



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

**ESTUDI DEL CONSUM D'OXIGEN DE DIFERENTS LLEVATS
SECS INACTIUS (LSI) SELECCIONATS PER REDUIR
L'OXIDACIÓ DEL VI**

Sergi Anguela Vives

TREBALL FINAL DE GRAU DE BIOTECNOLOGIA

Tutor acadèmic: Dr. Fernando Zamora Marín i Dr. Joan Miquel Canals Bosch,
Departament de Bioquímica i Biotecnologia
fernando.zamora@urv.cat, jmcanals@urv.cat

En cooperació amb: Grup de Recerca en Tecnologia Enològica (TECNENOL
– URV), Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia.

Supervisors: Pere Pons Mercadé, Departament de Bioquímica i Biotecnologia,
pere.pons@fundacio.urv.cat

Tarragona, 10 de juliol del 2020

ÍNDEX

DADES DEL CENTRE	1
RESUM.....	2
1. INTRODUCCIÓ.....	3
1.1. L'oxidació del vi	3
1.1.1. Oxidació bioquímica o enzimàtica.....	8
1.1.2. Oxidació química o no enzimàtica.....	10
1.2. Productes antioxidants més utilitzats en la producció de vi.....	11
1.2.1. Anhídrid sulfurós / Diòxid de sofre (SO ₂)	12
1.2.2. Àcid ascòrbic.....	14
1.2.3. Glutatió.....	14
1.3. La criança del vi sobre lies.....	15
1.4. Utilització de Llevats Secs Inactius (LSI)	17
2. HIPÒTESIS DE TREBALL I OBJECTIUS.....	19
3. MATERIALS I MÈTODES	20
3.1. Reactius i equipament.....	20
3.2. Disseny experimental	20
3.3. Extracció de polisacàrids de les mostres.....	23
3.4. Determinació de la concentració de polisacàrids per HPLC.....	23
3.5. Extracció de proteïnes de les mostres	24
3.6. Determinació de la concentració de proteïnes per HPLC	24
3.7. Anàlisi estadística	25
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	26
4.1. Consum d'oxigen	26
4.2. Aplicació del model cinètic.....	28
4.3. Validació de la modelització del consum d'oxigen.....	32
4.4. Concentració de polisacàrids i proteïnes	33
5. CONCLUSIONS	34
6. PERSPECTIVES DE FUTUR	35
7. BIBLIOGRAFIA	36
AUTOAVALUACIÓ	39
AGRAÏMENTS.....	39
ANNEXOS.....	40

DADES DEL CENTRE

El present estudi s'ha realitzat al Grup de Recerca en Tecnologia Enològica (TECNENOL) de l'àmbit de biologia molecular de la Universitat Rovira i Virgili, dirigit pel Dr. Fernando Zamora. Pel desenvolupament d'aquest treball s'han utilitzat les instal·lacions i els laboratoris del Departament de Bioquímica i Biotecnologia del Campus Sescelades de la Universitat Rovira i Virgili.

Aquest grup treballa en diferents línies d'investigació relacionades amb l'àmbit de l'enologia. Per una banda s'hi estudien les proteïnes dels vins i la seva relació amb la fallida proteica i amb la qualitat i persistència de l'espuma dels vins espumosos. Per altra banda estudien els compostos fenòlics (maduresa fenòlica, astringència i color del vi negre) i, més recentment, els efectes concrets del canvi climàtic sobre la maduresa fenòlica i les seves conseqüències en l'elaboració de vins negres.

A més a més, el grup TECNENOL col·labora amb diferents empreses en projectes d'investigació basats en l'estudi de l'efecte d'eines enològiques en la qualitat final dels vins. El mètode de treball consta en tractar vins o solucions model amb les diferents eines enològiques a estudiar i a continuació es determinen les propietats fisicoquímiques dels vins resultants. Alguns exemples serien l'estudi de l'efecte de la utilització de diferents llevats, de diferents tipus de premsada, bentonites, filtres, entre molts altres. D'entre tots els estudis realitzats per aquest grup, cal destacar-ne els estudis del consum d'oxigen per part de diferents tanins i del Llevat Sec Inactiu (LSI) *Longevity*. Aquests han servit com a antecedents claus pel present Treball de Final de Grau, ja que n'han facilitat la seva comprensió i desenvolupament.

Els estudis pertinents a aquest Treball de Final de Grau es van realitzar entre els mesos de febrer i març de 2020. No es van poder allargar fins al juny, com es tenia previst, a causa de la impossibilitat d'assistir al laboratori com a conseqüència de l'estat d'alarma decretat amb motiu de la pandèmia de la COVID-19. Tot i això, durant el mes de juliol de 2020 es reprendrà la part experimental d'aquest estudi per poder obtenir totes les dades i acabar la planificació plantejada inicialment.

RESUM

El control de l'oxigen és un dels factors més importants en el procés d'elaboració d'un vi de qualitat. L'oxidació pot malmetre els aromes i sabors del vi i afectar a la coloració, provocant un embruniment del vi.

Actualment, el producte antioxidant més utilitzat en la indústria del vi és el diòxid de sofre (SO_2). A Europa es regula el contingut de sulfits presents al vi, ja que s'ha observat que dosis elevades de SO_2 poden provocar efectes adversos en la salut dels consumidors. Per aquest motiu, existeix un interès creixent en trobar productes antioxidants que permetin substituir o reduir les concentracions de diòxid de sofre per prevenir els vins de l'oxidació.

La criança del vi sobre lies i la utilització de llevats secs inactius (LSI) són algunes de les opcions més interessants. Ambdues tècniques consumeixen oxigen i protegeixen el vi de l'oxidació, tant pel que fa al color com als aromes. A més, alliberen polisacàrids i manoproteïnes que enriqueixen el vi, fet que resulta en un augment del volum en boca i una suavització de l'astringència en vins negres. Per aquest motiu s'estan estudiant diferents tipus de llevats secs inactius (LSI), per tal d'aplicar-los al vi.

En aquest estudi s'ha determinat la taxa de consum d'oxigen de diferents LSI (*Longevity*, *Noblesse*, *Finesse*, *AntiOx1* i *AntiOx2*) en una solució model de vi utilitzant una tècnica luminescent no invasiva. A més, s'ha comparat el consum d'oxigen d'aquests amb el dels additius antioxidants més utilitzats: el diòxid de sofre, l'àcid ascòrbic i el glutatió reduït.

Els resultats mostren que els LSI *Longevity* i *AntiOx1* consumeixen oxigen en una solució model de vi a una velocitat superior que la del diòxid de sofre a les dosis habituals d'ús. Per tant, aquests poden ser eines interessants per complementar i disminuir les dosis de SO_2 per protegir els vins de l'oxidació.

Paraules clau: Oxidació del vi - Consum d'oxigen - Diòxid de sofre - Àcid ascòrbic – Glutatió – Lies – Llevat Sec Inactiu

1. INTRODUCCIÓ

La vinificació és una pràctica històrica duta a terme pels humans durant més de 8000 anys que consisteix en la transformació del most del raïm en vi. Les diferents tècniques d'elaboració del vi han estat molt estudiades, tot i que resten molts factors per millorar. Un dels punts més importants en enologia tracta d'intentar aconseguir la major estabilitat d'un vi obtenint un producte final de qualitat. Dins d'aquesta desitjada estabilitat, un dels factors a combatre són els processos d'oxidació del vi, ja que aquests poden variar el perfil sensorial del producte final, tant en aroma i sabor com en color.

1.1. L'oxidació del vi

Funcionalitat i gestió de l'oxigen

L'oxigen és un dels components essencials en la fase inicial de la fermentació del vi, ja que els llevats el necessiten en la seva fase de creixement. Tot i això, durant la fermentació i la criança del vi convé que hi hagi poca quantitat d'oxigen per tal d'evitar la pèrdua d'etanol, l'aparició d'àcid acètic i/o acetaldehid en el seu lloc i una oxidació del vi.

Per aquest motiu, la gestió de l'oxigen és un dels punts més crítics en l'elaboració de vins de qualitat. Les manipulacions durant la seva elaboració i criança són els factors més importants per l'oxidació del vi. Tot moviment del vi en presència d'oxigen permet que aquest penetri al líquid, s'hi dissolgui i això provoqui una reacció d'altres substàncies presents al vi que acabi resultant en un augment del potencial d'oxidació. Les manipulacions que poden afectar més en l'oxidació són l'ompliment dels dipòsits per la part superior, l'ús de bombes poc hermètiques i l'embotellament sense fer el buit o sense gas inert. Altres factors que poden propiciar aquest procés són una falta d'humitat, la temperatura alta o una conservació sense les condicions adequades. A temperatura ambient, la màxima concentració d'oxigen dissolt que pot tenir un most o un vi és d'entre 6 a 8 mg·L⁻¹ (P. Comuzzo & Zironi, 2013).

Modificacions macroscòpiques i alteració sensorial

Quan es parla de les impressions sensorials dels vins, les dues més importants són el color i l'aroma. L'oxigen pot tenir un efecte positiu durant la fermentació alcohòlica o la microoxigenació dels vins. Tot i això, l'oxigen també pot ser alhora el causant d'efectes no desitjats en el vi. Un d'ells és l'embruniment del vi, que es tracta d'un increment de la intensitat del color del vi a causa de la influència de l'oxigen que, a mesura que augmenta la seva concentració, acaba canviant el color groc pàl·lid per un color groc-

marronós. L'embruniment a vegades es pot percebre com a un aspecte positiu, com en el cas dels vins dolços fortificats, però en vins blancs generalment es valora negativament. Per altra banda, l'oxigen també pot jugar un paper negatiu en l'aspecte sensorial dels vins blancs, provocant una pèrdua de frescor i d'aromes afruitats i aportant un caràcter oxidat, aspre i amarg desagradable. Això és degut a la modificació i formació de diverses molècules, que està lligada a dos paràmetres importants com són la temperatura i el contingut d'oxigen (Karbowiak et al., 2010).

Modificacions moleculars

- **Oxigen molecular i formació d'espècies reactives d'oxigen**

L'oxigen triplet ($^3\text{O}_2$; $\cdot\text{O} - \text{O}\cdot$) és la forma més estable de l'oxigen. Es tracta d'un estat relativament no reactiu en comparació a la majoria de radicals, ja que l'oxigen en aquesta configuració no pot reaccionar directament amb la majoria de molècules orgàniques ni formar enllaços acceptant parells d'electrons. Tot i això, no es tracta d'una molècula inerta, ja que pot formar part de reaccions orgàniques o inorgàniques, tal com es pot observar a la Figura 1. De fet, l'absorció d'una quantitat suficient d'energia (tèrmica, lumínica o química) li permet formar el seu estat singlet ($^1\text{O}_2$). Aquesta nova espècie molecular d'oxigen és altament reactiva i electrofílica i pot establir enllaços químics amb altres molècules a través de reaccions d'oxidació.

Per altra banda, la reducció monovalent de l'oxigen triplet a partir de l'addició gradual d'un electró aportat per l'oxidació d'un catalitzador (generalment d'un ió metàl·lic de transició reduït, com $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ o $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$), pot produir espècies d'oxigen reactives (ERO o ROS, de l'anglès *Reactive Oxidative Species*). Això pot induir la transformació cap a un anió superòxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$; $\cdot\text{O} - \text{O}\cdot$). Al pH del vi (2,8 - 4,0), aquest radical està present en la seva forma protonada, el radical hidroperòxid ($\text{HOO}\cdot$). Aquesta forma no és reactiva per si mateixa, però es tracta d'un precursor d'altres ROS. La transferència d'un altre electró per part del Fe^{2+} a l'anió superòxid pot reduir-lo i produir l'anió peròxid (O_2^{2-}). Al pH del vi, l' O_2^{2-} ràpidament es protona i passa a ser una espècie d'oxigen no-radical, el peròxid d'hidrogen (H_2O_2). Una vegada en aquesta forma, les reaccions de reducció de Fenton i de Haber-Weiss poden generar un radical hidroxil ($\text{HO}\cdot$) i un ió hidròxid (HO^-), que són espècies d'oxigen molt més reactives que el seu precursor. El radical hidroxil es pot implicar en diverses vies d'oxidació de radicals mitjançant reaccions en cadena amb diferents substrats orgànics, com per exemple entre lípids i radicals d'oxigen.

