actiu té un efecte negatiu sobre l'escumabilitat molt més acusat que la bentonita. En canvi, l'estabilitat de l'escuma (TS) es veu significativament millorada amb l'ús de carbó, constatant-se una vegada més l'absència de relació entre l'aptitud d'un vi per formar escuma i l'estabilitat d'aquesta. D'altra banda, i tenint en compte que es tracta d'adsorcions inespecífiques, tot i que la disminució de la concentració de proteïnes és comparable en els dos casos, la concentració final de col·loides totals és menor quan s'utilitza carbó actiu. Tot això fa pensar que la major capacitat d'adsorció d'aquest sigui la responsable de l'eliminació, a part de les proteïnes, d'altres substàncies amb una influència negativa sobre l'estabilitat de l'escuma.

4.5.9. El gel de sílice

El gel de sílice és una solució col·loidal concentrada d'àcid silícic, normalment del 15% al 30%. És possible, però, disposar de concentracions més elevades (fins el 50%), ja que avui en dia s'han solucionat els problemes d'estabilitat lligats a aquest tipus de dissolucions.

El gel de sílice elimina, per adsorció, les proteïnes d'alta massa molecular, els complexos taní-gelatina i altres molècules responsables de la sensació d'untuositat en el vi (Caillet, 1994). Per aquest motiu, s'ha d'usar en petites dosis amb la finalitat de no empobrir massa el vi. La seva floculació és important i la sedimentació ràpida. La limpidesa que proporciona la combinació gelatina i gel de sílice és excel·lent i està molt recomenada en el cas dels vins difícils de clarificar. A part d'assegurar la clarificació, aquest ús combinat fa que s'evitin els possibles problemes de sobreencolat que pot donar l'ús exclusiu de gelatina. També pot utilitzar-se en combinació amb la cola de peix. Amb clarificants proteics amb els que no pot reaccionar, com la caseïna, cal anar en compte perquè el petit tamany de les seves partícules fa que no quedin retingudes en la filtració, podent donar problemes d'estabilitat quan el vi ja s'ha embotellat.

4.5.10. La polivinil-polipirrolidona (PVPP)

Tot i que no es tracta d'un producte molt habitual en la indústria enològica, en alguns casos pot ser de gran utilitat. Es tracta d'un polímer sintètic insoluble, amb capacitat per fixar els compostos fenòlics. Aquesta propietat s'aprofita, sobretot, per a suavitzar els vins negres amb una astringència massa marcada provocada per alguns tipus de tanins. En vins blancs, la seva capacitat decolorant s'utilitza en el tractament de la maderització i enfosquiment del color. Tot i ser insoluble, el petit tamany de les partícules fa que la seva sedimentació sigui lenta. En aquesta sedimentació s'adsorbeixen part dels polifenols.

És de suposar que també es dona l'adsorció inespecífica d'altres substàncies, i per tant s'alterarà la composició química del vi, afectant al conjunt de les seves propietats. De totes maneres, no es disposa de dades sobre la influència directa en les característiques escumants d'aquest.

4.5.11. Altres combinacions (bentocaseïna i mescla de bentonita i alginats)

Al mercat és possible trobar productes que són el resultat de combinar diferents clarificants, entre ells mateixos o amb altres substàncies, per tal d'aprofitar les propietats de cada un d'ells i facilitar-ne l'ús (menys intervencions en el procés d'elaboració i estalvi de temps). La combinació de clarificants amb aquesta finalitat no és una cosa nova. Anteriorment s'ha vist, per exemple, que l'ús de gelatina amb gel de sílice o taní enològic permet evitar els riscos d'enterboliment provocats per la precipitació de proteïnes inestables que havien quedat en dissolució. No obstant, el fet que la majoria d'ells exigeixin una preparació diferent i que l'aplicació en el vi no pugui fer-se de forma simultània és la causa que no sigui possible trobar-los, al mercat, en forma d'un sol producte.

Es considerarà a continuació el cas de la bentocaseïna i de la mescla de bentonita i alginats. És possible trobar, també, combinacions de diferents bentonites, en funció de l'origen i característiques de cada una d'elles, però el resultat global és el d'una bentonita millorada, pel que no se'n parlarà de forma particular.

La bentocaseïna és una mescla de bentonita, caseinat potàsic i cel·lulosa. S'utilitza, sobretot, durant la fermentació alcohòlica, tot aprofitant les diferents característiques de cada un dels constituents. La cel·lulosa serveix de suport als llevats,

a més de la capacitat per adsorbir diferents compostos, alguns dels quals, com ara certs àcids grassos insaturats i restes de pesticides, podrien inhibir l'acció d'aquests llevats (Ribéreau-Gayon, 1998b). Així, la fermentació és veu doblement afavorida. D'altra banda, la caseïna elimina els compostos fenòlics oxidats o oxidables, el que es tradueix en una millora del color del vi i en la prevenció de la seva oxidació. I finalment, la bentonita, a part de l'eliminació de proteïnes, afavoreix la compactació dels sediments.

Maujean *et al.* (1990) han observat que l'addició de bentocaseïna al vi, disminueix només lleugerament la concentració de proteïnes, el que es relaciona amb la disminució poc significativa dels valors d'escumabilitat (HM) mesurats amb el Mosalux.

Una altre producte resultant de la combinació de clarificants és la mescla de bentonita i alginats. En la clarificació del vi en botella, segons el mètode tradicional d'elaboració d'escumosos, és la fórmula que tendeix a substituir actualment l'ús de bentonita sola (Hardy, 1993a). L'origen i la naturalesa de la bentonita i els alginats, la combinació escollida i la forma d'utilitzar-los són els principals factors a tenir en compte per a poder obtenir una millora tant de la clarificació (bona limpidesa i volum petit de pòsits per evitar pèrdues considerables de vi) com de les característiques escumants.

Existeix, doncs, una àmplia gama disponible de productes de clarificació. Tots ells modifiquen, d'una manera o altra, la composició química del vi i n'alteren les característiques organolèptiques. L'elecció del clarificant, la manera i el moment d'utilitzar-lo condicionaran tant el treball de celler com la qualitat del producte final.

4.6. Estabilització del vi pel fred

Acabada la fermentació alcohòlica, el vi blanc és una solució sobresaturada en sals de l'àcid tartàric que més tard o més d'hora, a causa de canvis en la temperatura, poden precipitar. Per evitar que això passi dins la botella es recorre al tractament artificial en fred (Peynaud, 1996).

El vi se sotmet un cert temps a una temperatura inferior a 0 °C, pròxima a la temperatura de congelació, i normalment s'observa la formació d'un precipitat. Està format, principalment, per sals tartàriques (hidrogenotartrat de potasi i, en menor mesura, tartrat neutre de calci) i substàncies col·loïdals que formen part de la matèria

colorant inestable. També precipiten, de forma parcial, el fosfat fèrric i algunes proteïnes. En aquests dos darrers casos no és possible aconseguir una estabilització completa mitjançant, únicament, el tractament en fred. Si es vol prevenir la possibilitat de precipitacions posteriors (trencament fèrric o proteic, respectivament) és necessari recórrer a altres mètodes, com l'addició de clarificants en el cas de les proteïnes.

Òbviamment, si la precipitació d'aquestes substàncies es donés dins la botella (sota l'aspecte de pòsits o d'enterboliments), l'efecte en l'apreciació visual per part del consumidor seria clarament negatiu i desfavorable. Per aquest motiu, la clarificació, la precipitació provocada pel tractament en fred i la filtració posterior, li proporcionen al vi l'estabilitat del color i de la limpidesa necessaris per a una correcta conservació en botella.

La presència de certs col·loides inhibeix parcialment la precipitació de les sals tartàriques però, en canvi, la presència d'etanol en disminueix la solubilitat (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Per aquest motiu, en l'elaboració de vins escumosos és molt important aconseguir l'estabilitat tartàrica del vi ja que amb la segona fermentació hi ha un augment del grau alcohòlic. La precipitació i formació de cristalls de sals tartàriques podria donar lloc a una formació excessiva d'escuma pel fet que aquests poden actuar com a punts de nucleació heterògena (Senée *et al.*, 1998). Així, les pèrdues de vi en el moment de destapar la botella, a causa d'una efervescència massa elevada, podrien ser importants, el que diria molt poc a favor seu.

Com a alternatives al tractament en fred existeixen altres mètodes per aconseguir l'estabilització tartàrica del vi. Es tracta de l'ús de resines d'intercanvi d'ions (no autoritzat per llei) i de l'electrodiàlisi. De totes maneres, el fet de ser molt poc habituals i allunyar-se dels nostres objectius, es remet al lector a consultar altres fonts bibliogràfiques en cas d'estar interessat en el seu coneixement.

4.7. La filtració del vi

La filtració és una operació mecànica que consisteix en fer passar un líquid a través d'una capa filtrant amb l'objectiu de retenir les diferents partícules en suspensió i fer que el seu aspecte esdevingui completament límpid. Com qualsevol operació d'aquestes característiques, presenta problemes de qualitat i de quantitat: per una banda s'ha de conseguir una bona limpidesa del vi amb una mínima alteració de les seves qualitats, i d'una altra, es té el rendiment de la filtració, és a dir, la quantitat de vi que és

possible filtrar en funció de la superfície de filtració, la qual disminueix a mesura que s'acumulen les partícules retingudes fins bloquejar-la completament (colmatació).

Existeixen diferents tipus de filtres en funció de la seva composició, la forma en que seran utilitzats i el fonament físic de la retenció de les partícules (adsorció o efecte sedàs). De totes maneres, el que interessa realment és la seva capacitat de retenció, sense que es doni, però, una cessió de partícules dels filtres al vi i que en puguin alterar les característiques. Alguns dels sistemes de filtració utilitzats actualment i de forma habitual són la filtració sobre terres, la filtració en plaques i en membranes, i la microfiltració tangencial.

Sigui quin sigui el sistema de filtració utilitzat, tots ells tendran una incidència més o menys intensa en la composició química del vi (Serrano *et Paetzold*, 1998). Entre d'altres, s'ha vist que poden disminuir la concentració de polisacàrids, de proteïnes, de compostos volàtils responsables de l'aroma del vi, etc. La incidència en les qualitats organolèptiques del vi és, doncs, òbvia.

Existeixen diferents estudis sobre l'efecte de la filtració en les propietats escumants del vi. Ha pogut observar-se una dependència clara entre la intensitat de la filtració (ús de filtres de diferent tamany de porus) i la disminució dels valors d'escumabilitat i estabilitat de l'escuma d'un vi, mesurats amb el Mosalux (Robillard *et al.*, 1993); malgrat no haver comprovat l'efecte en la composició química, s'han relacionat aquestes observacions amb el fet que hagin estat retingudes en els filtres substàncies amb capacitat per estabilitzar la interfase de les bombolles, com ara proteïnes.

L'efecte de la filtració del vi base per a l'elaboració de *champagne* i el comportament de l'escuma en la copa s'ha estudiat mitjançant l'ús d'un sistema de visió artificial (Viaux *et al.*, 1994). Els vins han estat filtrats amb filtres de diferent tamany de porus (0.2, 0.45, 0.65 i 3.0 μm) i s'han comparat els resultats amb els de vi sense filtrar. La incidència de la filtració és clara: en tots els paràmetres d'escuma mesurats, la filtració esterilitzant (0.2 μm) és la que dona uns valors pitjors, segurament a causa d'una major eliminació de les substàncies favorables per a l'escuma. El vi filtrat per 0.45 μm presenta una major estabilitat de cara a la formació d'un collar d'escuma, i també el temps per a que aquesta desaparegui és major. Això es contradiu amb els resultats obtinguts per Robillard *et al.* (1993), en els que no s'observà una dependència de l'estabilitat del collar amb l'eliminació de compostos col·loïdals. Així, doncs, el

conjunt d'observacions realitzades fa pensar que en realitat hi ha un equilibri, en el vi, entre les substàncies positives per a l'escuma i les que tenen una influència negativa.

La ultrafiltració del vi permet determinar l'efecte de la concentració de macromolècules en les propietats de superfície de les bombolles (Péron *et al.*, 2000, 2001). Aquests autors han comparat els resultats obtinguts en els vins base inicials, els ultrafiltrats (tall de massa molecular, 10^4 kDa), els ultraconcentrats i els vins reconstituïts a partir de les dues fraccions anteriors, de forma que la seva concentració en macromolècules sigui idèntica a la del vi base original. Els resultats indiquen que hi ha una correlació positiva entre la composició macromolecular i la cinètica de disminució de la tensió superficial de les bombolles, el que es tradueix en un augment de la seva estabilitat. S'ha pogut constatar, a més, que realment es forma una capa d'adsorció a la interfase de les bombolles en els vins rics en macromolècules. Amb l'ultrafiltració és veu com disminueix la concentració de proteïnes del vi. L'ús de membranes d'ultrafiltració, però, en pot modificar l'estructura, sigui per adsorció o per canvis en la seva conformació. Això podria explicar el fet que les mesures de cinètica de tensió superficial en el cas del vi ultraconcentrat i del vi reconstituït siguin menors que en el vi base nadiu, ja que haurien de ser, en teoria, major i igual, respectivament.