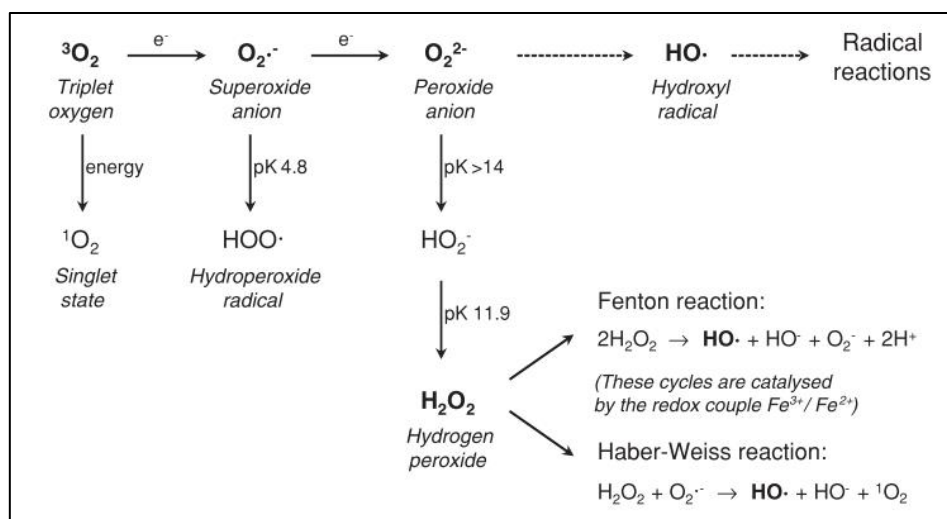


Figura 1. Formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) a partir de successives reduccions monovalents de l'oxigen triplet (Karbowski et al., 2010).

D'aquesta manera, l'oxigen molecular és el punt inicial d'una escala reductiva que genera espècies d'oxigen altament reactives que porten a un potencial oxidatiu molt fort. A mesura que incrementa el nivell de reducció, les espècies moleculars d'oxigen passen a ser més reactives i van augmentant el dany oxidatiu. Per tant, s'ha d'intentar evitar la introducció d'oxigen molecular a mostos i vins per tal d'aconseguir la màxima protecció possible contra els fenòmens oxidatius (Karbowski et al., 2010).

• Compostos fenòlics: Substrats d'oxidació

El vi és un fluid complex compost per una barreja d'aigua, alcohols (sobretot etanol), àcids orgànics (àcid tartàric), compostos fenòlics, sucres, aminoàcids i diversos minerals. Entre aquests, els compostos fenòlics s'han de considerar amb un interès especial pel que fa al procés d'oxidació durant l'elaboració i la maduració del vi. El potencial antioxidant (PAO o AOP, de l'anglès *Antioxidant Potential*) dels vins sovint s'atribueix al seu contingut fenòlic total, ja que els compostos fenòlics tenen la capacitat per capturar radicals lliures. Com que la producció de vi negre inclou maceració i la de vi blanc no, els vins blancs contenen nivells inferiors de compostos fenòlics i, conseqüentment, tenen AOPs inferiors que els vins negres (Abramović et al., 2015).

Els compostos fenòlics del vi es poden agrupar en flavonoides i no flavonoides, en funció del seu esquelet carbònic.

Els no flavonoides són els més comuns en vins blancs i la majoria es troben a les cèl·lules del gra de raïm. Aquests es poden dividir en 5 grups principals, representats a la Taula 1. El primer està format pels àcids cinàmics. Aquests es poden trobar lliures, esterificats amb l'àcid tartàric, altres àcids hidroxil-orgànics, sucres o alcohols. L'esterificació d'un àcid hidroxicinàmic amb l'àcid tartàric forma àcids

hidroxicinamoiltartàrics (HCT, de l'anglès *hydroxycinnamoyltartaric acids*). Les formes més abundants dins d'aquest grup són l'àcid caftàric i l'àcid coutàric, que són formes molt reactives envers l'oxidació del most. En medi aquós o hidroalcohòlic, els àcids caftàrics són incolors, però una vegada oxidats tendeixen a produir coloració groga. Dins d'aquesta classe també hi ha la cumarina, que deriva de l'àcid cinàmic mitjançant una esterificació intramolecular amb un grup fenòlic (-OH). El segon grup de no flavonoides es tracta dels fenols volàtils, inclouen l'àcid benzoic i compostos volàtils com el fenol vinil i el guaiacol vinil. El tercer grup el constitueix el tirosol, que és un polifenol format durant la fermentació alcohòlica a partir de l'aminoàcid tirosina sintetitzat per llevats. El quart grup és el dels tanins hidrolitzables, compostos que deriven del roure. Aquests són èsters d'àcid gàl·lic (galotanins) i d'àcid el·làgic (el·lagitanins) amb glucosa o sucres relacionats. Finalment, l'últim grup de no flavonoides és el dels estilbens, del qual el trans-resveratrol n'és l'exemple més conegut. No es troben presents de forma natural al raïm, sinó que la seva presència ve de pràctiques com l'envelliment en bóta de roure o l'addició de tanins extrínsecs amb productes comercials (Karbowski et al., 2010).

Taula 1. Compostos fenòlics no flavonoides més comuns del vi (Karbowski et al., 2010; Oliveira et al., 2011).

No flavonoides

Classe de fenol

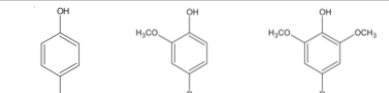
Estructura típica

Derivats d'àcids benzoics i cinàmics



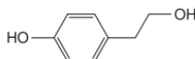
	R ¹	R ²	R ³	
Benzoic acid	H	H	H	Cinnamic acid
p-Hydroxybenzoic acid	H	OH	H	p-Coumaric acid
Protocatechuic acid	OH	OH	H	Caffeic acid
Vanillic acid	OCH ₃	OH	H	Ferulic acid
Gallic acid	OH	OH	OH	
Syringic acid	OCH ₃	OH	OCH ₃	Sinapic acid

Fenols volàtils

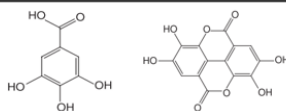


Ethylphenol (R=CH₂CH₃)
Vinylphenol (R=CHCH₃)
Guaiacol (R=H)
Methylguaiacol (R=CH₃)
Ethylguaiacol (R=CH₂CH₃)
Vinylguaiacol (R=CHCH₃)
Syringol (R=H)
Methylsyringol (R=CH₃)

Tirosol

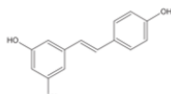


Tanins hidrolitzables



Gallic acid
Ellagic acid

Estilbens

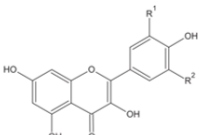
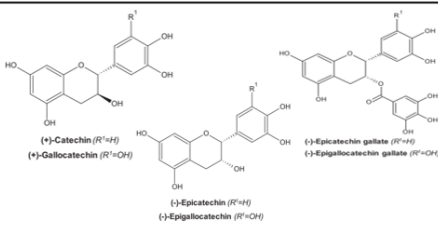
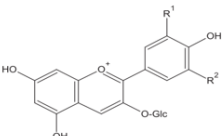


trans-Resveratrol

Els flavonoides són més complexos que els no flavonoides. Tenen un nucli comú que consisteix en un esquelet de carboni compost per dos anells fenòlics ajuntats per un

anell pirà que conté oxigen. Les diferències en el grau d'oxidació de l'anell heterocíclic i la hidroxilació dels tres anells resulten en una gran família de diferents estructures i amb diferents propietats fisicoquímiques i estabilitat. Els flavonoides poden existir de forma lliure o polimeritzats amb altres compostos, com per exemple altres flavonoides, sucres, no flavonoides, proteïnes o una combinació d'aquests. Els flavonoides es poden diferenciar en 3 grups principals, en funció del nombre d'hidroxils i/o substituents als anells de benzè (Karbowiak et al., 2010). La Taula 2 mostra els diferents grups de flavonoides. El grup més comú són els flavonols. Aquests es troben majoritàriament a la pell del raïm i es distingeixen per la presència d'un enllaç doble de carboni i/o un grup hidroxil addicional. El següent grup és el dels flavan-3-ols, també anomenats catequines. La font principal de flavan-3-ols són les parts sòlides del gra de raïm, com la llavor, la pell i la tija del raïm. Els flavan-3-ols són els flavonoides més abundants en vins blancs i poden existir com a unitats monomèriques, oligomèriques o polimeritzar-se formant proantocianidines, també anomenades tanins condensats. Aquests juguen un paper fonamental durant la maduració del vi, ja que produeixen un rang d'oligòmers i polímers molt important. Finalment, el tercer grup de flavonoides són les antocianines. Aquestes també es troben majoritàriament a la pell del raïm i són les que donen coloració al vi. Aquestes existeixen com a fragments d'aglicona o com a glicòsids i al vi es troben en la seva forma glicosidada: cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina i malvidina.

Taula 2. Compostos fenòlics flavonoides més comuns del vi (Karbowiak et al., 2010; Oliveira et al., 2011).

Flavonoides	
Classe de fenol	Estructura típica
Flavonols	 Kaempferol ($R^1=R^2=H$) Quercetin ($R^1=OH, R^2=H$) Myricetin ($R^1=R^2=OH$)
Flavan-3-ols (Catequines)	 (+)-Catechin ($R^1=H, R^2=H$) (+)-Gallocatechin ($R^1=OH, R^2=H$) (-)-Epicatechin ($R^1=H, R^2=H$) (-)-Epigallocatechin ($R^1=OH, R^2=H$) (-)-Epicatechin gallate ($R^1=H, R^2=OH$) (-)-Epigallocatechin gallate ($R^1=OH, R^2=OH$)
Antocianines	 Cyanidin 3-glucoside ($R^1=OH, R^2=H$) Peonidin 3-glucoside ($R^1=OCH_3, R^2=H$) Delphinidin 3-glucoside ($R^1=R^2=OH$) Petunidin 3-glucoside ($R^1=OH, R^2=OCH_3$) Malvidin 3-glucoside ($R^1=R^2=OCH_3$)

La composició fenòlica d'un vi principalment depèn de diferents factors. El principal factor és el tipus de vi. Els vins negres tenen més contingut de compostos fenòlics que els vins blancs degut a l'alta concentració de flavan-3-ols i proantocianidines que hi ha a les varietats de raïm negre. Un altre factor important és el tipus de conreu, sòl i condicions climàtiques, pràctiques vitícoles, l'estat de maduració i la qualitat del raïm a la collita. Finalment, les tècniques enològiques utilitzades també afecten la composició fenòlica final del vi. Alguns exemples d'això poden ser el tipus de premsat, la temperatura i durada de la maceració i l'addició d'enzims pectolítics. Per exemple, la fermentació tradicional en contacte amb la pell del raïm, té una tendència a afavorir l'extracció de compostos fenòlics de les pells i de les llavors del raïm (Karbowiak et al., 2010). Per altra banda, els compostos fenòlics poden mostrar una concentració decreixent en el vi durant la maceració en berrica, especialment els compostos volàtils aromàtics. La fusta de la berrica és capaç d'absorbir aquestes molècules i aquesta transferència de masses varia l'equilibri inicial dels compostos fenòlics. La capacitat d'absorció de la fusta depèn de les condicions ambientals durant la criaça, com per exemple la concentració i transferència d'oxigen, el pH, la temperatura, les concentracions inicials de fenols i les concentracions d'etanol, SO₂ i llevat.

L'oxidació del vi es pot produir en funció de dos mecanismes principals, l'oxidació bioquímica o enzimàtica i l'oxidació química o no enzimàtica. Els compostos fenòlics i les ROS esmentats en els anteriors punts juguen un paper clau en ambdós mecanismes d'oxidació.

1.1.1. Oxidació bioquímica o enzimàtica

Com en la majoria de fruites i vegetals, l'oxidació enzimàtica pot tenir lloc de forma molt ràpida i afecta el color i el gust del producte final. Aquests tipus d'oxidacions normalment tenen lloc al raïm, però sobretot al most, ja que quan es premsa el raïm s'alliberen enzims catalitzadors de l'oxidació de diferents compostos del vi. L'oxidació enzimàtica està correlacionada amb el contingut de compostos fenòlics, especialment els del grup d'àcids hidroxicinàmics, com l'àcid caftaric i l'àcid couaric, i es veu promoguda per flavan-3-ols. Els enzims que participen en aquest tipus d'oxidació són oxidoreductases. Aquestes utilitzen compostos fenòlics com a donadors d'electrons i l'oxigen com acceptor d'electrons, de manera que els productes de la reacció són el donador oxidat i aigua. Dins del grup d'oxidoreductases hi ha diverses classes d'enzims amb activitats enzimàtiques diferents.

En el raïm sa, l'activitat enzimàtica oxidativa més abundant és la polifenoloxidasas (PPO, de l'anglès *Polyphenol oxidase*), també coneguda com tirosinasa, catecol oxidasa,

catecolasa, difenol oxidasa, o-difenolasa o fenolasa. Aquesta activitat enzimàtica catalitza les reaccions que transformen els fenols en quinones en presència d'oxigen. Les quinones resultants poden participar en reaccions de polimerització amb proteïnes o aminoàcids i condensar-se produint pigments marrons de melanina relativament insolubles (Comuzzo et al., 2013). Aquest procés es troba representat a la Figura 2. Les quinones també poden participar en reaccions d'oxidació de substàncies que tinguin un potencial més baix, com polifenols, àcid ascòrbic i SO_2 . Per exemple, la quinona de l'àcid caftàric pot participar en reaccions que impliquen l'oxidació de flavonols cap a les seves corresponents formes de quinona. Una vegada duta a terme aquesta segona reacció, la quinona es redueix i torna a la seva forma original d'àcid caftàric. Aquest pot tornar a ser oxidat per l'activitat PPO i així s'entra en una cadena de reaccions d'oxidació.

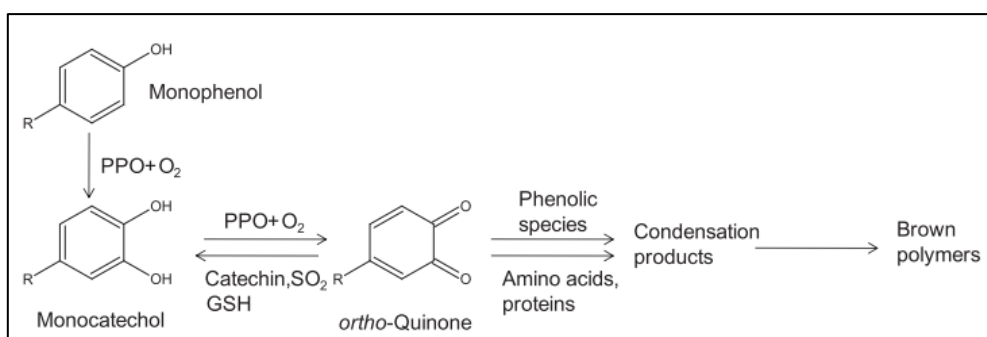


Figura 2. Procés d'oxidació enzimàtica al most del vi (Oliveira et al., 2011).

Hi ha diferents enzims capaços de realitzar aquesta activitat enzimàtica. El més comú és l'enzim polifenoloxidasa (PPO, de l'anglès *Polyphenol oxidase*, EC: 1.10.3.1.), un enzim que conté Cu i és capaç d'oxidar fenols utilitzant l'oxigen com a acceptor d'electrons. La concentració de PPO és un dels factors més importants que determinen la taxa d'embruniment enzimàtic del most del vi. Tot i això, l'activitat de l'enzim polifenoloxidasa es pot inhibir amb el SO_2 . El següent enzim més important és la peroxidasa (POD, EC: 1.11.1.7). Aquest conté Fe i utilitza el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) com a acceptor d'electrons per oxidar compostos fenòlics. El peròxid d'hidrogen oxida el lloc actiu de l'enzim, de manera que quan el substrat queda lligat al lloc actiu, aquest s'oxida i l'enzim torna al seu estat reduït.

Per altra banda, en raïm infectat per *Botrytis cinerea* hi ha activitat lacasa degut a l'enzim lacasa (EC: 1.10.3.2) sintetitzat pel fong (Karbowski et al., 2010). Aquesta activitat també es coneix amb el nom de para-difenoloxidasa i catalitza l'oxidació de les para-hidroquinones a para-benzoquinones. Es tracta d'una activitat enzimàtica més difícil d'inhibir, ja que té major resistència al SO_2 i un espectre més ample de substrats d'oxidació.

Tot i que l'oxidació enzimàtica pot induir l'embruniment del most, la reacció es veu inhibida per l'alcohol produït durant la fermentació. Per aquest motiu, el mecanisme d'oxidació química que té lloc al vi és de molta més importància.

1.1.2. Oxidació química o no enzimàtica

L'oxidació química és més lenta que l'enzimàtica i té lloc una vegada ha acabat la fermentació alcohòlica del vi, generalment durant la fase de cria. Aquest procés oxidatiu està mediat per l'acció catalítica dels ions metàl·lics de ferro ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) i coure ($\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$) i es veu afavorit per l'oxidació de polifenols que contenen un anell de catecol o un grup galoil (catequina, epicatequina, galocatequina, àcid gàl·lic i els seus èsters o l'àcid cafeic). Tot i això, l'oxigen no reacciona directament amb els compostos fenòlics.

La Figura 3 mostra els mecanismes de l'oxidació química del vi. Aquests tenen lloc a partir de ROS, com el radical peròxid i la seva forma protonada, el radical hidroperoxil (Figura 3, Pas 1). Els grups funcionals del catecol poden reaccionar amb aquests radicals, formant semi-quinones (Figura 3, Pas 2), quinones (Figura 3, Pas 3) i peròxid d'hidrogen. Aquest últim pot formar radicals hidroxil mitjançant la reacció de Fenton (Figura 3, Pas 4). Els radicals hidroxil són molt inestables i reactius, de manera que reaccionen immediatament amb diferents compostos del vi. Per una banda poden reaccionar amb l'etanol, oxidant-lo a acetaldehid (Figura 3, Pas 5) o amb l'àcid màlic, formant àcid pirúvic (Comuzzo et al., 2013). Per altra banda poden reaccionar amb sucres, glicerol o l'àcid tartàric. Tot i això, encara no es coneix tot el patró dels productes d'oxidació.

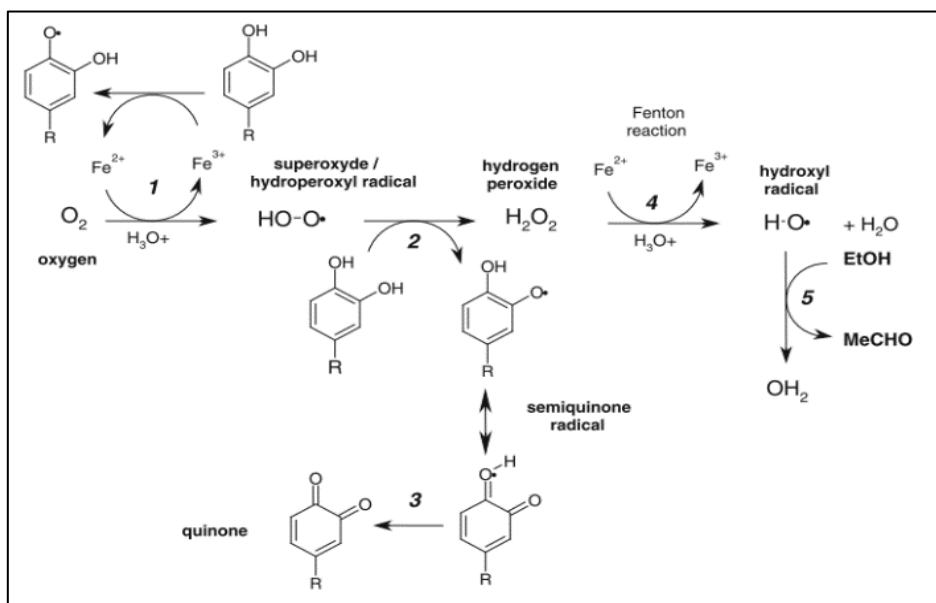


Figura 3. Mecanismes d'oxidació química del vi (P. Comuzzo & Zironi, 2013).

Els productes d'oxidació formats, com les quinones, l'acetaldehid o l'àcid pirúvic poden participar en més reaccions. Les quinones poden reaccionar amb grups tiol de proteïnes, formant nous enllaços covalents o amb compostos fenòlics, formant polímers nous i estructures de tanins més grans. Ambdós mecanismes provoquen canvis en el caràcter sensorial del vi. Per altra banda, l'acetaldehid pot combinar-se amb flavonols per formar estructures enllaçades per etil, com tanins i antocianines. Aquests productes també són importants pel caràcter sensorial i per l'estabilitat del color del vi. Finalment, l'àcid pirúvic pot reaccionar amb antocianines i formar pigments nous com la vitisina A, que també aporta estabilitat en el color del vi.

Unes concentracions baixes d'aquests productes poden aportar una complexitat interessant al vi. Tot i això, si la seva concentració augmenta, es transformen ràpidament en factors negatius per la qualitat el vi. Per tant, la quantitat d'oxigen disponible és un factor clau per controlar les concentracions d'aquests productes d'oxidació. Una aeració controlada durant l'envelliment del vi pot tenir efectes positius com l'estabilització de la fracció fenòlica i, per tant, del color. També pot provocar una reducció de l'astringència gràcies a les reaccions de polimerització i una eliminació d'excés de notes vegetals. En canvi, si l'aeració del vi es descontrola acaben apareixent polímers inestables, els compostos fenòlics i compostos colorants precipiten i hi ha una acumulació dels productes d'oxidació (acetaldehid, quinones i àcid pirúvic). El conjunt de tots aquests factors acaba implicant un embruniment del color i el desenvolupament de sabors d'oxidació no desitjats.

1.2. Productes antioxidants més utilitzats en la producció de vi

Tot i que els mecanismes involucrats en l'oxidació del vi s'han estudiat amb profunditat, la protecció del vi davant el malbaratament per oxidació segueix sent un dels principals objectius de l'enologia.

Els productes amb capacitat antioxidant més utilitzats en enologia són el SO₂, l'àcid ascòrbic i, molt recentment, el glutatió reduït. Diversos estudis han demostrat que també es pot aconseguir un efecte antioxidant afegint compostos com encenalls de roure (Navarro et al., 2016) i tanins enològics, especialment els el-lagitanins (Pascual et al., 2017). Tot i això, els mètodes més interessants i amb més potencial per substituir els antioxidants convencionals són la cria del vi sobre lies (Salmon et al., 2000) i la utilització de llevats secs inactius (LSI) (Comuzzo et al., 2013).

Per altra banda, no es pot oblidar que el SO₂ també té un efecte antisèptic imprescindible per controlar les possibles contaminacions microbiològiques del vi. Per aquesta raó, s'han proposat diferents tècniques destinades a substituir aquesta funció del SO₂.

Aquestes podrien ser la utilització de bacteriocines o lisozim (Guerrero et al., 2015) o el tractament del vi amb mètodes físics com la radiació UV-visible (Falguera et al., 2013), polsos elèctrics (PEF, de l'anglès *Pulsed Electric Fields*) o altes pressions (HPP, de l'anglès High Pressure Processing) (Guerrero et al., 2015). Tot i això, cap d'aquests mètodes ha estat tan eficient com el SO₂.