Es veu, doncs, que la filtració del vi té una incidència directa en les seves propietats escumants. Tot i que hi ha una clara modificació de la composició macromolecular del vi, sembla que no pugui establir-se un model general per a determinar quin tipus de filtració és la que respectarà més el conjunt de característiques escumants del vi. En qualsevol cas, el que pareix més lògic és minimitzar la filtració, donat l'empobriment i els canvis que pot provocar en el vi.

4.8. Efecte del SO₂

El SO₂ s'utilitza en la indústria enològica tant durant l'elaboració del vi com en la seva conservació. S'aprofiten les seves propietats antisèptiques, antioxidants i antioxidàsiques (inhibició i desnaturalització de les oxidases procedents del raïm, la tirosinasa, o d'un atac per botrytis, la lacasa), a més del seu poder com a dissolvent en l'extracció de certs compostos fenòlics i/o aromàtics (Blouin, 1997). En el vi s'utilitza normalment en forma de dissolucions de metabisulfit potàsic. Es troba en equilibri entre la forma lliure, i la combinada amb diferents compostos que presenten grups carbonil en la seva estructura química.

En estudis realitzats amb cerveses, s'ha vist l'efecte negatiu dels sulfits sobre les característiques de l'escuma (Brenner *et* Bernstein, 1975). En el cas del vi, Schanderl (1965) comprovà que l'addició de SO₂ en dosis elevades, abans del tiratge, provoca durant la presa d'escuma un alliberament important d'àcids grassos per part dels llevats, l'efecte dels quals sobre l'escuma ha estat descrit precedentment en aquest capítol.

Per tal de contrastar aquests resultats amb l'efecte sobre els distints paràmetres escumants proporcionats amb el Mosalux, Maujean *et al.* (1990) fan una addició de diferents dosis de SO₂ en un vi. Observen que no hi ha una variació significativa ni de l'escumabilitat ni de l'alçada estable d'escuma, i només per a les dosis més altes hi ha un augment del temps d'estabilitat de l'escuma. En qualsevol cas, la qualitat global de l'escuma es veu afectada negativament: apareix menys blanca i les bombolles són més grosses. Aquest efecte negatiu del SO₂ s'interpreta per l'alteració que provoca sobre les proteïnes a causa del seu poder desnaturalitzant en la ruptura dels ponts disulfur.

A partir dels resultats obtinguts mitjançant l'estudi de correlacions estadístiques entre la composició del vi i el comportament de l'escuma s'ha vist que la concentració de SO₂ total en un cava està relacionada inversament i de forma significativa amb l'alçada estable de l'escuma (Pueyo *et al.*, 1995). En vins, la concentració de SO₂ total es relaciona també negativament amb els paràmetres proporcionats pel Mosalux (Andrés-Lacueva *et al.*, 1996), si bé els valors dels coeficients de correlació i de significància no permeten extreure'n cap conclusió que n'estableixi una relació directa.

Així, tot i la gran importància de la utilització del SO₂ en la conservació final del vi, els estudis realitzats sobre la seva incidència en el comportament escumant són, a més d'escasos, poc concloents. Segons els resultats descrits anteriorment tot sembla indicar que el seu efecte en la qualitat de l'escuma és desfavorable.

5. Influència de la segona fermentació i de la criança en botella sobre la qualitat de l'escuma

Una vegada obtingut el vi base, l'elaboració de vins escumosos segons el mètode tradicional inclou tota una sèrie d'altres operacions. A la figura 17 es representa de forma esquemàtica aquest procés d'elaboració. Els dos punts més importants en l'obtenció del producte final són la segona fermentació o presa d'escuma i la criança en botella. Aquests constitueixen el principal canvi en la composició i característiques del nou producte, en comparació amb el vi base original, i li confereixen les propietats que el fan particular. Un altre punt a destacar és el que fa referència a l'eliminació dels pòsits formats dins la botella mitjançant l'ús de clarificants (anomenats, en aquest cas, adjuvants de tiratge) i les operacions de remogut i desgorjament.

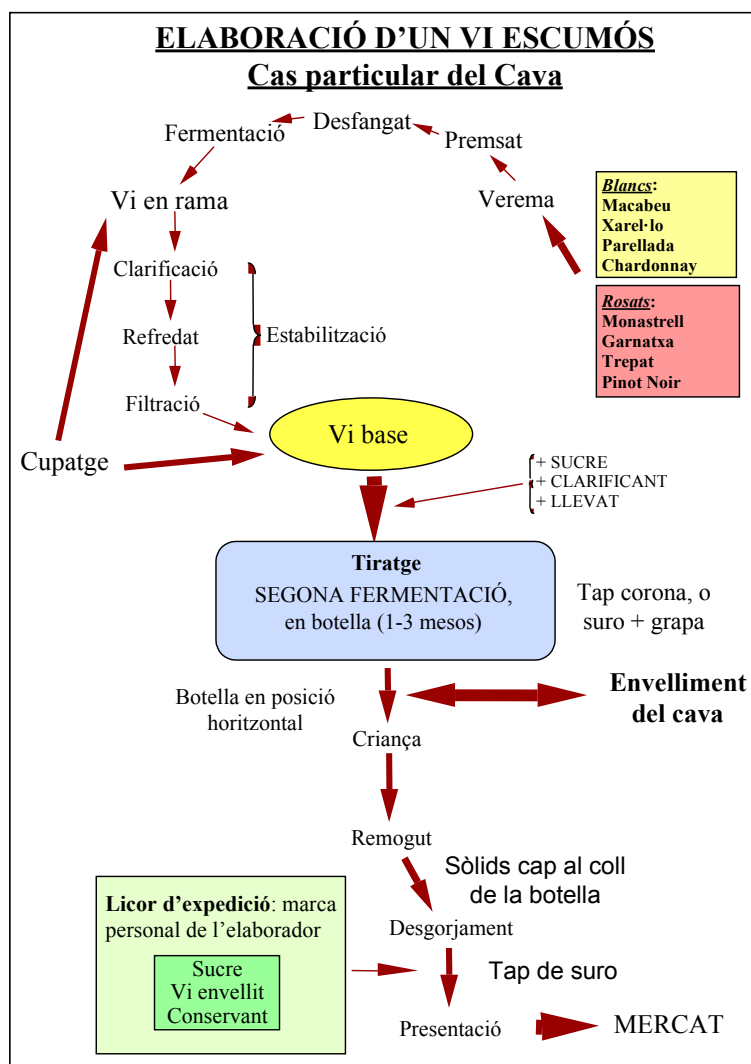


Figura 17 - Esquema d'elaboració d'un vi escumós segons el mètode tradicional.

5.1. La presa d'escuma

L'objectiu de la segona fermentació alcohòlica, també anomenada presa d'escuma, és l'obtenció del vi escumós, amb les propietats d'efervescència i formació d'escuma que el caracteritzen.

La presa d'escuma presenta moltes similituds amb la fermentació alcohòlica del most: es dona, també, la fermentació de sucres (glucosa i fructosa) per part dels llevats, amb producció d'alcohol i gas carbònic i, en menor proporció, altres substàncies que contribuiran en el conjunt de sensacions organolèptiques. Existeixen, però, dues diferències principals: la presa d'escuma consisteix en la refermentació d'un vi i no d'un most (la presència d'alcohol i de SO₂ dificulten l'acció dels llevats). A més, a banda del fet que ara els sucres de fermentació han estat adicionats al vi, la disponibilitat de nutrients és molt inferior en comparació amb el most. L'altra diferència és que la segona fermentació es realitza en un recipient tancat, normalment una botella, per tal d'evitar el desprendiment del CO₂ format i que d'aquesta manera pugui conferir les propietats particulars d'efervescència dels vins escumosos.

L'elecció dels vins base destinats a l'elaboració de vins escumosos no es fa únicament en funció del seu aroma i sabor, sinó també segons la seva capacitat per a produir una escuma de qualitat. L'escuma que apareix amb la segona fermentació es correlaciona, entre d'altres, amb la composició química dels vins elegits pel cupatge i el tiratge, i són nombrosos els estudis realitzats en els darrers deu anys en aquest sentit (Brissonet *et al.*, 1991; Marchal *et al.*, 1993; Pueyo *et al.*, 1995; Andrés-Lacueva *et al.*, 1996a, 1996b; López-Barajas *et al.*, 1998).

Es té, doncs, que l'addició de sucres i llevats a un vi tranquil permet la seva refermentació. S'anomena tiratge al conjunt d'operacions consistents en afegir els sucres, els llevats i els clarificants que permetran la clarificació en botella (anomenats adjuvants de tiratge) al vi base de partida, juntament amb l'embotellat posterior per a que es doni la presa d'escuma. S'afegeixen normalment de 1 a 3 milions de cèl·lules de llevat per mililitre de vi, i entre 22 i 25 g/L de sucre, de manera que es dona un increment del grau alcohòlic del vi d'aproximadament un 1,5% vol. La pressió de CO₂ al final de la presa d'escuma sol ser d'uns 6 bar. La manca de desprendiment de gas fa que els llevats es depositin al fons de la botella, en lloc de mantenir-se en suspensió. Tot i que això dificulta tant l'accessibilitat als nutrients necessaris pel seu creixement i activitat, com també l'evacuació dels compostos que els són desfavorables, s'ha

comprovat que la falta d'agitació no té cap efecte sobre el creixement dels llevats ni en la degradació dels sucres per part d'aquests (Valade *et* Laurent, 1999).

El seguiment de la població de llevats durant la segona fermentació mostra que aquesta s'atura d'augmentar quan la pressió de CO₂ dins la botella és d'uns 3 bar. Paradoxalment, la formació de CO₂, que proporciona al vi escumós les característiques que el fan especial, és també el principal inhibidor del creixement dels llevats i de la seva activitat posterior, tant per efecte de l'augment de pressió com per alteració de la fluidesa de la seva membrana (Jones *et* Greenfield, 1982; Ribéreau-Gayon, 1998).

Els principals factors que afecten la població de llevats durant la presa d'escuma són la composició química del vi base de partida, la temperatura a la que es realitza la fermentació, la qualitat del llevat seleccionat i la seva resistència a l'alcohol (Valade *et* Laurent, 1999). Aquests factors condicionen tant la cinètica de fermentació com les característiques del producte resultant. Els anteriors autors han estudiat l'efecte de la posició de la botella durant la segona fermentació, la qual modifica la superfície de contacte disponible entre els llevats i el vi. Com més petita és aquesta superfície, menor és la quantitat de llevats que realitzen la fermentació; això es tradueix en un menor increment de la pressió en el temps i pot provocar que no s'arribi a donar la consumició total dels sucres, és a dir, una parada de fermentació. A més, en una botella en posició vertical, l'alçada de líquid respecte dels llevats depositats al fons és també superior. Per tot això, les botelles es col·loquen en posició horitzontal per tal de maximitzar l'àrea de contacte i facilitar la disponibilitat de les substàncies necessàries per a la fermentació.

La presa d'escuma pot durar d'un a tres mesos, en funció dels diferents paràmetres ja esmentats. En el moment just en que la fermentació ha acabat, o sigui, quan s'ha consumit tot el sucre afegit, si es procedeix al desgorjament i eliminació dels pòsits formats dins la botella s'observa que el comportament escumant del vi i l'apreciació del conjunt de característiques organolèptiques no és satisfactori. En el moment de destapar la botella, l'escuma és molt abundant i grossera (el que pot suposar pèrdues importants de volum); en canvi, l'efervescència desapareix al cap de poc temps d'abocar el vi a la copa. Es nota, a més, una certa agressivitat d'aquesta en boca. En el conjunt es troben a faltar les qualitats gustatives pròpies d'un cava o *champagne*. És per tot això que el procés d'obtenció del vi escumós continua amb la cria o envelliment en contacte amb els llevats.

L'efecte de la segona fermentació sobre les propietats escumants d'un vi elaborat seguint el mètode tradicional ha estat estudiat per Maujean *et al.* (1990), utilitzant el Mosalux per a caracteritzar-les. Es mesura el comportament escumant de diferents vins, abans i després de la presa d'escuma. Amb la fermentació en botella s'observa una disminució promig de l'escumabilitat del 46%, mentre que la permanència i l'estabilitat de l'escuma en resulten incrementats un 31% i un 288%, respectivament. El fet de que no hi hagi cap tipus de correlació entre els valors dels tres paràmetres sembla indicar que les substàncies implicades en una o altra situació no tenen per què ser les mateixes. Observen una bona correlació entre els valors d'escumabilitat d'un vi base i els del mateix vi després de la presa d'escuma. La disminució de l'escumabilitat es relaciona amb l'increment de la concentració de l'etanol amb la fermentació, ja que els valors obtinguts per addició d'una quantitat equivalent d'alcohol en el mateix vi base de partida són molt semblants.

Una vegada acabada la segona fermentació, Pueyo *et al.* (1995) observen que, passats tres mesos de la realització del tiratge, també es dona un increment de l'alçada estable de l'escuma en condicions dinàmiques i, de forma molt marcada, del temps d'estabilitat, resultats que concorden amb els anteriors.

5.2. La criaça en botella i l'autòlisi de llevats

Els elaboradors de vins escumosos s'han adonat que el temps transcorregut entre el tiratge i el desgorjament, durant el qual hi ha un contacte entre el vi i els llevats quan ja s'ha acabat la segona fermentació, afecta les característiques de l'escuma. Aquest període s'anomena criaça. Això ha promogut que els investigadors s'hagin dedicat a l'estudi de la influència del temps de criaça en botella sobre la qualitat de l'escuma i del vi en general, per a poder establir quin és el moment idoni per a procedir al desgorjament i eliminació dels pòsits, abans de posar el producte al mercat.

La criaça és el factor de qualitat que diferencia els vins escumosos elaborats segons el mètode tradicional dels altres en que prescindeixen d'ella, com per exemple els obtinguts segons el mètode Charmat curt (la presa d'escuma es realitza en grans dipòsits amb capacitat per resistir altes pressions) o els vins gasificats artificialment (en aquests, ni tan sols no hi ha segona fermentació; s'afegeix CO₂ directament a la botella o dipòsit que conté el vi tranquil de partida).

En funció de la regió, les diferents legislacions estableixen un temps mínim de criaçna dins la botella per a que el vi escumós resultant pugui ser considerat com a cava o *champagne*. A la regió del Cava, aquest període mínim és de 9 mesos. Unes criances més llargues permeten classificar aquests vins com a reserves o grans reserves.

El principal fenomen que té lloc durant la criaçna és l'autòlisi dels llevats. Per la seva importància, a continuació es descriurà de forma general en què consisteix i quins són els efectes sobre les propietats del vi.

L'autòlisi dels llevats

El fenomen d'autòlisi de llevats està associat, principalment, als casos de vins blancs conservats sobre lies i a l'elaboració de vins escumosos segons el mètode tradicional. Correspon a una autodegradació enzimàtica dels distints constituents cel·lulars dels llevats, que comença immediatament després de la mort d'aquests i pot desenvolupar-se durant períodes relativament llargs (Flanzy, 1998).

Existeixen estudis relacionats amb intentar accelerar i afavorir el procés natural d'autòlisi: Todd *et al.* (2000) observen, en un medi sintètic de fermentació, que l'addició conjunta d'una soca de llevat amb activitat killer (capaç d'alliberar una toxina que resulta letal per a altres llevats) i una altra que sigui sensible a aquesta activitat provoca un començament més ràpid de l'autòlisi a causa de la mort prematura dels llevats sensibles a la toxina.

Poden obtenir-se també preparats *in vitro* d'autolisats de llevats (Charpentier et Feuillat, 1993; Moine-Ledoux, 1996; Martínez-Rodríguez *et Polo*, 2000). L'objectiu és accelerar de manera artificial el procés d'autòlisi mitjançant, sobretot, la incubació d'una solució que contengui els llevats a temperatures compreses entre 30 i 50 °C.

La membrana citoplasmàtica i la paret cel·lular del llevat tenen un paper fonamental en l'autòlisi ja que la seva desnaturalització permet l'alliberament d'enzims hidrolítics al medi extracel·lular i el contacte amb els seus substrats (Leroy *et al.*, 1990). També s'alliberen altres substàncies (Charpentier *et Feuillat*, 1993; Moreno-Arribas *et al.*, 1997, 2000; Todd *et al.*, 2000; Pueyo *et al.*, 2000) com ara compostos nitrogenats (aminoàcids, pèptids, i proteïnes), polisacàrids (glucans i manoproteïnes) i lípids. La degradació dels constituents de la paret cel·lular n'augmenta la porositat i facilita aquest alliberament.

Els llevats són una font important de polisacàrids en el vi. Des del començament de l'autòlisi s'alliberen tota una mescla de polisacàrids i de curtes cadenes d'oligosacàrids, per l'acció d'una exo i una endo glucanases sobre la composició de la paret cel·lular dels llevats (Feuillat *et* Charpentier, 1982; Charpentier *et* Feuillat, 1993).

En el cas concret de l'elaboració de vins blancs fermentats i conservats sobre lies totals en bota, s'ha vist que hi ha un enriquiment significatiu del col·loides glucídics (Llaubères *et al.*, 1987). L'alliberament és major amb la temperatura, agitació del medi (resuspensions pel sistema de "battonage") i conservació sobre lies prolongada. Tant els polisacàrids alliberats durant la conservació, com els que es troben a la paret dels llevats o els d'origen vegetal, poden combinar-se amb els compostos fenòlics presents. Això provoca una disminució de l'índex de polifenols totals i de la intensitat del color groc del vi blanc. Una part dels tanins cedits per la fusta es fixen també a sobre de les parets dels llevats i en les manoproteïnes alliberades per aquests.

A causa de l'activitat proteolítica intracel·lular del propi llevat, amb l'autòlisi també es dona un enriquiment, en el medi, en petits pèptids i aminoàcids per hidròlisi i degradació dels distints constituents citoplasmàtics (Achstetter *et* Wolf, 1985); aquesta activitat està fortament influenciada pel pH del medi. En l'elaboració de vins escumosos, Moreno-Arribas *et al.* (1997) constaten l'alliberament simultani de pèptids i enzims per part dels llevats, a més de la degradació successiva dels primers. Veuen, també, que la distribució d'aminoàcids en els vins depèn del temps de contacte amb els llevats, pel que el seu estudi, en funció de les diferents fraccions nitrogenades del vi, pot aportar informació sobre el temps de cria.

Todd *et al.* (2000) observen que en els vins escumosos hi ha un increment marcat de la concentració total de proteïna durant la presa d'escuma (primers dos mesos després del tiratge), a la que segueix una lleugera disminució transitòria que pot durar de dos a tres mesos, a partir dels quals torna a haver-hi un nou augment lligat a l'autòlisi dels llevats fins als 15 mesos de contacte, temps màxim considerat en el seu treball.

En un estudi recent, Moreno-Arribas *et al.* (2000) han estudiat la influència de la variació, durant els primers 24 mesos de cria, de les concentracions dels polisacàrids i els compostos nitrogenats (aminoàcids, pèptids i proteïnes) sobre les característiques de l'escuma dels vins escumosos. Comproven que existeix una correlació positiva entre la concentració d'aminoàcids lliures, la de polisacàrids i la de proteïnes amb els paràmetres d'alçada màxima i alçada estable de l'escuma; en canvi, aquests no es correlacionen amb la concentració peptídica.

L'autòlisi dels llevats provoca un canvi en les característiques aromàtiques dels vins escumosos (Feuillat *et* Charpentier, 1982). Estudis realitzats en un medi hidroalcohòlic àcid han permès constatar que durant la criaça es dona la formació de nombrosos i variats compostos volàtils, com ara diferents ésters, alcohols terpènics, aldehids, lactones, etc.

També s'ha vist que durant l'autòlisi hi ha un alliberament dels àcids grassos de cadena llarga tipus C16 i C18 (Ferrari *et al.*, 1987). En l'elaboració de vins blancs en bota, se'ls pot trobar als fangs fins, i tenen un efecte activador sobre els llevats que realitzen la fermentació alcohòlica. Durant la segona fermentació i la criaça dels vins escumosos, l'autòlisi dels llevats també dona lloc a un enriquiment del medi en diferents lípids (Troton *et al.*, 1989; Pueyo *et al.*, 2000).

S'entén, doncs, que amb la criaça i l'autòlisi de llevats, les característiques organolèptiques del vi escumós en resultin modificades. El comportament de l'escuma es veurà afectat, sobretot, pels canvis en la composició química que comporta la pròpia autòlisi, però també per les petites pèrdues de CO₂ i l'entrada de O₂ (malgrat la pressió interna del CO₂) a través del tap de la botella, a causa de la impossibilitat d'aconseguir una estanqueïtat perfecta (Valade *et* Tribaut-Sohier, 2001). A continuació es descriuen els resultats trobats per diferents autors en l'estudi del temps de criaça en botella i la seva influència sobre les propietats escumants dels vins escumosos resultants.

Pueyo *et al.* (1995) han estudiat les variacions de les característiques de l'escuma després del tiratge als 3, 6, 11, 17, 21 i 24 mesos de criaça. Als 3 mesos, l'alçada estable de l'escuma en condicions dinàmiques és màxima (i major que la del vi base original). No s'observen variacions importants fins els 11 mesos, quan comença una disminució progressiva. Als 21 mesos de criaça, l'alçada mesurada és molt semblant a la del vi base inicial. En quant a l'estabilitat de l'escuma (temps que aquesta tarda en desaparèixer, una vegada es para la injecció de gas), hi ha un increment important als tres mesos del tiratge, però a partir d'aquest moment té lloc una disminució progressiva. De totes formes, fins i tot als 24 mesos de contacte, els temps mesurats són bastant superiors al del vi base original.

Si es comparen els anteriors resultats amb els obtinguts per Maujean *et al.* (1990) amb el Mosalux, hi ha una concordància amb la tendència seguida per a l'alçada estable d'escuma. Es contradiuen, però, les observacions fetes sobre el temps d'estabilitat de l'escuma, ja que aquests autors constaten un augment progressiu fins els

15 mesos de contacte, que és el període màxim de criaça considerat. Pel que fa a l'escumabilitat, hi ha una disminució amb la presa d'escuma (mesura realitzada als dos mesos del tiratge), la qual s'accentua amb el temps de contacte amb els llevats.

Les observacions de Maujean *et al.* (1990) estan d'acord amb les realitzades per Andrés-Lacueva *et al.* (1996). En el cava, han estudiat l'efecte del temps de contacte amb els llevats als 3, 6, 9, 12, 15, 18, 23 i 26 mesos després del tiratge. Veuen, amb el Mosalux, com l'escumabilitat (HM) disminueix de forma considerable entre els 3 i 9 mesos de criaça, moment a partir del qual la disminució és més suau. La permanència de l'escuma (HS) està correlacionada positivament amb l'escumabilitat. En canvi, els valors mesurats per a l'estabilitat de l'escuma (TS) augmenten amb el temps, arribant a un màxim als 18 mesos. Així, la relació entre els dos primers paràmetres i TS és inversa. En conjunt, les millors característiques escumants s'observen als 9 mesos d'envelliment.

Altres autors, en canvi, no observen una tendència clara en l'evolució dels paràmetres escumants i el temps d'envelliment. En vins escumosos de la regió del Cava, Moreno-Arribas *et al.* (1997) veuen que l'alçada màxima de l'escuma no presenta variacions importants entre els 9 i els 24 mesos de criaça. En quant a l'alçada estable de l'escuma, hi ha un descens entre els 9 i els 15 mesos per a la majoria de varietats. A partir d'aquest temps es dona un increment, essent els valors als 24 mesos, per als caves elaborats amb les varietats tradicionals de la Regió del Cava, més alts que els mesurats als 9 mesos; per a la varietat chardonnay, l'augment no arriba a superar els valors obtinguts als 9 mesos. Es troba una correlació positiva entre l'alçada estable de l'escuma i el contingut en nitrogen dels aminoàcids lliures i dels totals, amb la concentració de proteïnes i amb la de polisacàrids neutres. En un estudi posterior (Moreno-Arribas *et al.*, 2000), s'obtenen uns resultats molt semblants pel que fa al comportament dels dos paràmetres d'escuma considerats. No obstant, si es tenen en compte els valors corresponents al vi base, aquests són, en general, superiors als dels caves als 24 mesos de criaça.