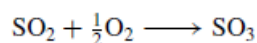
1.2.1. Anhídrid sulfurós / Diòxid de sofre (SO₂)

El diòxid de sofre (SO₂) és un compost àmpliament utilitzat en enologia des de finals del segle XVIII, especialment en vins blancs. Actualment segueix sent considerat un additiu fonamental en el procés de vinificació, principalment degut a les seves propietats antisèptiques i antioxidants. Tot i que el SO₂ pot ser produït naturalment en la fermentació del vi per part dels llevats (*Saccharomyces cerevisiae*), la majoria prové de compostos exògens afegits. Aquest s'obté de la combustió del sofre i s'utilitza des del premsat fins a l'embotellament per protegir el most i el vi de l'oxidació i de possibles contaminacions.

Al vi hi ha un equilibri àcid-base entre la forma molecular i la forma iònica del diòxid de sofre. Al pH del vi pot existir com la forma molecular, SO₂, però en general es troba en la seva forma iònica dissociada com a ió bisulfit, HSO₃⁻ (SO₂ + H₂O → H⁺ + HSO₃⁻). El ió sulfit, SO₃²⁻, només apareix a pH més alts i, per tant, es troba a molt baixes concentracions al pH del vi. La suma del HSO₃⁻ i el SO₂ constitueixen la fracció anomenada SO₂ lliure. La forma molecular és la que té una activitat de control microbiològic i antioxidant més activa, tot i que alhora representa la fracció minoritària del sulfurós lliure (1-4% a 20 °C, en funció del pH i el grau alcohòlic del vi). Per altra banda, una vegada en solució en el medi, el diòxid de sofre es pot enllaçar amb diversos components del vi, constituint així la fracció anomenada SO₂ combinat. Aquesta conté tot el ió bisulfit que reacciona com a nucleòfil amb compostos carbonil de manera que acaba enllaçat amb constituents insaturats del vi com l'acetaldehid, antocianines, àcid pirúvic, àcid glutàric, glucosa o alguns compostos fenòlics. El SO₂ combinat normalment és la fracció menys activa pel que fa a les propietats antioxidants i antimicrobianes dels sulfits. La suma del SO₂ lliure i el SO₂ combinat constitueixen el SO₂ total. El SO₂ lliure és l'únic actiu contra l'oxidació. Tot i això, aquest efecte protector només és eficient en concentracions superiors a 10 mg·L⁻¹ de SO₂ lliure (Karbowski et al., 2010).

Les propietats antimicrobianes del SO₂ el fan ser l'adequat per a ser utilitzat per evitar el creixement d'organismes no desitjats al vi, com llevats i bacteris perjudicials. Aquesta característica el transforma en l'additiu més utilitzat per controlar el creixement de bacteris làctics i la fermentació malolàctica durant el procés de vinificació. En aquest

treball, però, interessen més les seves propietats antioxidants. El SO_2 juga un paper clau contra l'oxidació, no absorbint l'oxigen, sinó més aviat reaccionant amb altres productes que promouen l'oxidació. Al most, el SO_2 actua contra els enzims polifenoloxidasas provinents del raïm, evitant que aquests aturin el consum d'oxigen. Per altra banda, al vi, el SO_2 reacciona directament amb l'oxigen molecular en presència de ions metàl·lics que actuen com a catalitzadors (ions ferro i coure). D'aquesta manera es consumeix l'oxigen segons la següent reacció:



A més a més, els sulfits poden reaccionar amb el peròxid d'hidrogen, fet que resulta en una reducció del potencial d'oxidació. Aquesta reacció involucra un desplaçament nucleofílic del HSO_3^- pel H_2O_2 per formar àcid sulfúric, HSO_4^- , com a producte final. D'aquesta manera, el diòxid de sofre pot inhibir la reacció de formació d'aldehid competint pel peròxid d'hidrogen. El SO_2 també té un paper important en la reducció de quinones, productes del procés d'oxidació, i tornar-les a la seva forma de fenol.

Unes dosis excessives de SO_2 tenen un potencial al·lèrgic i, fins i tot, poden presentar toxicitat en forma d'efectes crònics relacionats amb un creixement reduït, una menor disponibilitat de tiamina i una modificació histopatològica de l'estómac (Comuzzo et al., 2013). Aquests possibles efectes adversos a la salut dels consumidors ha originat noves tendències de producció per reduir significativament els sulfits en l'elaboració del vi i, fins i tot, que es vegin regulades les dosis de SO_2 . Els límits màxims permesos de SO_2 total a la Unió Europea són de $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en vins negres i $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en vins blancs i rosats. Si un vi supera els $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de contingut de diòxid de sofre total, a l'etiqueta s'ha d'indicar que "conté sulfits" (Commission of the European Communities, 2009). A més a més, una concentració excessiva de SO_2 també podria causar alteracions organolèptiques al producte final, neutralitzant el seu aroma i, fins i tot, produint defectes aromàtics característics (Guerrero et al., 2015).

Per aquests motius, actualment s'estan buscant antioxidants alternatius que permetin substituir o reduir la concentració final de sulfits al vi. Tot i això, s'ha de tenir en compte que una concentració insuficient de SO_2 no assegura l'adequada estabilitat del vi davant una oxidació excessiva o d'un creixement microbià no desitjat. Això podria comprometre la qualitat final del vi. Fins al moment no s'ha trobat cap producte amb les mateixes propietats antioxidants i antimicrobianes que el SO_2 però sense problemes relacionats amb la salut ni afectacions a les propietats organolèptiques del vi. Per tant s'han de buscar alternatives per reduir-ne les dosis, però no es pot eliminar del tot esperant obtenir un vi de qualitat.

1.2.2. Àcid ascòrbic

L'àcid ascòrbic o vitamina C és la substància més coneguda entre les utilitzades per reemplaçar parcialment els sulfits. Es tracta d'un compost capaç d'eliminar l'oxigen de forma més ràpida que el diòxid de sofre. Es troba de forma natural al raïm, però normalment es consumeix ràpidament després del premsat. Per aquest motiu, en enologia, la majoria de l'àcid ascòrbic present al vi blanc normalment s'afegeix just abans de l'embotellament, tot i que també es pot utilitzar en diverses fases del procés de producció de vi per evitar-ne l'oxidació. Es tracta d'un agent reductor capaç de reduir les o-quinones al seu estat fenòlic original i d'interferir els radicals hidroxil i altres radicals, evitant així la seva propagació. Per exemple, l'ASC pot reaccionar amb les quinones d'àcids hidroxicinamoiltartàrics (HCT, de l'anglès *Hydroxycinnamoyltartaric acids*) oxidant-se i regenerant el HCT de nou (Comuzzo et al., 2013). Tot i això, l'oxidació de l'àcid ascòrbic catalitzada per ions metàl·lics produeix àcid deshidroascòrbic i peròxid d'hidrogen. Aquest últim pot desenvolupar reaccions d'embruniment si no hi ha sulfits presents al vi (Comuzzo et al., 2015). Per aquest motiu l'àcid ascòrbic sempre s'ha d'utilitzar juntament amb el SO₂, ja que aquest és capaç d'eliminar el peròxid d'hidrogen i prevenir l'oxidació de l'etanol via la reacció de Fenton. El fet que en absència de SO₂, l'àcid ascòrbic pugui actuar tant com a antioxidant com a iniciador de radicals lliures, se'l coneix com a "efecte crossover" i és el motiu pel qual normalment l'àcid ascòrbic s'utilitza en combinació amb sulfits.

1.2.3. Glutatió

El glutatió és un tripèptid compost pels aminoàcids L-glutamat, L-cisteïna i glicina. Està present en aliments i fruites com el raïm i, a més, és el tiol no proteic més abundant en la majoria dels organismes vius, incloent-hi els llevats vínics com *Saccharomyces cerevisiae*. El glutatió es pot trobar en la seva forma reduïda (GSH) o oxidada (GSSG), aquesta última està formada per dues molècules de glutatió unides per un pont disulfur. La forma reduïda del glutatió (GSH) generalment és la més abundant en les cèl·lules vives i és la forma antioxidant en el vi. Durant la fermentació alcohòlica del vi hi ha fluctuacions en les concentracions de glutatió, ja que els llevats poden tant utilitzar-lo com secretar-lo. A més, la quantitat de GSH una vegada ha acabat la fermentació alcohòlica sembla ser depenent de la soca de llevat (Comuzzo et al., 2013). Les concentracions de GSH disminueixen durant l'emmagatzematge i la cria.

El glutatió es contempla com un antioxidant del vi a causa de la seva capacitat per neutralitzar les orto-quinones, principals responsables de l'embruniment del vi i la pèrdua d'aromes derivats dels mecanismes d'oxidació, i reduir-les de nou a la seva forma

original de polifenols. A més, té un paper fonamental en la prevenció de l'oxidació dels fenols del most, ja que és capaç de reaccionar a través del seu grup -SH amb els àcids caftàric i coutàric, els fenols més sensibles a l'oxidació en els mosts. Aquesta reacció genera el Producte de reacció del raïm (GRP, de l'anglès *Grape Reaction Product*), que és un compost estable i incolor. El GRP no pot ser oxidat per la PPO i és capaç d'aturar la cadena oxidativa, limitant així l'embruniment del most. Tot i això, la lacasa (EC: 1.10.3.2) pot oxidar el GRP i transformar-lo en polímers marrons, pel que el processament de mosts afectats per *Botrytis spp.* és molt més crític des del punt de vista oxidatiu (Comuzzo et al., 2013). A part, s'ha reportat que la suplementació de grans dosis de GSH en condicions oxidatives podrien portar a la formació de color (Comuzzo et al., 2015).

Finalment, cal comentar que la suplementació amb GSH reduït pur encara no està permesa a Europa. Les dades aportades anteriorment són de proves experimentals o de laboratori. Tot i això, l'ús de GSH pur està inclòs entre les pràctiques recomanades per la *Organization Internationale de la Vigne et du Vin* (OIV). Molts dels aspectes comentats s'han d'estudiar amb més profunditat abans d'utilitzar el glutatió a escala de celler.

1.3. La criança del vi sobre lies

La criança del vi sobre lies és una tècnica tradicional que es practica de forma habitual en enologia. Aquesta tècnica consisteix a deixar reposar el vi en contacte sobre lies durant un interval d'uns mesos o anys una vegada ha acabat la primera o la segona fermentació alcohòlica. Les lies es troben dipositades al fons dels tancs de fermentació i estan constituïdes principalment per microorganismes (35-45%). Entre aquests, els que més hi predominen són llevats en fase estacionària o morts que han dut a terme la fermentació alcohòlica, tot i que també hi poden haver bacteris morts, en el cas que hi hagi hagut fermentació malolàctica. A més a més, aquests microorganismes es troben barrejats amb sals tartàriques (25-35%) i residus orgànics (30-40%), que són principalment restes de cèl·lules vegetals (Fornairon-Bonnefond et al., 2003; Karbowiak et al., 2010).