El conjunt de resultats anteriors mostra, de forma general, que hi ha una disminució de l'escumabilitat i de la permanència de l'escuma, com a mínim durant els 15 primers mesos de criaça. L'estabilitat de l'escuma, en canvi, es veu afavorida amb el temps de contacte amb els llevats. De totes maneres, el comportament de l'escuma dels vins és diferent en funció de la seva procedència i de les seves característiques, el que fa que no sigui possible establir *a priori* un temps òptim de criaça vàlid per a tots els casos. Indiscutiblement, l'envelliment que segueix a la presa d'escuma proporciona

al vi un conjunt de propietats que el revaloritzen; es decisió, però, de cada elaborador establir el temps de criança òptim pels seus vins, en funció de la destresa i coneixements acumulats amb l'experiència.

Com a curiositat relacionada amb els llevats i el comportament escumant, s'ha vist (Senée *et al.*, 1998) que aquests poden adherir-se a la superfície de les bombolles i acumular-se a la part superior de l'escuma, en el menisc comú entre tres bombolles contigües. És per aquest motiu que, per raons estèriques, podran alterar la seva destrucció a causa del drenatge. Els autors observen que la permanència de l'escuma es veu incrementada amb la concentració de llevats, fins arribar a un límit constant. En canvi, l'expansió de l'escuma no es veu afectada per l'adsorció de les cèl·lules de llevat.

5.3. Influència dels adjuvants de tiratge

Durant la presa d'escuma i a causa de l'envelliment normal del vi apareixen pòsits de diferent naturalesa, que poden alterar-ne les característiques. L'origen d'aquests pòsits pot ser exogen o endogen (Hardy, 1993).

Sense addició de cap altra substància, a part del licor de tiratge que conté els llevats que realitzaran la fermentació, s'obté ja un pòsit format pels mateixos llevats. Es tracta, naturalment, d'un pòsit d'origen exogen. El seu volum dependrà de la concentració final de llevats, després de l'etapa de creixement, que a la vegada és funció de la sembra inicial, de la temperatura i de les condicions del medi, entre d'altres. Tot i que temps enrera no es feia ni sembra de llevats ni addició de cap altre producte per a la realització de la presa d'escuma, se sabia que deixant passar un petit volum de fangs en el darrer trasbals, la fermentació en botella es donava millor.

Els pòsits de naturalesa endògena apareixen a causa de l'envelliment normal del vi. Així, per exemple, es té que la hidròlisi dels col·loides pèctics comporta l'alliberament de calci, el que pot provocar la precipitació de sals tartàriques; aquests cristalls, en cas de quedar incrustats a la botella, podran alterar el comportament de l'escuma. D'altra banda, els nivells de saturació de les sals presents pot veure's alterat per la pròpia fermentació (augment de la concentració d'etanol i canvis en l'acidesa total i el pH), causant una retrogradació de l'estabilitat cristal·lina i contribuint en l'augment del volum de pòsits. Si el raïm ha estat atacat per botrytis, aleshores també pot donar-se la hidròlisi dels col·loides glucídics i la seva precipitació, etc.

Es veu, per tant, la necessitat d'eliminar aquests sediments per a que la seva presència no alteri negativament les característiques organolèptiques el vi, començant ja per l'impacte visual que provoquen. L'operació durant la qual s'eliminen els diferents posits formats es coneix amb el nom de remogut.

Des de fa bastants anys són nombrosos els productes addicionats al vi durant el tiratge, anomenats adjuvants de clarificació o de tiratge, per tal de facilitar el remogut. Si únicament s'afegeixen al vi els llevats que realitzen la segona fermentació, és molt difícil aconseguir una bona clarificació posterior: quan es pretén compactar els sediments al coll de la botella, s'observa que sempre queda un vel molt fi de llevats completament adherit al vidre. La principal funció dels adjuvants de tiratge és, doncs, aïllar les cèl·lules de llevat del vidre, per a que tots els pòsits puguin rrelliscar fàcilment fins al coll de la botella. Aquests, seran eliminats posteriorment en el desgorjament (destapat de la botella i expulsió dels sediments compactats al coll, a causa de la pròpia pressió del gas, que els empeny cap a l'exterior). L'ús d'adjuvants de tiratge ha permès la mecanització del remogut, amb un estalvi de temps i d'espai a la cava considerable. Es millora l'aspecte visual del vi escumós, però s'ha de tenir en compte que, com que els adjuvants de tiratge solen ser els mateixos productes utilitzats en la clarificació del vi base, però en dosis menors, forçosament es veurà alterada la composició química del vi i, per tant, el seu comportament escumant.

Alguns dels adjuvants utilitzats de forma habitual es descriuran tot seguit. Com que les seves característiques i els efectes en la composició del vi s'han comentat en el capítol anterior, a l'apartat de productes de clarificació, aquí només es parlarà dels l'avantatges que suposa l'ús d'un o altre respecte del remogut, segons les observacions fetes per Hardy (1993).

Bentonita

L'ús de diferents tipus de bentonites per a la clarificació en botella començà als anys 1960, i des d'aleshores han revolucionat l'operació de remogut. La seva floculació arratra satisfactòriament els llevats i els pòsits rrellisquen amb facilitat. Aquests, però, són més lleugers i voluminosos, pel que s'ha de treballar amb més cura i el volum de vi perdut en el desgorjament és una mica més gran. Dels diferents tipus de bentonites, les utilitzades en el tiratge són les sòdiques naturals o les càlciques activades amb ions de sodi, les quals tenen una bona capacitat d'inflament i permeten obtenir uns bons resultats. Com en la clarificació del vi base, en el tiratge és habitual utilitzar mescles de

bentonites de distint origen, amb l'objectiu d'aprofitar de forma conjunta les propietats de cada una d'elles. La seva capacitat per eliminar les proteïnes és clarament manifesta, i l'ús exclusiu de bentonita com a adjuvant de tiratge té un efecte directe sobre les característiques escumants del vi, variable en funció de la dosi, però negatiu en la majoria dels casos. Actualment sol associar-se amb l'ús d'alginats, però també amb clarificants proteics com la gelatina o la cola de peix.

Clarificant orgànic en combinació amb taní

Sol tractar-se de la combinació de gelatina o cola de peix amb taní de castanyer o d'agalles. Donen lloc a pòsits poc voluminosos i molt adherents que, a més, arrastren malament els llevats, fet que fa necessària la realització de nombrosos «poignettages», és a dir, petits cops secs donats a la botella per tal de desadherir-ne els pòsits del vidre i facilitar la seva migració cap al coll. Aquest problema d'adherència se soluciona afegint una certa quantitat de kaolin (argila col·loidal de propietats semblants a les de la bentonita, però de menor capacitat desproteïnitant).

Alginats

Fa uns trenta anys que els alginats de baixa viscositat començaren a usar-se com a adjuvants de tiratge. Tenen una bona capacitat per a retenir els llevats i rellisquen amb facilitat sobre el vidre de la botella. En canvi, donen lloc a pòsits voluminosos i poc compactes quan se'ls ha fet migrar cap el coll de la botella. Això comporta problemes de manipulació en el moment de realitzar el desgorjament i, sobretot, de pèrdua de vi. L'ús combinat amb bentonita ha donat bons resultats.

Combinació de bentonita i alginats

Tot i que no és la solució a tots els problemes, actualment és la fórmula que tendeix a substituir l'ús de bentonites soles ja que és la combinació que dona unes millors característiques respecte dels pòsits. Aquests rellisquen amb facilitat, són suficientment pesats, es compacten bé al coll de la botella i retenen bé els llevats. És molt important, però, la pròpia naturalesa tant de la bentonita com de l'alginat i la seva forma de preparació. A més, s'ha constatat que aquests dos productes evolucionen al llarg del temps (Hardy, 1993), pel que aconseguir una combinació òptima d'un i altre no és una feina fàcil.

5.4. Influència de la soca de llevat

L'elecció d'un llevat o un altre per a realitzar la presa d'escuma es fa en funció de tota una sèrie de criteris. Un dels principals factors que es té en compte, però, és el referent a la quantitat i característiques dels pòsits que formarà, a banda de la ja suposada capacitat per fermentar en un medi poc favorable com és el vi base de partida. També es consideren altres factors com la capacitat d'adherència al vidre de la botella, la possibilitat de presentar propietats aglomerants, i la influència en el conjunt de característiques organolèptiques i de formació d'escuma (Hardy, 1993).

Per tant, el llevat usat per a realitzar la segona fermentació sembla tenir una importància significativa de cara a la qualitat del producte final. Tradicionalment s'ha donat més importància als aspectes relacionats amb el fet que no provoquin l'aparició de defectes gustatius i/o aromàtics, així com a la facilitat per a aconseguir una bona clarificació en botella, ja que la única condició necessària per a l'obtenció d'un vi escumós és la capacitat del llevat per a poder fermentar els sucres i produir CO₂. S'ha seguit, en definitiva, un criteri de selecció dels llevats en funció de la incidència en la qualitat global del producte. Per aquest motiu, no són gaire nombrosos els treballs on s'estudia de manera específica l'efecte d'un o altre llevat sobre els paràmetres escumants del vi. Destaca, en aquest sentit, el treball realitzat per Martínez-Rodríguez *et al.*, 2001.

Maujean *et al.* (1990), en el seu experiment per a determinar, amb el Mosalux, l'efecte de la segona fermentació i de la cria en botella sobre les propietats escumants d'un vi, utilitzen diverses soques de llevat per a portar-les a terme. Tot i que observen diferències significatives en els valors dels paràmetres escumants en funció del llevat considerat, no es troba cap correlació entre ells. En el treball, no es discuteix quina de les soques (o combinació d'elles) sembla proporcionar uns millors valors, en conjunt, per a les característiques de l'escuma; però, a la vista dels resultats exposats, sí que es podria dir, en funció del temps de cria, quina d'elles és més recomenable.

A més dels criteris tradicionals de selecció d'un llevat per a l'elaboració d'un vi escumós, com ara la capacitat per a portar a terme la presa d'escuma i les característiques enològiques que presenta (producció d'acidesa volàtil i de H₂S, resistència al SO₂, i capacitat floculant i d'adherència al vidre de la botella), Martínez-Rodríguez *et al.* (2001) tenen en compte dos criteris addicionals: la capacitat d'autòlisi i alliberament de compostos al medi (proteïnes i aminoàcids), i l'efecte sobre els paràmetres escumants. De totes maneres, però, el comportament de l'escuma es mesura

en els autolisats obtinguts i no en els vins escumosos elaborats amb els llevats que s'han seleccionat. L'avaluació final es fa a partir de l'anàlisi sensorial dels vins, en la que es valora, de forma subjectiva, l'aparença de l'escuma.

En el present treball es farà un estudi comparatiu de diferents soques de llevat utilitzades per a realitzar la presa d'escuma, amb una especial atenció a les característiques relacionades amb els paràmetres escumants proporcionats pel Mosalux, així com de la incidència en l'apreciació sensorial dels vins escumosos obtinguts.

5.5. Cas especial de fermentació en botella amb llevats immobilitzats

La fermentació dels vins escumosos mitjançant l'ús de llevats immobilitzats en algun tipus de suport, l'eliminació del qual sigui una operació fàcil i ràpida, ha estat proposada amb l'objectiu de simplificar el remogut manual de les botelles (Yokotsuka *et al.*, 1997). El remogut és una operació delicada de la que en depenen l'aspecte i la limpidesa del vi. Tradicionalment s'ha fet de forma manual, en pupitres, per aplicació de successives rotacions parcials de les botelles, acompanyades d'un petit moviment oscil·lant i un augment progressiu de la seva inclinació, amb l'objectiu de fer relliscar i compactar els pòsits al coll de la botella. Com és de suposar, es una operació lenta que pot durar bantant de temps.

Si els llevats es troben immobilitzats en un suport fàcil d'eliminar es pot estalviar una gran quantitat de temps i de treball, tot disminuint els riscos de resuspensió dels sediments. Els anteriors autors han provat com a suport un gel d'alginats de calci, en forma d'una doble capa d'esferes o de fils. Si bé la fermentació es desenvolupa sense cap problema en un cas i altre, l'ús d'esferes és preferible al de fils perquè tant la seva addició com l'eliminació en el desgorjament es veuen facilitades.

En comparació amb l'ús de llevats lliures, no s'han trobat diferències significatives en l'efecte sobre els canvis en la composició química del vi durant la cria. L'alliberament d'aminoàcids lliures durant l'autòlisi dels llevats, per exemple, no es veu modificat. Paràmetres com la concentració d'etanol, pH, acidesa total, acidesa volàtil, sucres reductors i acetat d'etil, no en resulten tampoc alterats. Únicament s'ha observat un petit increment en la concentració d'aldehids, metanol i de tres alcohols superiors, en els vins fermentats amb llevats immobilitzats. La concentració de compostos fenòlics totals, després de 15 mesos de contacte, és pràcticament la mateixa.