Els llevats en fase estacionària i els llevats morts que es troben a les lies segueixen una sèrie de reaccions que s'engloben sota el terme d'autòlisi. La mort cel·lular indueix la pertorbació de les estructures intracel·lulars, com la membrana citoplasmàtica i els lisosomes, fet que permet l'alliberament d'enzims hidrolítics. Una vegada aquests enzims s'activen, interactuen amb els biopolímers intracel·lulars dels llevats i hi ha una acumulació dels productes hidrolitzats a l'espai periplasmàtic. Paral·lelament també hi

ha activitat enzimàtica a les parets cel·lulars. La paret cel·lular dels llevats està composta principalment per polisacàrids (90%), però també hi ha lípids i proteïnes (10%). La fracció de polisacàrids conté glucans ramificats, manoproteïnes i quitina. L'enzim β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanasa (EC: 3.2.1.6) té activitat durant diversos mesos a partir del final de la fermentació i juga un paper important en l'autòlisi de la paret cel·lular dels llevats durant la criança del vi sobre lies. Aquest enzim s'encarrega d'hidrolitzar els glucans de la paret cel·lular, fet que allibera les manoproteïnes enllaçades covalentment als glucans. A continuació l'enzim β -manosidasa (EC: 3.2.1.25) i les proteases alliberades durant la proteòlisi s'encarreguen d'hidrolitzar les manoproteïnes, incrementant la mida del porus de la paret. Això, juntament amb la mida dels productes intracel·lulars hidrolitzats de baix pes molecular, facilita que hi hagi una difusió de diferents compostos a través de la paret cel·lular cap al medi extracel·lular (Fornairon-Bonnefond et al., 2002). Per tant, l'autòlisi permet un alliberament de compostos de baix pes molecular que enriqueixen el vi, com polisacàrids, oligosacàrids, manoproteïnes, lípids, àcids grassos i àcids nucleics. Aquest fenomen resulta en una sèrie d'avantatges en el vi final. La interacció entre polisacàrids i manoproteïnes millora l'estabilitat del color i aporta millores organolèptiques al vi, com un augment del seu volum en boca i una suavització de l'astringència en els vins negres. La reducció de l'astringència es deu a la inhibició per part dels polisacàrids de les interaccions entre les proteïnes salivals i els tanins, especialment les proantocianidines (Rodríguez et al., 2005), i a què les lies afecten directament en la precipitació o absorció de pro-antocianidines, especialment els polímers més llargs, els quals són els que aporten més astringència al vi. Per altra banda, en vins espumosos, aquestes molècules afavoreixen la integració del gas carbònic i estableixen l'espuma. Les manoproteïnes afavoreixen l'estabilitat proteica del vi i eviten la cristal·lització de les sals d'àcid tartàric (González-Royo et al., 2017).

A més a més, s'ha demostrat que les lies són capaces d'interaccionar i absorbir compostos fenòlics oxidants del vi, com alguns tiols volàtils. Això és possible gràcies a la formació d'enllaços disulfurs amb les manoproteïnes alliberades de la paret cel·lular dels llevats (Salmon et al., 2000). Per altra banda, les lies també consumeixen oxigen degut a la lleu oxidació de lípids i esterols de la membrana dels llevats, dels polifenols adsorbits (ergosterol) i a les propietats antioxidants dels grups tiol de les proteïnes de la paret cel·lular i dels β -glucans de les parets cel·lulars dels llevats (Piergiorgio Comuzzo et al., 2015). D'aquesta manera són capaces de protegir el vi de l'oxidació, pel que fa al color com als aromes. Aquest és el motiu pel qual aquesta tècnica s'utilitza principalment en vins blancs. Els vins blancs tenen un potencial antioxidant molt baix, ja que no tenen antocianines i la seva concentració de flavanols és molt baixa. Per tant, l'envelliment

dels vins blancs en barriques de roure, normalment es fa en contacte amb lies, que consumeixen oxigen i protegeixen el vi de l'oxidació (Comuzzo et al., 2014; Salmon et al., 2000). Per altra banda, últimament ha augmentat la popularitat d'aquesta tècnica en la criança de vins negres.

Tot i això, la criança del vi sobre lies és laboriosa i comporta certs riscos. Per una banda, comporta una càrrega de feina important, ja que les lies s'han de remenar periòdicament per homogeneïtzar-les i s'han d'anar fent tasts per comprovar el desenvolupament d'aromes (Fornairon-Bonnefond et al., 2002). Per altra banda, aquesta tècnica pot modificar el caràcter sensorial del vi degut a l'aparició d'aromes de reducció (Rodríguez et al., 2005) i per això no és un mètode apte per totes les classes de vi, especialment no aconsellable per certs vins de varietats aromàtiques. A més, les lies per si soles no protegeixen el vi de les possibles contaminacions microbianes per *Brettanomyces/Dekkera spp.* o soques salvatges de bacteris làctics (LAB, de l'anglès *Lactic Acid Bacteria*). Per aquests motius les lies no poden substituir completament la utilització de diòxid de sofre durant la maduració i emmagatzematge del vi i aquest mètode es requereix complementar amb sulfits.

1.4. Utilització de Llevats Secs Inactius (LSI)

Els Llevats Secs Inactius (LSI) són derivats de llevats produïts per una degradació enzimàtica o tèrmica de cèl·lules de llevats seguida d'un assecat per obtenir el producte en forma de pols. Els LSI es poden classificar en quatre grups en funció del procés d'obtenció: llevats inactius, llevats autolisats, parets de llevats i extracte de llevats. Els llevats autolisats són capaços d'alliberar diferents compostos al vi com aminoàcids, nucleòtids, esterols, proteïnes, glicoproteïnes, manoproteïnes i polisacàrids. Algunes de les diferents aplicacions de les LSI són la capacitat per millorar l'estabilitat tartàrica i proteica dels vins, l'estimulació de la fermentació malolàctica, l'estabilització del color, l'increment del volum en boca i la reducció de l'acidesa i de la percepció d'astringència. A més a més, els LSI poden interaccionar o absorbir alguns compostos fenòlics del vi i reduir-ne la concentració. Per aquests motius, la utilització dels LSI comença a ser cada vegada més popular, ja que aporten els mateixos efectes positius sobre la qualitat del vi que la criança del vi sobre lies, però sense cap dels inconvenients esmentats anteriorment de les lies.

La gran capacitat de consumir oxigen de les lies ha portat a suposar un efecte semblant pels LSI. Últimament s'han proposat alguns tipus de LSI com a protectors de l'oxidació de mosts i vins degut a la seva riquesa en glutatió reduït (GSH) (Andújar-Ortiz et al., 2014; Du Toit, Wessel; Salmon, 2013), altres amb una major capacitat d'alliberament de

polisacàrids (González-Royo et al., 2013). A més a més, alguns LSI tenen directament una alta capacitat de consum d'oxigen. Encara que hi hagin estudis enfocats en entendre completament la química que hi ha darrere la utilització de LSI enriquits amb glutatió (Andújar-Ortiz et al., 2014), el present treball pretén estudiar l'efecte antioxidant de la utilització d'algunes d'aquestes preparacions comercials.

2. HIPÒTESIS DE TREBALL I OBJECTIUS

Actualment existeix un interès en buscar alternatives al diòxid de sofre per protegir el vi de l'oxidació reduint les quantitats utilitzades d'aquest producte. Els llevats secs inactius són rics en glutatió i alguns tenen una alta capacitat de consum d'oxigen. La suplementació de llevat sec inactiu com a alternativa a la criança sobre lies és un mètode que pot servir per reduir la quantitat d'oxigen al vi i evitar-ne la seva oxidació. A més a més, els llevats secs inactius poden alliberar polisacàrids i proteïnes que enriqueixin el vi.

Per aquests motius, l'objectiu principal d'aquest treball és estudiar el potencial antioxidant de diferents llevats secs inactius amb la finalitat de valorar si serveixen com a alternativa que permeti reduir la dosi d'altres antioxidants utilitzats. Més concretament, es pretén provar l'eficiència antioxidant de dos LSI nous, *R&D SIY AntiOx1* i *R&D SIY AntiOx2*, enfront la d'altres productes que ja es troben al mercat. Per això s'han plantejat els següents objectius específics:

- Caracteritzar el consum d'oxigen dels llevats secs inactius *Pure-Less™ Longevity*, *Noblesse®*, *Finesse®*, *R&D SIY AntiOx1* i *R&D SIY AntiOx2* en una solució de vi model.
- Comparar el consum d'oxigen dels llevats secs inactius *Pure-Less™ Longevity*, *Noblesse®*, *Finesse®*, *R&D SIY AntiOx1* i *R&D SIY AntiOx2* amb el dels tres additius antioxidants més utilitzats: el diòxid de sofre, l'àcid ascòrbic i el glutatió.
- Estudiar l'alliberament de polisacàrids i proteïnes al medi de vi model per part de cada llevat sec inactiu.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Reactius i equipament

Totes les mostres i estàndards es van manipular sense ser exposats a la llum. A més, tots els productes tenien una puresa molt alta i eren adequats per cromatografia líquida d'alta afinitat (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*).

L'etanol absolut (99%), el sulfat de coure (II) pentahidratat, l'àcid tartàric, l'hidròxid de sodi en forma de pellets i l'àcid clorhídric es van comprar a Panreac AppliChem (Barcelona, Espanya). L'acetat d'amoni, el formiat d'amoni, la BSA (*Bovine Serum Albumin*), els estàndards de pectines i dextrans i l'àcid ascòrbic es van comprar a Sigma-Aldrich (Madrid, Espanya). El sulfat de ferro (II) heptahidratat EMSURE® i l'aigua Milli-Q es van obtenir de Millipore (Burlington, USA), mentre que el metabisulfat de sodi al 97% es va obtenir d'Acros Organics (Madrid, Espanya). Els LSI comercials Pure-Less™ *Longevity*, *Noblesse*®, *Finesse*®, *R&D SIY AntiOx1* i *R&D SIY AntiOx2* es van obtenir de Lallemand Inc. (Montreal, Canada).

Totes les mesures de la concentració d'oxigen dissolt en les ampolles es van realitzar amb l'equip d'oximetria òptica Fibox 3 LCD trace i els sensors PresensPrecisionSensingGmbH (Ordercode: SPPSt3-NAU-D5-CAF; batchnumber: 1203-01_PSt3-0828-01, PreSens, Regensburg, Alemanya). Per la diàlisi de les mostres es van utilitzar membranes de diàlisi amb una porositat de 3,5 kDa subministrades per Membrane Filtration Products Inc. (San Antonio, USA). Per la concentració de les mostres es va utilitzar l'equip d'evaporació al buit UNIVAP 100ECH (Uniequip, Martinsried, Germany). Per la liofilització de les mostres es va utilitzar l'equip Telstar LyoQuest HT40 de Telstar (Terrassa, Espanya). Per la filtració de les solucions prèvia a la HPLC es van utilitzar filtres d'acetat de cel·lulosa de 0,22 µm de Millipore GSE (Madrid, Espanya). La separació, identificació i quantificació dels polisacàrids i proteïnes es va dur a terme amb el sistema de cromatografia líquida d'alta precisió Agilent 1100 Series d'Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanya). Les columnes Shodex OHpak SB-803 HQ i Shodex SB-804 HQ utilitzades per la separació en fase sòlida de polisacàrids i proteïnes van ser subministrades per Showa Denko K. K. (Tòquio, Japó).

3.2. Disseny experimental

La taxa de consum d'oxigen es va determinar segons la tècnica luminescent no invasiva descrita per Diéval et al. (2011) i utilitzada en diversos estudis (Navarro et al., 2016; Pascual et al., 2017; Pons et al., 2019). La Figura 4. *Esquema del disseny experimental*

seguit per la mesura del consum d'oxigen. representa el protocol experimental seguit, adaptat del treball previ del grup de recerca TECNENOL (Pascual et al., 2017).

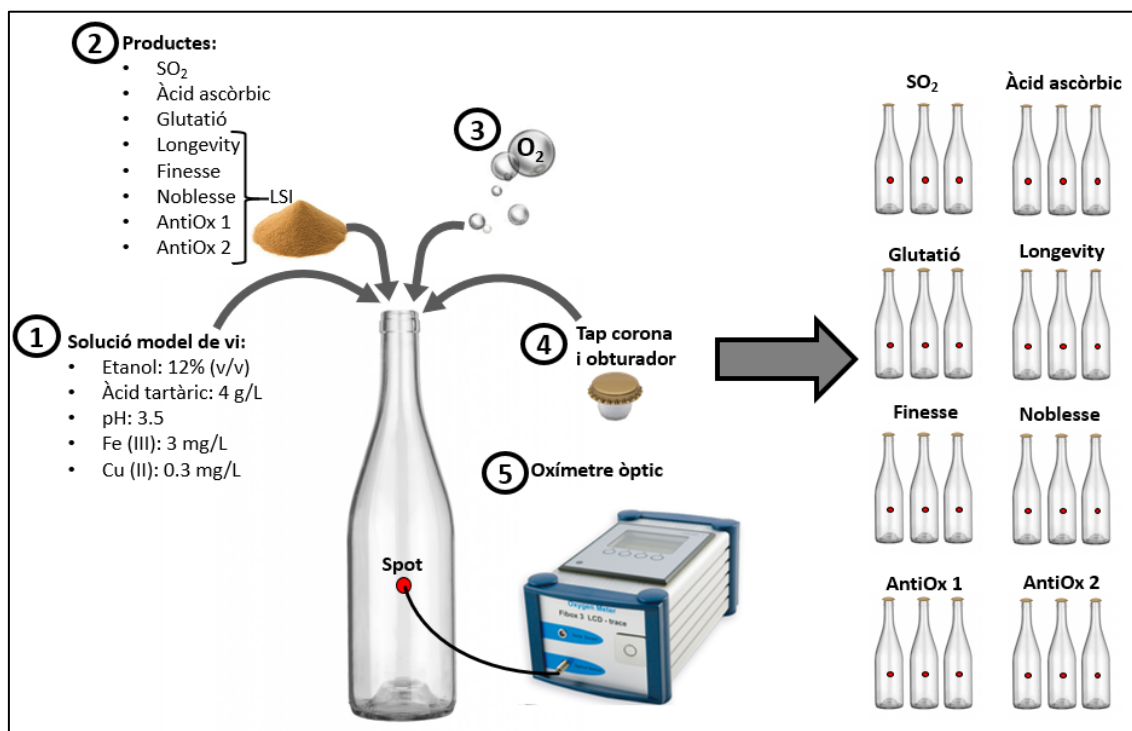


Figura 4. Esquema del disseny experimental seguit per la mesura del consum d'oxigen. 1. Es van omplir ampelles de 0,75 L amb una solució model de vi composta per etanol (12% (v/v)), àcid tartàric (4 g·L⁻¹), Fe (III) (3 mg·L⁻¹), Cu (II) (0,3 mg·L⁻¹) ajustada amb NaOH a un pH de 3,5. 2. Les ampelles es van suplementar amb diferents compostos antioxidants (SO₂, àcid ascòrbic, glutatió o diferents llevats secs inactius), 3. es van saturar amb oxigen mitjançant bombolleg i 4. es van xapar amb tap corona i obturador. 5. Finalment es va anar mesurant la concentració d'oxigen de l'interior de les ampelles mitjançant un oxímetre òptic i un sensor al interior de les ampelles durant 15 dies. Es van fer tres rèpliques per cada producte.

Es van utilitzar ampelles transparents de 0,75 L amb un sensor PSt3 prèviament enganxat al centre del seu interior. Aquest es va utilitzar, juntament amb l'equip d'oximetria òptica Fibox 3 LCD trace, per la mesura no invasiva mitjançant luminescència de la quantitat d'oxigen dissolt. L'equip Fibox 3 mesura el temps de decadència de la luminescència d'un luminòfor immobilitzat. El luminòfor s'excita amb llum monocromàtica d'una intensitat moderada aportada per una fibra òptica i el seu temps de decadència provoca un retard del temps d'emissió del senyal de llum per part del luminòfor. Aquest temps de decadència disminueix en presència d'oxigen, pel que es pot correlacionar el valor del senyal amb la concentració d'oxigen (Diéval et al., 2011).

Totes les ampelles es van omplir amb una solució model de vi composta per 12% (v/v) d'etanol, 4 g·L⁻¹ d'àcid tartàric, 3 mg·L⁻¹ de Fe (III) en forma de sulfat de ferro (II) heptahidratat i 0,3 mg·L⁻¹ de Cu (II) en forma de sulfat de coure (II) pentahidratat. El pH es va ajustar a 3,5 amb NaOH.

Aquestes ampolles es van suplementar amb els diferents compostos antioxidants (SO_2 , àcid ascòrbic o glutatió) o diferents tipus de llevat sec inactiu (*Pure-LessTM Longevity*, *Noblesse[®]*, *Finesse[®]*, *R&D SIY AntiOx1* i *R&D SIY AntiOx2*). A més, també es van preparar ampolles que només contenien la solució model de vi sense cap producte afegit per utilitzar-les com a controls. Es van preparar tres rèpliques pel control, per cada producte químic i per cada LSI. Tal com indica la Taula 1, en funció del producte es van afegir les quantitats màximes habitualment recomanades o fins i tot, com en el cas del SO_2 i del glutatió, quantitats superiors a l'habitual. Hi ha antecedents que indiquen que una dosi de $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ del LSI *Pure-LessTM Longevity* té una capacitat de consum d'oxigen similar al de la dosi habitual d'ús de SO_2 ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Pons et al., 2019). Per aquest motiu es va prendre aquesta dosi com a referència i totes les maceracions de LSI es van fer amb dosis de $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. D'aquesta manera es tenien les condicions idònies per observar millor l'evolució de cada producte i es podrien obtenir diferències significatives del consum d'oxigen dels diferents productes en la menor quantitat de temps possible, un interval de 15 dies.

Taula 3. Diferències entre les dosis habituals de cada producte i les dosis utilitzades en aquest estudi (Pons et al., 2019).

Producte	Quantitat habitual ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Quantitat utilitzada ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Àcid ascòrbic	100	100
SO_2	30	50
Glutatió	20	200
LSI	400	400

A continuació es va afegir oxigen a cada ampolla mitjançant bombolleig amb aire durant 10 minuts per aconseguir una solució de vi model saturada d'oxigen (concentració de saturació: $8,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Finalment es van tancar les ampolles amb obturador i xapa corona minimitzant el volum de l'espai del coll de l'ampolla.

Al cap d'una hora es van iniciar les mesures de la concentració d'oxigen mitjançant el sensor i l'oxímetre òptic. Des de llavors, es van anar prenent mesures periòdicament durant 15 dies fins al complet consum de l'oxigen. Durant aquest interval de temps les mostres es van mantenir a una temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ en un lloc sec i fosc.

En passar els 15 dies i una vegada acabades les mesures de la concentració d'oxigen, es van obrir les ampolles amb $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de LSI per analitzar-ne la concentració de polisacàrids i proteïnes.

3.3. Extracció de polisacàrids de les mostres

Les mostres es van processar utilitzant la metodologia descrita i validada per Ayestarán et al. (2004) i utilitzada en altres estudis (González-Royo et al., 2017; Medina-Trujillo, 2017). Aquest mètode analític es tracta d'un procediment de múltiples passos. Es va partir de 10 mL de cada mostra. Primer es van centrifugar les mostres (5 minuts a 8000 rpm) per aïllar la fase líquida del precipitat que contenia les lies. A continuació es va concentrar la mostra fins a un volum final de 2 mL utilitzant l'equip d'evaporació al buit UNIVAP 100ECH. Aquest pas era necessari fer-lo per assegurar que hi hagués una precipitació quantitativa de les diferents famílies de polisacàrids. Tots els polisacàrids solubles es van fer precipitar afegint 10 mL d'un medi d'alcohol àcid (HCl 0,3M en etanol absolut) i es van conservar a 4 °C durant 24 h. Al passar aquest temps es van centrifugar les mostres (15 minuts a 8500 rpm) i es van descartar els sobrenedants. A continuació es va resuspendre el precipitat amb 1 mL d'aigua ultrapura (Milli-Q), es van congelar a -20 °C i liofilitzar amb l'equip Telstar LyoQuest HT40.

3.4. Determinació de la concentració de polisacàrids per HPLC

Per determinar la concentració de polisacàrids presents a les mostres es va utilitzar un protocol de determinació per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*).

Es van resuspendre els pellets resultants de la liofilització amb 1 mL de formiat d'amoni (50 mM), es van filtrar amb filtres d'acetat de cel·lulosa amb porus de 0,22 µm i es van passar a vials d'HPLC. Els vials es van col·locar a l'equip Agilent 1100 Series de HPLC i es van injectar 100 µL de mostra al sistema cromatogràfic. La separació es va dur a terme a 20°C utilitzant dues columnes diferents (Shodex OHpak SB-803 HQ i Shodex SB-804 HQ, 300 mm x 8 mm) connectades en sèrie. La fase mòbil utilitzada consistia en una solució aquosa de formiat d'amoni (50mM) aplicada amb un cabal constant de 0,6 mL·min⁻¹ i l'anàlisi durava 60 minuts. El calibratge dels temps d'exclusió molar es va dur a terme amb l'anàlisi d'estàndards de dextrans de diferents pesos moleculars a través de la columna. D'aquesta manera es van poder conèixer els temps d'exclusió molar de cada fracció de polisacàrids i es va aconseguir separar-les en funció del seu pes (Taula 4). Les diferents fraccions de polisacàrids es van quantificar en funció de l'àrea del pic de cadascuna d'elles i utilitzant la recta patró feta amb estàndards comercials de pectines i dextrans amb rangs d'entre 0 i 2 g·L⁻¹ ($r^2 > 0,99$).

Taula 4. Classificació dels diferents grups de sacàrids en funció dels seus temps d'exclusió molar en HPLC.

Grup	kDa	Temps d'exclusió inicial (minuts)	Temps d'exclusió final (minuts)
Oligosacàrids	1 – 7,5	28,26	32,36
	7,5 – 40	24,86	28,26
Polisacàrids	40 – 180	21,80	24,86
	≥ 180	18,12	21,80

3.5. Extracció de proteïnes de les mostres

Les mostres es van processar utilitzant la metodologia descrita per Canals et al. (1998) i utilitzada en altres estudis (González-Royo et al., 2017; Medina-Trujillo et al., 2017).

Es van dialitzar dues alíquotes de 15 mL de cada mostra en membranes amb una porositat de 3,5 kDa. Aquesta diàlisi va permetre excloure totes les partícules més petites de 3,5 kDa, ja que aquestes van sortir a l'exterior, evitant així possibles interferències en la posterior determinació. Aquest pas es va realitzar en quatre dies i va requerir canviar el medi on se submergien les mostres cada dia. Els dos primers dies es va utilitzar una solució d'acetat d'amoni 0,3M com a medi i els altres dos es va utilitzar aigua ultra-pura Milli-Q. A continuació es van passar les mostres dialitzades en plaques de petri, es van congelar a -20°C i liofilitzar utilitzant l'equip Telstar LyoQuest HT40. Seguidament es van resuspendre els pellets resultants de la liofilització amb 1,5 mL d'aigua ultrapura Milli-Q, es van tornar a congelar a -20°C i liofilitzar per segona vegada. D'aquesta manera es va aconseguir concentrar les proteïnes de les mostres fins a 100 vegades la seva concentració inicial per facilitar-ne la seva anàlisi per HPLC.

3.6. Determinació de la concentració de proteïnes per HPLC

Per determinar la concentració de proteïnes presents a les mostres es va utilitzar un protocol de determinació per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC: High Performance Liquid Chromatography).

Es van re-suspendre els pellets resultants de la segona liofilització amb 0,6 mL d'acetat d'amoni (30 mM), es van filtrar amb filtres d'acetat de cel·lulosa amb porus de 0,22 µm i es van passar a vials d'HPLC. Els vials es van col·locar a l'equip Agilent 1100 Series d'HPLC i es van injectar 100 µL de mostra al sistema cromatogràfic. Aquesta vegada la separació es va dur a terme a 20°C utilitzant la columna Shodex OHpak SB-803 HQ. La fase mòbil consistia en una solució aquosa d'acetat d'amoni (30 mM) aplicada amb un cabal constant de 0,6 mL·min⁻¹ i l'anàlisi durava 70 minuts. El calibratge qualitatiu dels temps d'exclusió molar es va dur a terme amb l'anàlisi d'estàndards de diferents

proteïnes d'un rang d'entre 2 a 150 kDa. D'aquesta manera es van poder conèixer els temps d'exclusió molar de cada fracció de proteïnes i es va aconseguir separar-les en funció del seu pes (Taula 5). Les diferents fraccions de proteïnes es van quantificar en funció de l'àrea del pic generat per cadascuna d'elles i utilitzant la recta patró quantitativa feta amb estàndards externs de *Bovine Serum Albumin* (BSA) en un rang de concentracions d'entre 0 i 6000 mg·mL⁻¹ ($r^2 > 0,99$).