D'altra banda, l'anàlisi sensorial dels vins escumosos obtinguts amb un i altre sistema no ha revelat tampoc diferències aromàtiques ni gustatives.

Es veu, doncs, que la utilització de llevats immobilitzats en una doble capa d'esferes d'alginats pot realitzar-se a escala industrial i comercial. A més de la simplificació de les operacions de remogut i desgorjament, el volum final de pòsits està perfectament controlat ja que es correspon amb el volum d'esferes afegides.

De totes maneres, cal tenir en compte uns quants aspectes. Com que el contacte entre els llevats i els sucres de fermentació no és immediat ni homogeni (els llevats estan en el fons de la botella, atrapats dins les esferes), es planteja la possible necessitat d'haver de filtrar prèviament els vins de forma esterilitzant per a que la fermentació no sigui iniciada per altres microorganismes lliures en suspensió. Aquesta filtració, naturalment, podrà repercutir negativament en les propietats de l'escuma. D'altra banda, l'absència d'adjuvants de tiratge (no són necessaris ja que no hi ha problemes d'adherència al vidre) pot ser favorable per a les propietats escumants. Hi ha, doncs, dos efectes contraris que cal ponderar. Les esferes han de ser suficientment resistents com per a no trencar-se (per exemple, durant el creixement dels llevats) ja que en cas de fer-ho es formaria un precipitat polsegós de difícil eliminació. L'autòlisi, en principi, no té per què veure's afectada ja que la permeabilitat de les esferes sembla suficient per a no interferir en la cèl·lula, al medi, dels productes d'autòlisi.

En qualsevol cas, els avenços actuals en l'ús d'adjuvants de tiratge han permès, a més de la mecanització industrial, que el remogut pugui realitzar-se només en qüestió de dies, i en certs casos molt particulars, únicament en unes poques hores. La mecanització ha contribuït també a una major economitzaació d'espai a la cava, ja que en no ser necessaris els pupitres per a la realització del remogut es pot aprofitar millor aquesta superfície. Aquest fet, juntament amb el menor cost econòmic dels adjuvants de tiratge, han fet que la fórmula dels llevats immobilitzats hagi quedat, gairebé, com a anecdòtica.

6. Mètodes de determinació, fraccionament i caracterització dels col·loides del vi

El que defineix l'estat col·loidal és el tamany dels compostos presents en un sistema (Feuillat, 1987). Així, són considerats col·loides les macromolècules i les partícules el tamany de les quals està comprès entre 10^{-9} i 10^{-6} m. Entre els distints col·loides macromoleculars que poden trobar-se en els mostos i els vins estan els polisacàrids i les proteïnes d'origen vegetal, les manoproteïnes alliberades pels llevats, els glucans d'origen fúngic (raïm afectat per *Botrytis cinerea*) i els polisacàrids d'origen bacterià. Les partícules col·loidals, de major tamany, estan formades per agregats de compostos fenòlics, cristalls de sals tartàriques, enterboliments proteics, trencaments metàl·lics en procés de formació, etc.

El vi és una matriu complexa en la que s'hi troben una gran diversitat de substàncies. A més, per a una mateixa família de compostos, la varietat en la composició de les diferents molècules que la conformen pot arribar a ser també molt gran. Per aquest motiu, l'anàlisi directa de moltes de les substàncies no és possible i s'ha de recórrer a mètodes d'aïllament i concentració de manera que les interferències de la matriu siguin mínimes o gairebé inexistentes.

Alguns dels mètodes d'aïllament són la precipitació i la centrifugació (addició, al vi, d'un agent precipitant i separació per centrifugació). Com a agent precipitant s'ha utilitzat, sobretot, l'etanol, però també altres substàncies com el sulfat amònic, l'acetona, l'àcid tricloroacètic i l'àcid perclòric (Canals, 1997). Presenten l'inconvenient de la possible desnaturalització de les molècules que es volen estudiar, a més de ser poc selectius i poder adsorbir compostos de baixa massa molecular, principalment polifenols, que interfereixen en l'anàlisi (Waters *et al.*, 1995). Com a exemple, si s'adiciona alcohol pur a un vi que ha estat clarificat prèviament, s'observa l'aparició d'un enterboliment i la posterior sedimentació d'aquest, en forma d'un precipitat més o menys blanc (Villetaz, 1990). L'alcohol afegit ha provocat la insolubilització d'alguns col·loides, entre els que s'hi troben pectines, polisacàrids neutres, proteïnes i polifenols. El seu pes molecular és generalment elevat, de l'ordre de 10^4 a 10^6 Da. Una precipitació fraccionada amb alcohol, permetria, doncs, la determinació de la concentració de diferents macromolècules en estat col·loidal (Usseglio-Tomasset, 1989).

Altres mètodes d'aïllament són la diàlisi, usada principalment amb finalitat preparativa; permet la separació de les substàncies de baixa massa molecular, en funció del tamany de porus de membrana escollit. Hi ha una dilució de la mostra, i s'haurà de concentrar posteriorment mitjançant un altre mètode. La filtració per gel, o

cromatografia d'exclusió molecular, permet separar els compostos de tamany superior al volum d'exclusió del gel de la resta de substàncies del vi. Finalment, la ultrafiltració és una tècnica que separa també en funció de la massa molecular dels components de la mostra. En vins permet, per exemple, concentrar la fracció col·loidal per tal de caracteritzar-la posteriorment (Pellerin *et al.*, 1994).

El present treball se centra en l'estudi dels col·loides macromoleulars, i més concretament al de proteïnes i glicoproteïnes. Per la seva pròpia naturalesa, tenen un paper destacat en l'adsorció a la interfase de les bombolles i en la seva estabilització, en els vins escumosos. Per tant, són un factor molt important a considerar de cara al comportament escumant del vi. A més, s'ha vist en els capítols anteriors que l'ús de clarificants altera, principalment, la concentració proteica del vi (eliminació de les proteïnes que podrien donar lloc a l'aparició d'enterboliments), i que tant la dosi com el tipus de clarificant utilitzat modifiquen de forma diferent les característiques i el comportament de l'escuma.

En relació als polisacàrids dels mostos i els vins, només dir que existeixen diferents metodologies per a la seva determinació i caracterització. La concentració de polisacàrids sol determinar-se per mesura de l'índex de refracció (Dubourdieu *et al.*, 1986). Altres mètodes estan basats en tècniques colorimètriques (Dubois *et al.*, 1956). Les mesures espectrofotomètriques permeten, a més de la determinació de la concentració total de polisacàrids, diferenciar les fraccions neutra (procedent tant del raïm com dels llevats) i acidòfila (únicament del raïm). També, amb les tècniques de cromatografia líquida (exclusió molecular, intercanvi iònic) i de gasos han pogut estudiar-se els diferents tipus de polisacàrids. López-Barajas *et al.* (1998) proposen l'ús de la HPLC d'exclusió molecular, prèvia precipitació, per a la caracterització de la fracció polisacàrida en mostos i vins.

D'entre els distints additius i adjuvants utilitzats en la indústria enològica, només la goma aràbiga és de naturalesa polisacàrida. S'utilitza per a estabilitzar la matèria colorant del vi, gràcies a la seva acció com a col·loide protector, i està formada per una mescla d'arabinogalactans i arabinogalactanoproteïnes.

A continuació es parlarà dels diferents mètodes utilitzats per a la determinació i caracterització de les proteïnes i glicoproteïnes del vi.

6.1. Quantificació de la proteïna total en mostos i vins

Existeixen diferents mètodes per a la determinació de proteïnes, procedents tots ells d'altres camps de coneixement diferents de l'enologia. L'aplicació en mostos i vins presenta diferents problemes, principalment a causa de la presència d'altres compostos macromoleculars en solució. A més, es té també la gran polidispersitat de masses moleculars que presenten les proteïnes del vi, i les interaccions amb altres substàncies com ara els compostos fenòlics (Somers *et* Ziemelis, 1973; Flanzy, 1998). Les substàncies nitrogenades d'inferior massa molecular són una altra font d'interferència. Per aquest motiu, en molts dels mètodes hi sol haver un pas previ de purificació de la mostra i eliminació de la matriu interferent (Correa *et* Polo, 1991).

En funció del mètode utilitzat per a la determinació de la concentració proteica d'un vi o un most, els valors que es poden trobar a la bibliografia són molt dispars (Canals, 1997). Això fa que les comparacions entre els valors donats per uns autors o uns altres siguin difícils.

Tot seguit es descriuen els mètodes més utilitzats en la indústria enològica per a la determinació de proteïnes.

6.1.1. Nitrogen total pel mètode de Kjeldahl

Es fa per mineralització de la mostra amb àcid sulfúric en presència d'un catalitzador de seleni o mercuri. A continuació s'ajusta el pH fins a neutralitat i es destil·la, recollint l'amoníac sobre àcid bòric o àcid sulfúric, en forma de sal amònica. En el cas de l'àcid bòric es valora amb àcid clorhídric en presència de vermell de metil, i si es recull sobre àcid sulfúric es valora l'excés d'àcid amb hidròxid sòdic i vermell de fenol com a indicador. La presència en el vi d'altres substàncies nitrogenades (vitamines, sals amoniacals, aminoàcids, oligopèptids, amines i nitrats) fa que hi hagi una sobreestimació de la concentració real de proteïnes. Alguns autors proposen aïllar la fracció proteica i realitzar la determinació del nitrogen total sobre aquesta fracció (Somers i Ziemelis, 1973). Tot i la precisió del mètode, el principal defecte és la seva lentitud.

6.1.2. Mètode de Biuret

Aquest mètode es basa en la reacció característica del sulfat de coure amb els enllaços peptídics de les proteïnes, en medi alcalí. La intensitat de la coloració depèn del nombre d'enllaços peptídics per gram de proteïna, però és independent de la seva massa molecular. El màxim d'absorció es dona a 545 nm. Es fa una sobreestimació de la concentració proteica a causa de la interferència dels pèptids i de la reacció del Cu^{2+} amb els compostos fenòlics que, tot i no donar el mateix espectre d'absorció, influeix en la lectura de l'anàlisi.

La purificació prèvia de la mostra és imprescindible per a la fiabilitat d'aquest mètode (Correa *et* Polo, 1991). Una de les modificacions proposada és restar, al valor d'absorbància de la mostra junt amb el reactiu, el valor que dona la mateixa mostra sense el CuSO_4 . Es troben resultats compresos entre 20 i 260 mg/l per a mostos procedents de varietats blanques, i de 30 a 275 mg/l en vins blancs.

6.1.3. Mètode de Lowry

Es basa en la capacitat dels complexos de coure i proteïna per reduir el reactiu de Folin Ciocalteu. El mateix autor (Lowry *et al.*, 1951) cita la interferència dels compostos fenòlics (de fet, la mesura de la seva concentració pot determinar-se també amb l'índex de Folin). Una variació del mètode consisteix en corregir el valor de l'anàlisi de Lowry (proteïnes i fenols) amb el valor que s'obté pel reactiu de Folin sense afegir coure (fenols). Si la concentració de fenols és elevada, s'aconsella primer precipitar-los i rentar amb etanol al 67%, per tal d'eliminar aquesta interferència. Alguns dels valors recollits per Canals (1997) són: 500 mg/l en vins model, amb concentracions molt menors després d'una diàlisi, atribuïnt la variació als petits pèptids (Baily i Berg, 1967); en vins portuguesos es troben valors entre 285 i 502 mg/l, prèvia separació dels col·loides per exclusió molecular en un gel Sephadex G-25 (Dorrestein *et al.*, 1995). Aquests valors tan alts podrien explicar-se a causa de l'adsorció de polifenols (Correa *et* Polo, 1991; Waters *et al.*, 1995).

6.1.4. Espectres d'absorció UV

Donada la gran varietat de compostos presents en el vi, no és possible la determinació directa de les proteïnes mitjançant la lectura de l'absorbància a 280 nm, longitud d'ona típica en la detecció d'aquestes. No obstant, alguns autors utilitzen la

lectura a 280 nm del pic que apareix en el volum d'exclusió d'una columna amb rebliment de Sephadex G-25 (Somers *et Ziemelis*, 1973). Aquest mètode està basat en la baixa contribució dels compostos fenòlics en l'espectre ultraviolat dels vins blancs. La quantificació es fa a partir d'un calibrat previ amb albúmina de sèrum boví (BSA), i les concentracions de proteïna trobades en vins varien entre 50 i 840 mg/l.