Taula 5. Classificació dels diferents grups de proteïnes en funció dels seus temps d'exclusió molar en HPLC.

Grup	kDa	Temps d'exclusió inicial (minuts)	Temps d'exclusió final (minuts)
Pèptids	≤ 2	18,08	24,57
	2 – 25	14,52	18,08
Petit pes molecular	25 – 50	13,54	14,52
Mitjà pes molecular	50 – 75	12,97	13,54
Alt pes molecular	75 - 150	11,99	12,97
	≥ 150	10,87	11,99

3.7. Anàlisi estadística

Totes les dades presentades a continuació s'expressen com les mitjanes aritmètiques $\pm$ la desviació estàndard de les tres rèpliques fetes per cada producte.

Per dur a terme l'anàlisi estadística de les dades experimentals es va utilitzar el programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA) i el software estadístic XLSTAT 2020 (Addinsoft Inc., NY, USA). Les diferències significatives es van determinar mitjançant l'anàlisi unidireccional de variància (ANOVA) utilitzant tests comparatius de Tukey (HSD) per comparar mostres intragrupals i intergrupals. L'interval de confiança utilitzat es va establir al 95% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Consum d'oxigen

La Figura 5 mostra la cinètica del consum d'oxigen al llarg del temps per part del SO₂, els LSI *Longevity* i *AntiOx1*, l'àcid ascòrbic i el glutatió en una solució model de vi saturada en oxigen a 20°C. La concentració d'oxigen de la solució model de vi control (sense cap antioxidant afegit) ha disminuït de forma insignificant i, en general, s'ha mantingut estable al llarg del temps. Per tant, en aquestes ampolles no hi ha hagut consum d'oxigen i les variacions de la concentració d'oxigen es poden considerar negligibles (no es mostren les dades). Per altra banda, els LSI *Finesse*, *Noblesse* i *AntiOx2* han seguit una cinètica diferent en la que el consum d'oxigen ha estat pràcticament nul, de manera que no tenia sentit continuar fent el seu estudi cinètic. A l'Annex 2 es pot observar el consum d'oxigen per part d'aquests LSI.

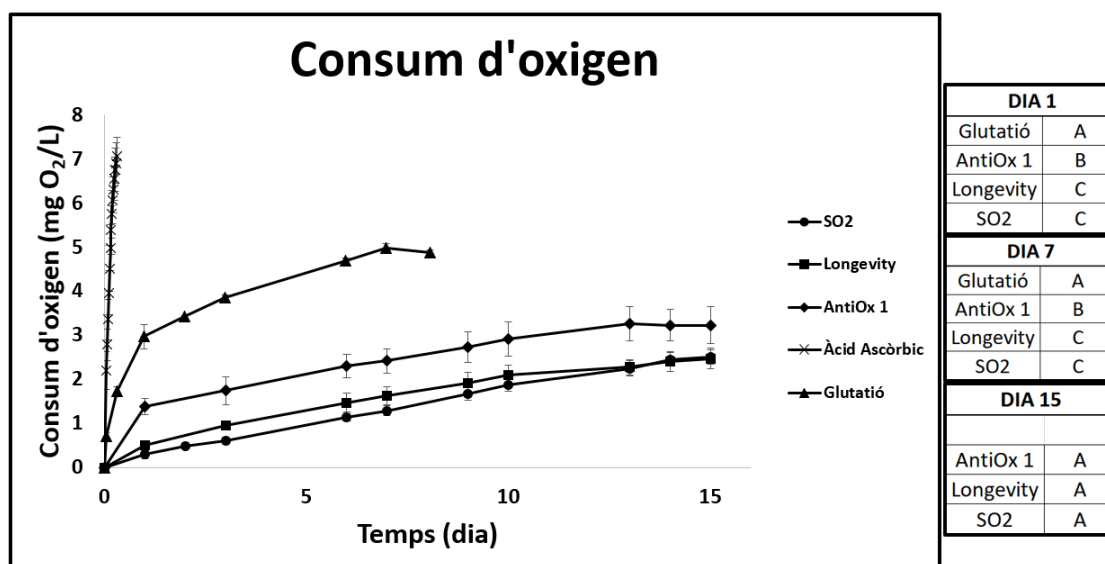


Figura 5. Consum d'oxigen de l'àcid ascòrbic, el glutatió, el SO₂ i els LSI *Longevity* i *AntiOx1* en una solució model de vi saturada en oxigen a 20 °C. Les tres taules de la dreta del gràfic mostren l'evolució dels diferents grups estadístics al llarg del temps. Les lletres A, B i C indiquen grups amb diferències estadísticament significatives entre ells ($p \leq 0.05$). No es mostren les dades del dia 8 perquè s'han obtingut resultats aberrants en el consum d'oxigen tots els productes estudiats. A partir del dia 7 no hi ha dades del consum d'oxigen per part del glutatió perquè ja havia consumit tot l'oxigen de l'ampolla, de manera que a partir d'aquest dia es van deixar de prendre mesures. No es mostra el consum d'oxigen dels LSI *Finesse*, *Noblesse* i *AntiOx2* perquè han seguit una cinètica diferent en la que el consum d'oxigen ha estat pràcticament nul.

En la Figura 5 es pot veure clarament que tant els productes antioxidants com els LSI han consumit oxigen al llarg del temps. Es pot observar com el consum d'oxigen està influenciat per la naturalesa de l'antioxidant utilitzat. L'àcid ascòrbic ha estat l'antioxidant més eficient amb diferència, ja que ha sigut capaç de consumir completament tot l'oxigen en menys de 10 hores. El glutatió ha tardat 7 dies en consumir tot l'oxigen. La resta de productes no han estat capaços de consumir la totalitat de l'oxigen durant els

15 dies. Al comparar la cinètica del consum d'oxigen del glutatió, el SO₂ i els LSI s'han obtingut diferències estadísticament significatives entre l'eficiència antioxidant d'aquests productes. Durant els primers 7 dies s'han obtingut tres grups estadísticament diferents. El primer està format pel glutatió, al segon hi ha el LSI *AntiOx1* i el tercer comprèn el LSI *Longevity* i el SO₂. En canvi, del dia 7 al 15 el consum d'oxigen dels diferents compostos ha anat evolucionant de manera que el dia 15 només hi ha un sol grup estadístic que comprèn els LSI *AntiOx1* i *Longevity* i el SO₂. En el cas del glutatió, no hi ha dades del consum d'oxigen a partir del dia 7 perquè en aquell punt ja havia consumit tot l'oxigen de l'ampolla, de manera que a partir d'aquest dia es van deixar de prendre mesures. Finalment, cal comentar que els LSI *Finesse* i *Noblesse* són productes que ja es troben al mercat i no s'utilitzen per prevenir l'oxidació, ja que no tenen potencial antioxidant, sinó que s'utilitzen per millorar les característiques organolèptiques i l'estabilitat del vi (Enologica Vason S.p.A., 2016; Malićanin et al., 2017). Per tant, els resultats obtinguts concorden amb aquesta informació. Per altra banda, el LSI *AntiOx2* es tracta d'un producte en estudi, de manera que els resultats obtinguts (Annex 2) indiquen que l'*AntiOx2* no serviria com a producte antioxidant.

A continuació s'han ajustat les dades per observar la quantitat d'oxigen que consumeix 1 mg de cada producte al llarg del temps. Els resultats es mostren a la Figura 6.

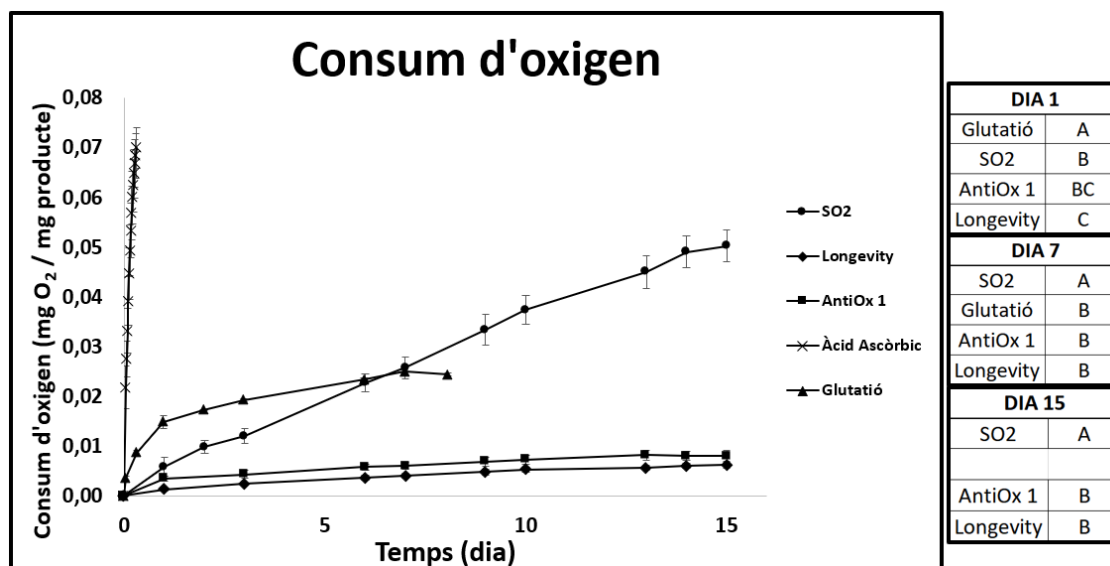


Figura 6. Consum d'oxigen d'1 mg d'àcid ascòrbic, glutatió, SO₂ i dels LSI *Longevity* i *AntiOx1* en una solució model de vi saturada en oxigen a 20 °C. Les tres taules de la dreta del gràfic mostren l'evolució dels diferents grups estadístics al llarg del temps. Les lletres A, B i C indiquen grups amb diferències estadísticament significatives ($p \leq 0.05$). A partir del dia 7 no hi ha dades del consum d'oxigen per part del glutatió perquè ja havia consumit tot l'oxigen de l'ampolla, de manera que a partir d'aquest dia es van deixar de prendre mesures. No es mostra el consum d'oxigen dels LSI *Finesse*, *Noblesse* i *AntiOx2* perquè han seguit una cinètica diferent en la que consum d'oxigen ha estat pràcticament nul.

En aquest gràfic es pot veure clarament que el consum d'oxigen d'1 mg de cada producte seria diferent al observat a la Figura 5. En aquest cas l'àcid ascòrbic segueix

sent el més eficient de tots, però hi ha variacions en la resta de productes. S'obtenen canvis en els diferents grups estadístics al llarg del temps.

Durant els primers 7 dies hi ha 3 grups estadístics diferents. Per ordre decreixent d'eficiència en el consum d'oxigen, el primer grup està format pel glutatió, el segon pel SO_2 i el tercer pel LSI *Longevity*. El LSI *AntiOx1* es troba entre el segon i el tercer grup estadístic, de manera que no té diferències significatives amb el SO_2 ni amb el *Longevity*. El dia 7, en canvi, ha passat a haver-hi només dos grups estadístics diferents. El primer està format pel SO_2 i el segon pel glutatió i els LSI *AntiOx1* i *Longevity*. Durant els últims dies segueixen havent-hi els mateixos dos grups estadístics, però la diferència entre aquests ha anat incrementant a mesura que ha passat el temps. El dia 15 s'observa que, a la mateixa concentració, el SO_2 consumeix 6,23 vegades més oxigen que el LSI *AntiOx1* i 8,14 vegades més que el LSI *Longevity*.