Dubourdieu *et al.* (1986) fan una variació del mètode original utilitzant tècniques de cromatografia líquida d'alta eficàcia d'exclusió molecular, amb dues columnes de diferent tall muntades en sèrie. La concentració de proteïna es fa per mesura de l'absorció a 225 nm, a partir també d'un calibrat amb BSA. Troben valors compresos entre 346 mg/l per a un vi blanc en rama i de 29 mg/l per a un vi estabilitzat. Amb els mètodes espectrofotomètrics de lectura directa, els valors de concentració de proteïna solen ser bastant elevats, segurament per la interferència d'altres compostos com ara polisacàrids (Correa *et Polo*, 1991).

6.1.5. Mètode de Bradford

El mètode proposat per Bradford (1976) és actualment el més utilitzat en enologia per a la determinació directa de proteïnes, tant per la seva rapidesa com per la reproducibilitat. S'utilitza el colorant blau brillant de Coomassie (BBC) G-250, el qual s'uneix a la proteïna formant un complex de color blau amb un màxim d'absorció a 595 nm. Usat directament sobre la mostra, Hsu *et Heatherbell* (1987) troben valors de 58 mg BSA/l en mostos i de 29 mg BSA/l en vins.

La velocitat de formació del complex proteïna-BBC G-250 en vins és més lenta que en altres tipus de mostres, com a conseqüència de la unió del grups carregats de les proteïnes amb els compostos fenòlics (Murphey *et al.*, 1989). Segons aquests autors, donada la complexitat de la interacció, el temps òptim de reacció depèn del tipus de vi, i recomanen un temps mínim d'incubació de 55 minuts, a temperatura ambient. Hi ha autors que proposen una separació prèvia de les proteïnes en una columna de Sephadex G-25 (Brenna *et De Vecchi*, 1990), i a més observen que el temps de reacció no influeix, ja que l'absorbància gairebé no canvia entre 10 i 80 minuts, mentre que la lectura de l'espectrofotòmetre augmenta amb la relació volumètrica entre la mostra i el reactiu.

En mostos de diferents zones d'Espanya, Gonzalez-Lara *et al.* (1989) troben concentracions entre 15 i 45 mg BSA/l, utilitzant el mètode de Bradford. En varietats

viníferes de la regió del Cava per a l'elaboració d'escumosos, Pueyo *et al.*, (1993) troben concentracions d'entre 20 i 50 mg/l en mostos i entre 6 i 16 mg/l en vins.

En un estudi sobre les interferències que afecten aquest mètode, es veu que hi ha una gran quantitat de substàncies que no es corresponen amb proteïnes (ja que atravessen les membranes d'ultrafiltració amb tall de 10 kDa) i que reaccionen amb el BBC, en una proporció que pot variar del 30 al 90% del valor inicial (Marchal *et al.*, 1997). Entre els més importants hi trobam l'etanol i els compostos fenòlics. La interferència no és additiva. A més, l'ús de bentonita o de carbó actiu com a tractament desproteïntzant presenta un efecte diferent en la mesura de la relació $A_{520\text{nm}}/A_{595\text{nm}}$, que proporciona l'estimació d'equivalents de BSA. Els autors proposen una variació del mètode, realitzant les mesures de la absorbància a 595nm abans i després d'ultrafiltrar el vi (3 i 10 kDa de tamany de tall molecular).

En una comparació entre el mètode de Bradford i el de Lowry en una mateixa mostra de vi, prèvia precipitació amb etanol, es troben valors compresos entre 13 i 42 mg/L per a la concentració de proteïnes segons el primer mètode, i entre 47 i 278 mg/L pel segon mètode. Es veu, per tant, que la comparació no és possible.

6.1.6. Altres mètodes

S'ha proposat la determinació de la quantitat total de proteïna a partir dels aminoàcids constituents, separats i quantificats per cromatografia líquida d'alta eficàcia, prèvia hidròlisi àcida (Yokotsuka *et al.*, 1977). S'utilitza la reacció amb la ninhidrina o amb 1-fluoro-2,4-dinitrobenzè (DNFB). La detecció pot fer-se per fluorescència, una vegada obtinguts els corresponents derivats fluorescents de cada aminoàcid.

Waters *et al.* (1991) comparen les concentracions obtingudes amb el mètode de Bradford i les obtingudes per suma dels aminoàcids. Constaten una baixa reactivitat de les diferents fraccions proteiques del vi (separades per precipitació amb sulfat d'amoni) amb el blau brillant de Coomassie G-250, respecte del mateix càlcul de la concentració a partir de la suma dels aminoàcids. Les dades de l'anàlisi de Bradford varien entre un 20% i un 50% respecte del valor calculat per la suma d'aminoàcids, en funció de la fracció proteica considerada.

En qualsevol cas, el mètode de Bradford continua essent el mètode majoritàriament utilitzat pels investigadors en la determinació de la concentració

proteica del vi. Alguns autors introdueixen alguna modificació per tal d'eliminar la interferència d'altres substàncies. La falta de consens, però, en la consideració d'un únic mètode de referència per part de la comunitat científica per a la determinació de les proteïnes del vi fa que les comparacions no siguin possibles i que els resultats obtinguts per uns i altres s'hagin d'interpretar amb molta precaució a l'hora d'extreure'n conclusions.

6.1.7. Resum de quantificació de diferents autors

Com a mostra de la gran variabilitat en la determinació de la concentració de proteïnes en vins i mostos, a la taula 3 (Canals, 1997) es reflecteixen alguns dels valors obtinguts per a diferents varietats viníferes i la metodologia emprada per cada autor. Les concentracions estan expressades en mg/l, utilitzant albúmina de sèrum boví com a estàndard en el cas de les mesures fetes amb corbes de calibrat.

Varietat vinífera	most	vi	Referència	Metodologia
Chardonnay	85-100	108 2-6 89-105 52 8 7	Feuillat i col., 1995 Brissonnet i Maujean, 1991 Bayly i Berg, 1967 Lubbers i col., 1995 Malvy i col., 1994 Marchal i col., 1996	Bradford diàlisi+Bradford modificat diàlisi+Biuret modificat ultrafiltració+Lowry Bradford Bradford
Sauvignon	9 80	27 72 79	Anelli, 1977 Hsu i Heatherbell, 1987a Bayly i Berg, 1967 Feuillat i col., 1995	dessalat+Kjeldahl Bradford diàlisi+Biuret modificat Bradford
Sémillon	11 55	30	Anelli, 1977 Bayly i Berg, 1967	dessalat+Kjeldahl diàlisi+Biuret modificat
Riesling	9 40 39-49 68-110	2 28-34 39-80 30 28-36	Yokotsuka i col., 1977 Anelli, 1977 Yokotsuka i col., 1978 Hsu i col., 1987 Murphey i col., 1989b Flores i col., 1990 Hsu i Heatherbell, 1987b	TCA+ negre amido 10A dessalat+Kjeldahl suma aminoàcids Bradford Bradford Bradford Bradford
Gewürztraminer	77 69-118	41 44-59 54-62 65-100 52-60 260	Hsu i Heatherbell, 1987a Hsu i Heatherbell, 1987b Hsu i col., 1987 Murphey i col., 1989b Flores i col., 1990 Dawes i col., 1994	Bradford Bradford Bradford Bradford Bradford Bradford modificat
Garnatxa	1-2 15-19		Correa i col., 1988 Gonzalez-Lara i col., 1989	Diàlisi+Bradford Bradford
Ull de llebre	3 10-27		Correa i col., 1988 Gonzalez-Lara i col., 1989	Diàlisi+Bradford Bradford
Airen	1-5 15-28		Correa i col., 1988 Gonzalez-Lara i col., 1989	Diàlisi+Bradford Bradford

Varietat vinífera	most	vi	Referència	Metodologia
Macabeu	3 21 23-38	7-13	Correa i col., 1988 Gonzalez-Lara i col., 1989 Pueyo i col., 1993	Diàlisi+Bradford Bradford Bradford
Xarel·lo	3-4 41-50	14-16	Correa i col., 1988 Pueyo i col., 1993	Diàlisi+Bradford Bradford
Parellada	20-42	6-7	Pueyo i col., 1993	Bradford
Malvar	50	31-45	Pueyo i col., 1993	Bradford
Zalema	26		Gonzalez-Lara i col., 1989	Bradford
Pedro ximenez	45		Gonzalez-Lara i col., 1989	Bradford
Cabernet sauvignon	22-30	70	Gonzalez-Lara i col., 1989 Yokotsuka i col., 1994	Bradford diàlisi+microkjeldahl
Merlot	45	48	Gonzalez-Lara i col., 1989 Yokotsuka i col., 1994	Bradford diàlisi+microkjeldahl
Pinot noir		77	Yokotsuka i col., 1994	diàlisi+microkjeldahl
Pinot blanc		95	Bayly i Berg, 1967	diàlisi+Biuret modificat
Sylvaner	90	70 20	Bayly i Berg, 1967 Hsu i Heatherbell, 1987b	diàlisi+Biuret modificat Bradford
Muscat Bayle A		44-57	Yokotsuka i col., 1994	diàlisi+microkjeldahl
Arinto		287	Dorrestein i col., 1995	desalatge+Lowry
Bical		422	Dorrestein i col., 1995	desalatge+Lowry
Fernao pires		503	Dorrestein i col., 1995	desalatge+Lowry
Vital		285	Dorrestein i col., 1995	desalatge+Lowry
Colombard	90		Bayly i Berg, 1967	diàlisi+Biuret modificat
Muscat:				
Moscatel	40-41		Gonzalez-Lara i col., 1989	Bradford
Higgins	33		Lamikanra, 1987	ninhidrina
Carlos	79	14	Lamikanra i Inyang, 1988	ninhidrina
Canelli	80	72	Bayly i Berg, 1967	diàlisi+Biuret modificat
Welder	133	30	Lamikanra i Inyang, 1988	ninhidrina
d'Alexandrie		113	Waters i col., 1992	Bradford modificat
	260	233	Bayly i Berg, 1967	diàlisi+Biuret modificat
		269	Somers i Ziemelis, 1973	dessalat+UV 280 nm

Taula 3 - Concentració de proteïna en vins i mostos procedents de diferents varietats viníferes, en funció de la metodologia emprada per cada autor. Les concentracions estan expressades en mg/l de BSA en el cas de les mesures fetes amb corbes de calibrat. (font: Canals, 1997)

6.2. Mètodes utilitzats per a la separació i caracterització de proteïnes en mostos i vins

Les propietats físico-químiques que permeten separar substàncies com les proteïnes i/o polipèptids són la massa, la càrrega i, en menys mesura, la hidrofobicitat. També poden utilitzar-se certs tipus d'interaccions específiques amb una part de la proteïna, com en el cas de les manoproteïnes. L'anfoteritat de les proteïnes fa que la seva càrrega pugui variar en funció del pH del medi on es troben, la qual cosa permet separar-les també en funció del seu punt isoelectric.

La separació i caracterització de les proteïnes en enologia s'ha realitzat, principalment, amb dos tipus de tècniques: les de cromatografia líquida i les d'electroforesi.

Les tècniques de cromatografia líquida es poden classificar en funció de la pressió de treball. En columna oberta s'elueix a pressió atmosfèrica. En la cromatografia líquida de baixa pressió (FPLC), les pressions de treball són d'entre 10 i 15 bar, i és de gran utilitat per a la separació de macromolècules. En la cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC), les pressions de treball van de 100 a 150 bar.

Les tècniques electroforètiques es caracteritzen per fraccionar la mostra mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric. Es divideixen en dos grups, en funció del suport utilitzat. Els gels de poliacrilamida són molt útils per la diversitat de tall de porus que es pot aconseguir en funció dels percentatges d'acrilamida i bisacrilamida utilitzats en la seva fabricació. El tamany de porus suposa un impediment estèric en la separació de les proteïnes respecte de la seva mobilitat electroforètica. Es parla d'electroforesi nadiua (PAGE) quan aquesta mobilitat vé donada per la relació càrrega-massa de la proteïna: a més càrrega més mobilitat, i a més massa més impediment estèric i, per tant, menys mobilitat. Si s'addicionen substàncies desnaturalitzants com el dodecilsulfat de sodi (SDS), que provoquen un augment de la càrrega de la proteïna, proporcional a la seva massa molecular, la mobilitat únicament depèn d'aquesta massa, i es parla d'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE). També es poden afegir tampons que provoquin un gradient de pH a través del gel, de manera que les proteïnes perden la seva mobilitat quan arriben a la zona on el pH és igual al seu punt isoelèctric. Aquesta tècnica s'anomena isoelectroforesi o també isoelectroenfocament.

La tècnica electroforètica més moderna per a caracteritzar les proteïnes del vi és l'electroforesi capil·lar, en la que la separació es dona dins un tub capil·lar de sílice fosa, l'interior del qual pot modificar-se amb l'ús de distints rebliments, en funció del tipus de separació que es vol realitzar.

6.2.1. Cromatografia líquida de proteïnes (FPLC)

La cromatografia líquida de proteïnes és una optimització de la cromatografia líquida en columna oberta (Canals *et al.*, 1997), en la que es treballa a pressions de 10 a 15 bar. Per aquest motiu, els gels han de ser més rígids, però s'aconsegueix una millor resolució i rapidesa de separació. Aquesta tècnica presenta dos grans avantatges: poder disposar d'una gran varietat de medis de separació, i el seu caràcter tant preparatiu com analític, que permet utilitzar-la en molts casos com a tècnica prèvia per a una total caracterització de la mostra. Algunes de les aplicacions possibles són la cromatografia

d'exclusió molecular, la de bescanvi iònic i la d'afinitat, la separació en fase reversa i la cromatografia d'interacció hidrofòbica.

6.2.1.1. Filtració per gel o exclusió molecular

Els gels d'exclusió molecular permeten separar les macromolècules en funció de la seva massa molecular (Dale *et al.* Young, 1992). En l'estudi de proteïnes presenta varies aplicacions: purificació de la mostra, determinació de masses moleculars i l'estudi de distribucions de masses moleculars. La primera aplicació té un caràcter totalment preparatiu, ja sigui per determinar la concentració total de proteïna o per permetre el fraccionament posterior de la mostra.

6.2.1.2. Bescanvi iònic

Hi ha dos tipus de matrius en funció de que es treballi amb cromatografia de bescanvi catiònic (la matriu presenta càrrega negativa, intercanvi de cations) o amb cromatografia de bescanvi aniònic (càrrega positiva, intercanvi d'anions). A la taula 4 es poden veure els grups carregats més habituals.

bescanvi catiònic	grup funcional
Carboximetil (CM-)	$-\text{OCH}_2\text{COO}^-$
Fosfo	$-\text{PO}_4\text{H}_2^-$
Sulfopropil (SP-)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
bescanvi aniònic	
Aminoetil (AE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$
Dietilaminoetil (DEAE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
Quaternari aminoetil (QAE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$

Taula 4 - Grups carregats més habituals en bescanvi iònic

El fet que les proteïnes siguin unes substàncies anfòteres permet que es puguin usar els dos tipus de bescanvi iònic per a la seva separació, tot ajustant el pH de treball. Pot utilitzar-se com a tècnica preparativa o analítica.

A partir d'una fracció separada prèviament per FPLC d'exclusió molecular, Canals *et al.* (1996) han usat la cromatografia de bescanvi catiònic per a separar les diferents proteïnes d'aquesta fracció (a l'electroforesi en gels de poliacrilamida apareixia com a una única banda gruixuda), a més de poder establir diferències varietals

a partir del seu perfil. Es pot seguir, també, l'evolució de la concentració de proteïnes en el transcurs de la vinificació, el que permet veure que són les proteïnes amb més càrrega les que s'eliminen primer, resultat lògic si es té en compte que la interacció amb la bentonita és electrostàtica, i per tant seran més reactives.

D'altra banda, Luguera *et al.* (1998) han fet ús del bescanvi aniònic per a l'estudi de les proteïnes d'un vi escumós. L'han utilitzat també com a tècnica preparativa per a la caracterització posterior per isoelectroenfocament i per electroforesi capil·lar. De les diferents fraccions separades, la majoria corresponen a proteïnes, però algunes semblen estar formades per compostos fenòlics. Al llarg de l'elaboració del vi observen una disminució de la concentració de proteïnes, preferentment les que presenten una menor afinitat pels grups carregats de la columna, o sigui, les que presenten una menor càrrega negativa neta, resultats que concorden amb els trobats anteriorment per Canals *et al.* (1996). No observen canvis en els perfils proteics dels vins escumosos durant la criança en contacte amb els llevats.

6.2.1.3. Altres rebliments

L'isoelectroenfocament en columna o cromatoenfocament també ha donat bons resultats en l'anàlisi de vins i mostos (Anelli, 1977; Marchal *et al.*, 1996). Consisteix en una resina que presenta càrregues positives i negatives en la qual, a un pH inicial, s'hi uneixen totes les proteïnes; mitjançant l'aplicació d'un gradient de pH cada proteïna se separa en funció del seu pI.

La cromatografia d'afinitat s'ha emprat en la separació de glicoproteïnes. Amb l'ús d'un lligand específic es pot retenir una molècula o família de molècules. Per a les glicoproteïnes s'utilitza una lectina, la concanavalina A, que té afinitat per les molècules que contenen α -D-manosa, α -D-glucosa o altres molècules d'estructura similar, amb grups hidroxil en C3, C4 i C5 estèricament possibles. Aquesta aplicació ha estat usada en la separació de manoproteïnes (Waters *et al.*, 1993, 1994; Moine-Ledoux *et al.*, 1997).

6.2.2. Electroforesi en gels de poliacrilamida

Les tècniques d'electroforesi són les que més dades han aportat sobre les característiques de les proteïnes presents en mostos i vins. Una bona resolució depèn de

diferents paràmetres experimentals: el suport utilitzat, el sistema de tampons i la intensitat del camp elèctric que provoca la migració de les proteïnes. Alguns suports usats són: el paper, els gels d'agarosa i, especialment, els gels de poliacrilamida gràcies a l'avantatge que presenta el fet de poder controlar a voluntat el diàmetre de porus del gel, en funció de la concentració d'acrilamida i bis-acrilamida utilitzades en la seva fabricació. Una vegada separades, la detecció de les proteïnes pot fer-se amb distints tipus de tincions (Blau Brillant de Coomassie, nitrat de plata, àcid periòdic i reactiu de Schiff) o per transferència a membranes de nitrocel·lulosa i posteriors reaccions sobre aquesta.

Els tres tipus d'electroforesi més usats en la separació de les proteïnes del vi són:

1- Electroforesi nadiua (PAGE). La separació es fa en funció de la relació càrrega-massa (Correa *et al.*, 1988); les proteïnes amb més mobilitat seran les de petit tamany i càrrega elevada. No provoca la desnaturalització de les proteïnes però no aporta massa informació, ja que presenten la mateixa mobilitat electroforètica una proteïna de baixa massa molecular poc carregada o una d'alta massa molecular i elevada densitat de càrrega.

2- Electroforesi amb agents desnaturalitzants (SDS-PAGE). S'afegeix un agent desnaturalitzant que s'uneix a les proteïnes de forma proporcional al seu tamany. El desnaturalitzant més utilitzat és el dodecilsulfat de sodi o SDS (Waters *et al.*, 1994; Canals *et al.*, 1996). Si es treballa a baixa temperatura (4°C) és preferible la sal de liti (LDS) gràcies a la seva major solubilitat (Hsu *et al.*, 1987). No és utilitzatble com a tècnica preparativa ja que provoca la desnaturalització de la mostra. El fet que les proteïnes presentin una major o menor càrrega en funció del seu tamany (la relació càrrega/massa és la mateixa en totes elles) fa que la separació es doni únicament per criteris estèrics. En la separació d'una mescla de proteïnes és de gran importància el diàmetre de porus elegit per al gel, i és possible l'ús de gels amb gradients de porositat.

3- Isoelectroenfocament en gels de poliacrilamida (IEF-PAGE). La separació es fa en funció del punt isoelèctric de les molècules (Brissonet *et al.*, 1993). S'acondiiona el gel amb un gradient de pH, utilitzant una barreja de diferents anfòlits. Les proteïnes de la mostra migren per acció del camp elèctric aplicat fins que la seva càrrega neta s'anul·la, quan el pH es correspon amb el seu pI. L'isoelectroenfocament dóna informació sobre el caràcter àcid o bàsic de les proteïnes d'una mostra. Pot combinar-se amb la SDS-PAGE per tal d'obtenir informació sobre el pI i la massa molecular de les proteïnes (electroforesi bidimensional).

Una vegada separades les proteïnes, cal revelar el gel per poder veure les diferents bandes. Dels distints tipus de tincions, les més utilitzades són: la del blau brillant de Coomassie, més assequible; la de nitrat de plata, més sensible; i la de l'àcid periòdic-Schiff, que és exclusiva per a glicoproteïnes (Waters *et al.*, 1993).

Una sèrie de treballs que han marcat la caracterització de proteïnes en vins i mostos han estat els de Hsu *et Heatherbell* (1987). Aquests autors separen proteïnes procedents del raïm, del most i del vi usant les tècniques de LDS-PAGE i IEF-PAGE bidimensional, seguides de tinció amb nitrat de plata i detecció de glicoproteïnes mitjançant una transferència a membranes de nitrocel·lulosa i reacció amb lectines. En la separació per punt isoelèctric observen un predomini de les proteïnes àcides, amb pI comprès entre 4 i 6. Waters *et al.* (1990;1995) utilitzen de forma preparativa la HPLC d'exclusió molecular i la cromatografia líquida de bescanvi aniònic per a posteriorment separar les proteïnes per SDS-PAGE, visualitzades amb nitrat de plata..

La SDS-PAGE i tinció amb nitrat de plata s'ha utilitzat també en la caracterització de vins base per a *champagne* (Brissonet *et Maujean*, 1993). S'observen bandes entre 9.6 i 60 kDa, la majoria d'elles entre 20 i 30 kDa. En la separació per IEF-PAGE s'obtenen, a més, bandes entre 3.5 i 7.6 kDa. Marchal *et al.* (1996), mitjançant tinció amb àcid periòdic-Schiff i cromatografia d'afinitat, comproven que varies de les fraccions separades contenen una part glicídica i que algunes d'elles procedeixen del propi raïm ja que es troben també en l'anàlisi del most.

Les glicoproteïnes han estat estudiades també en vins negres japonesos (Yokotsuka *et al.*, 1994). Si es compara el percentatge de proteïna de cada banda del gel amb el que s'obté per suma dels aminoàcids, es troba una incorcondància. S'explica per la diferent reacció de cada una d'elles amb el blau brillant de Coomassie. En aquest sentit, Waters *et al.* (1994) aïllen una manoproteïna d'elevada massa molecular d'un vi negre per SDS-PAGE, la qual no es tenyeix amb blau brillant de Coomassie però sí amb àcid periòdic-Schiff.

En la separació de proteïnes de mostos de diferents varietats viníferes, Correa *et al.* (1988) veuen que algunes de les bandes són revelades únicament pel nitrat de plata i d'altres només pel blau brillant de Coomassie, tot i que el nombre de bandes és similar per PAGE i per SDS-PAGE, amb els dos tipus de tinció. En mostos de varietats pròpies dels vins base per a cava, diferents autors troben lleugeres diferències en la distribució de masses moleculars i dels punts isoelèctrics de les proteïnes separades per PAGE i SDS-PAGE, per a anyades distintes, (Correa-Gorospe *et al.*, 1991; Pueyo *et al.*, 1993).

Canals *et al.*, (1996), en un estudi dels mostos i vins base per a cava procedents de les varietats blanques macabeu, xarel·lo, parellada, chardonnay i pinot noir, troben per SDS-PAGE dues bandes corresponents a masses moleculars de 20-30 kDa i 60 kDa. En l'anàlisi per FPLC d'exclusió molecular de les mateixes mostres es veuen 4 pics ben definits. Com que han pogut col·lectar-se les fraccions corresponents a cada un dels quatre pics, una vegada liofilitzats i separats de forma independent per SDS-PAGE, comproven que la fracció 2 es correspon amb la banda de 60 kDa i la fracció 3 amb la de 20-30 kDa. Aquestes dues fraccions es tornen a liofilitzar i resuspendre per analitzar-les posteriorment per FPLC d'intercanvi catiònic. Per a la fracció 2 s'observa un únic pic, el que fa pensar que es tracta d'una única proteïna, mentre que per a la fracció 3 s'obté un nombre variable de pics en funció de la varietat vinífera considerada. L'anàlisi per SDS-PAGE de cada un dels pics col·lectats novament dona lloc a un conjunt de bandes electroforètiques perfectament definides, el que indica que aquesta fracció de 20-30 kDa correspon en realitat a un conjunt de proteïnes de massa molecular similar però de diferent càrrega elèctrica.

6.2.3. Electroforesi capil·lar

L'electroforesi capil·lar es pot utilitzar per a separar distints tipus de substàncies, com ara pèptids, proteïnes, àcids orgànics, compostos fenòlics, etc (Dizy *et Bisson*, 1999). Presenta els avantatges, en relació a altres tècniques analítiques, de necessitar un volum de mostra i de reactius molt petit (de 5 a 30 microlitres, amb un volum efectiu d'injecció comprès entre 5 i 50 nanolitres). En comparació amb les formes tradicionals d'electroforesi, els temps d'anàlisi poden ser molt inferiors: en funció de la longitud del capil·lar, el voltatge aplicat i la mobilitat dels components de la mostra, es possible efectuar una separació en tan sols uns minuts.

Existeixen diferents modalitats d'electroforesi capil·lar, però en totes elles s'utilitza un capil·lar de sílice fosa, en el que és possible l'ús de rebliments varis segons el tipus de separació que es vol realitzar (BECKMAN, 1991). La mostra s'injecta per pressió, buit o per aplicació de voltatge, i és precisament l'aplicació d'un voltatge relativament alt el que provoca la migració diferencial dels components de la mostra dins el capil·lar. A mesura que passen per la finestra del capil·lar, on es troba el detector (UV, LIF, matriu de fotodiodes de múltiples longituds d'ona, etc), es fa una mesura de l'absorbància i es transmet el senyal a un ordinador, enregistrador, integrador o sistema de dades extern. El senyal es projecta gràficament en forma d'electroferograma.

L'electroforesis capil·lar s'ha utilitzat amb èxit en la separació de proteïnes de diferent origen, com ara en mostres de fluids humans, productes agrícoles i aliments variats (Dolnik *et* Hutterer, 2001). A causa, però, de la novetat d'aquesta tècnica, no existeixen encara gaires treballs aplicats a l'enologia relacionats amb la separació de proteïnes. A continuació es descriurà l'electroforesi capil·lar de zona, com a principal tècnica usada en la separació de proteïnes en vins, i una breu descripció de les altres modalitats d'electroforesi capil·lar i algunes de les seves aplicacions.

6.2.3.1. Electroforesi capil·lar de zona o lliure

És la forma més simple d'electroforesi capil·lar. La separació es fa en funció de la relació càrrega-massa de les substàncies que es volen separar. Quan s'aplica un voltatge a un tub capil·lar de sílice fosa, ple d'una solució uniforme d'electrolit, la separació es dona com a conseqüència de l'acció combinada de la migració electroforètica i del flux electrosmòtic (BECKMAN, 1991). Quan la solució d'electrolit té un pH superior a 1.5, els grups silanol de la superfície interna del capil·lar presenten càrrega negativa, de manera que els cations de l'electrolit resulten atrets cap a la paret del capil·lar formant, així, una doble capa elèctrica. El flux electrosmòtic és el moviment net de la solució d'electrolit cap al càtode provocat per l'aplicació d'un voltatge. A la figura 18 es representa el flux electrosmòtic en el capil·lar. Els grups silanol àcids confereixen una càrrega negativa a la paret. Els ions de càrrega oposada migren cap al càtode, arrastrant amb ells el solvent.

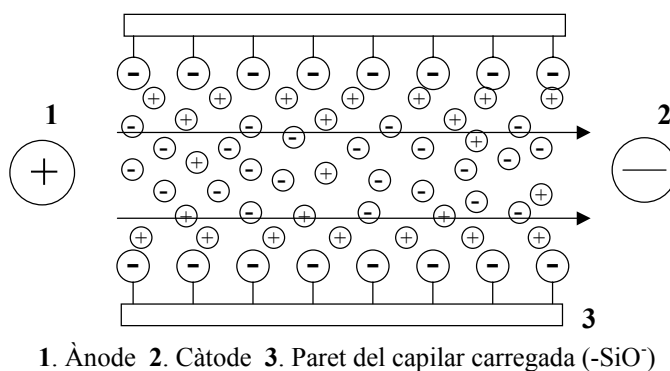


Figura 18 – Representació esquemàtica de l'acció del flux electrosmòtic

Donat que el flux electrosmòtic és generalment d'una magnitud major que la migració electroforètica, tant els analits positius com els negatius migraran cap al càtode. De totes formes, les molècules carregades positivament hi arriben primer, de manera que la separació és possible.

En la separació d'anions en condicions de zona lliure normals, el flux electrosmòtic de la solució d'electrolit pot moure's en direcció oposada a la de la migració electroforètica. A més, es pot invertir la direcció del flux electrosmòtic canviant la polaritat dels electrodes o bé amb l'ús d'additius químics "actius en superfície" juntament amb l'electrolit, el que provoca que s'inverteixi la càrrega de la paret del capil·lar.

El temps necessari per a que les molècules de la mostra arribin al detector depèn de diversos factors: longitud del capil·lar, mobilitat electroforètica de les molècules, l'electrolit utilitzat, l'ús de columnes de pretractament i el voltatge aplicat. Aquest temps de migració es veu afectat també pel tamany, forma i càrrega de les partícules, la concentració de l'electrolit, el pH de la solució i el diàmetre del capil·lar. L'electroforesi capil·lar zonal és molt útil per a separar pèptids i proteïnes, ions i petites molècules carregades. Pot assimilar-se a l'electroforesi nadiua en gels de poliàcrilamida (PAGE).

L'electroforesi capil·lar de zona ha estat la tècnica utilitzada per a la separació de proteïnes en vins i mostos. Entre els primers treballs hi ha els de Ledoux *et* Dubourdiou (1992), que separen les proteïnes d'un vi blanc de la varietat Sauvignon, prèvia diàlisi de la mostra. La quantificació es fa a partir d'una corba de calibrat amb BSA, i troben un valor de 216 mg/l per a la suma de tots els pics. Els mateixos autors observen diferències en el perfil dels electroferogrames de diferents varietats viníferes (Sauvignon, Sémillon i Muscadelle).

Les condicions de separació i de preparació de la mostra afecten de forma molt significativa els perfils de proteïna obtinguts (Oda *et* Landers, 1994).

Luguera *et al.* (1997) recorren a la diàlisi i posterior liofilització per tal d'aïllar i concentrar les proteïnes d'un vi blanc abans d'analitzarles per electroforesi capil·lar de zona. Troben unes condicions òptimes de separació a pH 8 i un voltatge aplicat de 12 kV. A partir dels electroferogrames obtinguts han pogut fer un seguiment dels perfils proteics en els distints nivells d'elaboració d'un vi escumós: most, vi base, presa d'escuma i cria en botella. Així, han observat que durant aquest procés hi ha variacions tant en la intensitat com en el nombre de pics (desaparició d'uns i aparició d'altres). Els resultats s'han comparat amb els obtinguts per electroforesi nadiua en gels de poliàcrilamida (PAGE) i tinció amb blau de Coomassie i nitrat de plata, i s'ha vist que en alguns casos, tot i ser similars en quant al nombre de bandes o pics observats en un cas i altre, amb l'electroforesi capil·lar es té una major sensibilitat i resolució.

Els perfils proteics de vins de diferents varietats ha estat estudiat usant l'electroforesi capil·lar de zona, i per a diferents condicions d'anàlisi (Dizy *et Bisson*, 1999). En l'anàlisi directa del vi han comprovat que hi ha substàncies de naturalesa no proteica que també absorbeixen en el rang UV. Per aquest motiu, han fet una separació per ultrafiltració, de manera que la fracció rica en proteïnes pogués analitzar-se sense la interferència de les substàncies de menor massa molecular. Els perfils electroforètics de cada una de les varietats són diferents, i per tant, aquesta tècnica pot ser utilitzada per a diferenciar-les. La naturalesa del tampó utilitzat altera tant la intensitat dels pics com el seu nombre, de forma que el perfil proteic en resulta igualment alterat.

Tots aquests resultats mostren que l'electroforesi capil·lar de zona és una tècnica excel·lent per a l'anàlisi de les proteïnes del vi ja que proporciona una major informació, a més de ser més precisa, en comparació amb altres tècniques tradicionals d'anàlisi.

6.2.3.2. Altres modalitats d'electroforesi capil·lar

Electroforesi capil·lar de gel

El reblliment del capil·lar amb gels de poliacrilamida (o nous polímers més estables als elevats camps elèctrics aplicats) és necessari per a la separació en funció del tamany molecular de diferents substàncies. La composició del gel determinarà el diàmetre de tall per a aconseguir la separació. Els materials més utilitzats són els formats per polímers reemplaçables de forma automàtica mitjançant un rentat per pressió.

Presenta algunes diferències importants respecte de l'electroforesi capil·lar de zona lliure: la separació no depèn del moviment de fluïd cap a l'electrode sinó de l'acció de sedàs dels analits carregats que migren cap a la matriu del gel. La velocitat de migració es veurà afectada per la porositat del gel, el tamany de l'analit, la massa i la relació càrrega/massa d'aquest, a més de la pròpia mobilitat electroforètica. El voltatge és un factor limitant ja que camps elèctrics superiors a 500V/cm poden causar una degradació del reblliment per escalfament. Les principals aplicacions d'aquesta tècnica són la separació de proteïnes, com a una de les principals alternatives a la separació per SDS-PAGE (Guttman, 1996), i la de fragments d'àcids nucleics (Shandrick *et al.*, 2002). L'aparició de nous reblliments i de tamps més eficaços fan d'aquesta modalitat una eina indispensable per a la seqüenciació.

Electroforesi capil·lar d'enfocament isoelèctric

En l'enfocament isoelèctric s'ha d'eliminar el flux electroosmòtic amb un recobriment adequat del capil·lar, de manera que la separació es dona per migració electroforètica diferencial. El poder de resolució d'aquesta tècnica s'ha calculat en 0,02 unitats de pH. Consta de tres fases: càrrega de la mostra i dels amfòlits que donaran lloc al gradient de pH en el capil·lar, enfocament o migració, i mobilització cap al detector. La detecció es fa normalment a 280 nm perquè la mescla d'amfòlits pot absorbir en el rang de l'ultravioleta baix. Aquesta tècnica s'utilitza per a la separació de proteïnes (Pritchett, 1996), sempre que no tinguin un caràcter marcàdamment hidrofòbic.

Cromatografia capil·lar electrocinètica micel·lar

En l'electroforesi capil·lar de zona lliure, les molècules neutres generalment no se separen, sinó que es desplacen com a una única banda. Per aconseguir la seva separació poden afegir-se, a la solució d'electrolit, diferents additius micel·lars, com ara el dodecil sulfat de sodi (SDS). Aquestes substàncies surfactants poden ser aniòniques, catióniques, amfòteres o sense càrrega. Les molècules neutres tindran una afinitat diferent per a les micel·les en funció de les interaccions hidrofòbiques que s'estableixin, el que permetrà la seva separació. La principal aplicació d'aquesta tècnica és la separació de molècules petites; en vins ha estat utilitzada per a la separació de trans- i cis-resveratrol, quercetina, catequina i àcid gàlic (Prasongsidh *et Skurray*, 1998).

Isotacoforesi

En aquesta modalitat s'utilitza un sistema de tampons heterogeni. El capil·lar s'omple amb un electrolit amb una mobilitat més gran que la de les mostres i després s'introdueix la mostra. A continuació s'introdueix l'electrolit de baixa mobilitat, inferior a la de qualsevol molècula de la mostra. La separació té lloc entre els dos electrolits. Aquesta tècnica permet separar tant cations com anions, però no en una mateixa anàlisi. La detecció pot fer-se per mesura de la conductivitat o de l'absorbància a l'ultraviolat. S'ha utilitzat en vins per a la separació de molècules petites, com ara alguns àcids orgànics (Farkas *et Koval*, 1982; Karovicova *et al.*, 1990).

Immunolectroforesi capil·lar

Un immunoassaig comprèn un conjunt de tècniques analítiques basades en la reacció específica entre un antígen i el seu anticòs. És una tècnica molt important en

química clínica, biofarmacèutica i/o ambiental, a causa de la seva total selectivitat i límits de detecció extremadament baixos, a més de l'aplicació per a una ampla gamma de compostos. L'electroforesi capil·lar basada en l'immunoassaig permet la caracterització d'anticossos, la monitorització de les reaccions lligades a l'anticòs, l'estudi de les interaccions antígen-anticòs, etc. (Righetti, 1996). L'avantatge que presenta respecte d'altres tècniques d'immunoassaig es troba en les característiques pròpies de les tècniques d'electroforesi capil·lar: consum mínim de mostra i de reactius, rapidesa i automatització.