Les dades del consum d'oxigen del glutatió a partir del dia 7 i de les LSI *Finesse*, *Noblesse* i *AntiOx2* no apareixen al gràfic pels mateixos motius explicats anteriorment per la Figura 5, però es poden observar a l'Annex 3.

4.2. Aplicació del model cinètic

Per modelitzar la cinètica del consum d'oxigen i poder-la parametritzar s'ha seguit el model cinètic proposat per Pascual et al. (2017). S'ha fet la representació de la inversa de l'oxigen consumit entre la inversa del temps. La Figura 7 representa els resultats obtinguts pel SO_2 , l'àcid ascòrbic, el glutatió i els LSI *Longevity* i *AntiOx1*.

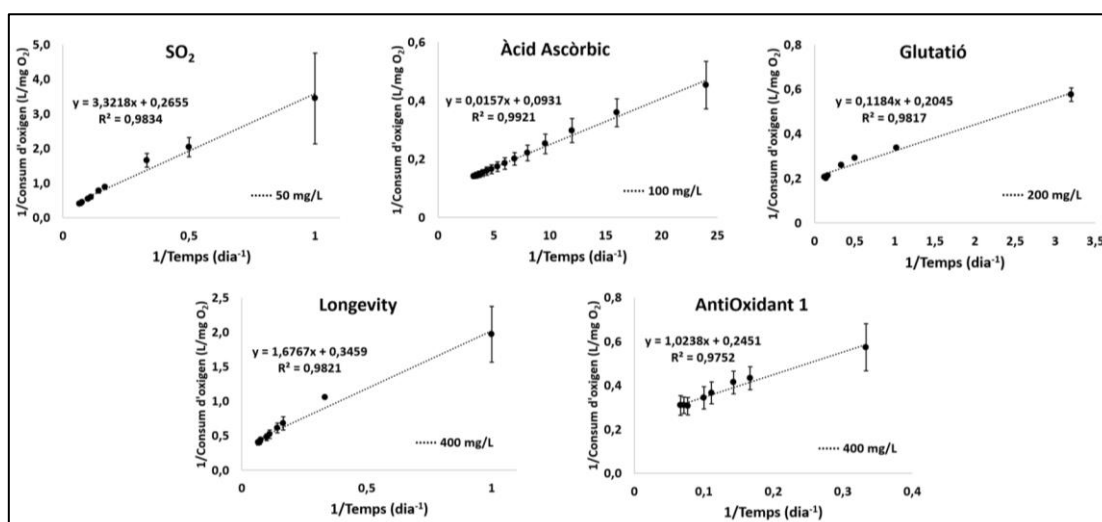


Figura 7. Aplicació del model cinètic, proposat per Pascual et al. (2017), en el consum d'oxigen de l'àcid ascòrbic, glutatió, SO_2 i dels LSI *Longevity* i *AntiOx1* en una solució model de vi saturada en oxigen a 20 °C. Les dades dels dos primers dies no s'han utilitzat per generar les rectes de regressió ja que no són significatives degut a les interferències provocades pel bombolleg d'oxigen previ a l'embotellament. Els LSI *Finesse*, *Noblesse* i *AntiOx2* no s'han pogut ajustar al model perquè han seguit una cinètica de consum d'oxigen diferent.

S'han obtingut coeficients de regressió lineal amb $R^2 > 0,97$, de manera que es confirma que el model cinètic utilitzat és l'adient. Les mesures del dia 1 i del dia 2 no són significatives degut a les interferències provocades pel bombolleig d'oxigen previ a l'embotellament. Per aquest motiu, les dades dels dos primers dies no s'han utilitzat per generar les rectes de regressió. Com s'ha comentat anteriorment, els LSI *Finesse*, *Noblesse* i *AntiOx2* han seguit una cinètica de consum d'oxigen diferent que la dels altres, pel que no s'han pogut ajustar al model.

Segons aquesta modelització es pot establir la següent equació:

$$\frac{1}{[O_2]} = \frac{A}{t} + B$$

On:
 $[O_2]$: Concentració d'oxigen ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
A: Pendent de la recta de regressió
B: Coordenada a l'origen de la recta
t: Temps (s)

Aquesta equació descriu la relació entre l'oxigen consumit i el temps. Partint d'aquí, si s'aïlla la variable de la concentració d'oxigen, se'n fa la primera derivada i es considera temps zero, es pot determinar la taxa de consum d'oxigen a temps zero (TCOt_0). La TCOt_0 correspon a la inversa del pendent de l'equació inicial ($1\cdot A^{-1}$). La Figura 8 mostra aquests càlculs.

El diagrama de flux mostra els passos següents:

- 1. Aïllar $[O_2]$** : A partir de l'equació $\frac{1}{[O_2]} = \frac{A}{t} + B$, es reorganitza per obtenir $[O_2] = \frac{t}{A+Bt}$.
- 2. Primera derivada**: Es calcula la derivada de $[O_2]$ respecte al temps, obtenint $\frac{d[O_2]}{dt} = \frac{A}{A^2 + 2ABt + B^2t^2}$.
- 3. Per $t = 0$** : Es substitueix $t = 0$ a la derivada, resultant $\frac{d[O_2]}{dt} = \frac{1}{A} = \text{TCOt}_0$.

Figura 8. Càlcul de la taxa de consum d'oxigen a temps 0 (TCOt_0) (Pascual et al., 2017). **1.** S'aïlla la variable de la concentració d'oxigen ($[O_2]$). **2.** Es fa la primera derivada. **3.** Es considera temps 0. **3.** Es determina la taxa de consum d'oxigen a temps zero (TCOt_0), que correspon al pendent de l'equació de la recta ($1\cdot A^{-1}$).

Per tant, aplicant aquest model cinètic amb els pendents dels gràfics obtinguts, es podrà trobar la TCOt_0 del SO_2 , l'àcid ascòrbic, el glutatió i dels LSI *Longevity* i *AntiOx1*. A l'Annex 4 es poden observar els valors de les equacions de cadascuna de les rectes de regressió lineal obtingudes amb els seus respectius valors de les R^2 i els càlculs de les diferents TCOt_0 . La Taula 6 i la Figura 9 mostren els valors obtinguts de les TCOt_0 .

Taula 6. Taxa del consum d'oxigen a temps 0 (TCOt₀), TCOt₀ a les dosis habituals i Capacitat Antioxidant Relativa (RAC, de l'anglès *Relative Antioxidant Capacity*) del SO₂, l'àcid ascòrbic, el glutatió i els LSI *Longevity* i *AntiOx1* en una solució de vi model a 20 °C.

PRODUCTE	TCOt ₀ (mg O ₂ · L ⁻¹ · dia ⁻¹)		Dosis habituals (mg · L ⁻¹)	TCOt ₀ dosis habituals (mg O ₂ · L ⁻¹ · dia ⁻¹)		RAC (%)	
Àcid ascòrbic	63,69 ± 1,65	A	100	63,69 ± 0,016	A	3,54 · 10 ⁴ ± 165	A
Glutatió	8,45 ± 0,75	B	20	0,845 ± 0,004	B	469,13 ± 7,55	B
AntiOx1	0,97 ± 0,27	C	400	0,973 ± 0,001	B	540,58 ± 27,28	B
Longevity	0,60 ± 0,11	C	400	0,595 ± 0,0003	B	330,6 ± 11,12	B
SO ₂	0,30 ± 0,08	C	30	0,18 ± 0,002	B	100 ± 4,85	B

Les dades s'expressen com la mitjana aritmètica de les tres rèpliques amb la seva desviació estàndard. Les lletres A, B i C indiquen grups amb diferències estadísticament significatives ($p \leq 0.05$). TCOt₀: Taxa de consum d'oxigen a temps 0; RAC: Capacitat Antioxidant Relativa referent al SO₂.

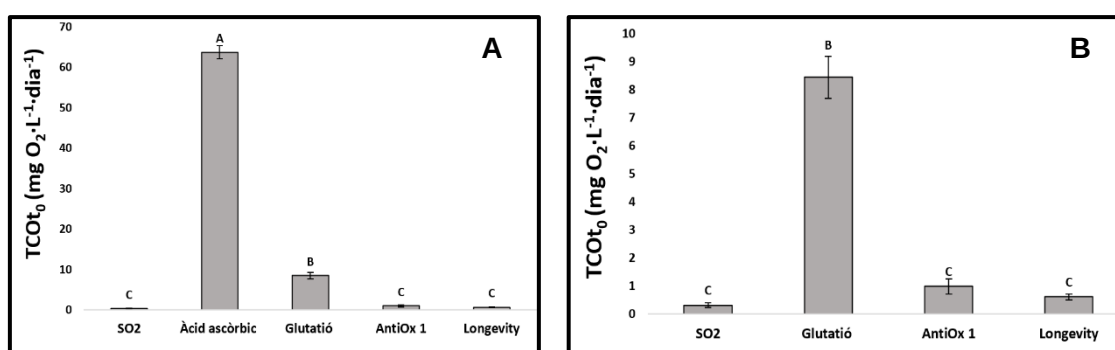


Figura 9. A. Taxa del consum d'oxigen a temps 0 (TCOt₀) del SO₂, l'àcid ascòrbic, el glutatió i els LSI *Longevity* i *AntiOx1*. B. Taxa del consum d'oxigen a temps 0 (TCOt₀) del SO₂, el glutatió i els LSI *Longevity* i *AntiOx1*. Les lletres A, B i C indiquen grups amb diferències estadísticament significatives ($p \leq 0.05$). TCOt₀: Taxa de consum d'oxigen a temps 0.

A la Figura 9 (A) es poden observar tres grups estadísticament significatius diferents. El primer el forma l'àcid ascòrbic, que presenta una taxa de consum molt més alta que la resta de productes. Tot i això, s'ha de tenir en compte que quan l'àcid ascòrbic s'inocula sense afegir SO₂, pot generar més oxidació a partir d'un cert temps de conservació, ja que genera peròxid d'hidrogen (Comuzzo et al., 2015). A la Figura 9 (B) es mostren les mateixes dades però sense la TCOt₀ de l'àcid ascòrbic, de manera que es poden observar millor les diferències entre els altres productes antioxidants. El segon grup estadístic està format pel glutatió i el tercer pels LSI *AntiOx1* i *Longevity* i el SO₂. A continuació s'han ajustat les TCOt₀ obtingudes a les dosis habituals d'ús de cada producte indicades a la Taula 3. Els resultats es mostren a la Taula 6 (TCOt₀ dosis habituals). Aquest valor indica les TCOt₀ a les dosis habituals d'ús, on varien els grups estadístics anteriors, passant a haver-n'hi dos. En aquest cas, l'àcid ascòrbic constitueix el primer grup estadístic i és dues unitats logarítmiques superior que la resta, els quals conformen el segon grup estadístic. El LSI *AntiOx1* és el segon producte antioxidant més eficient a les seves dosis d'ús (400 mg · L⁻¹). El glutatió és el següent producte amb la TCOt₀ més alta a les seves dosis habituals d'ús (20 mg · L⁻¹). El següent producte més

eficient a les dosis habituals d'ús és el LSI *Longevity* ($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Finalment, el SO_2 és el producte amb menys eficiència antioxidant a les seves dosis habituals d'ús ($30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) d'entre els productes estudiats.

Per quantificar la diferència de les diferents TCOt_0 s'ha utilitzat el valor de la Capacitat Antioxidant Relativa referent al SO_2 (RAC). El RAC expressa l'efectivitat relativa com a consumidors d'oxigen del diferents antioxidants i LSI en comparació amb el SO_2 , el producte més utilitzat habitualment per aquesta finalitat. Aquest valor s'obté contemplant les TCOt_0 a les dosis habituals d'ús de cada producte observades a la Taula 6. La Figura 10 mostra els resultats.

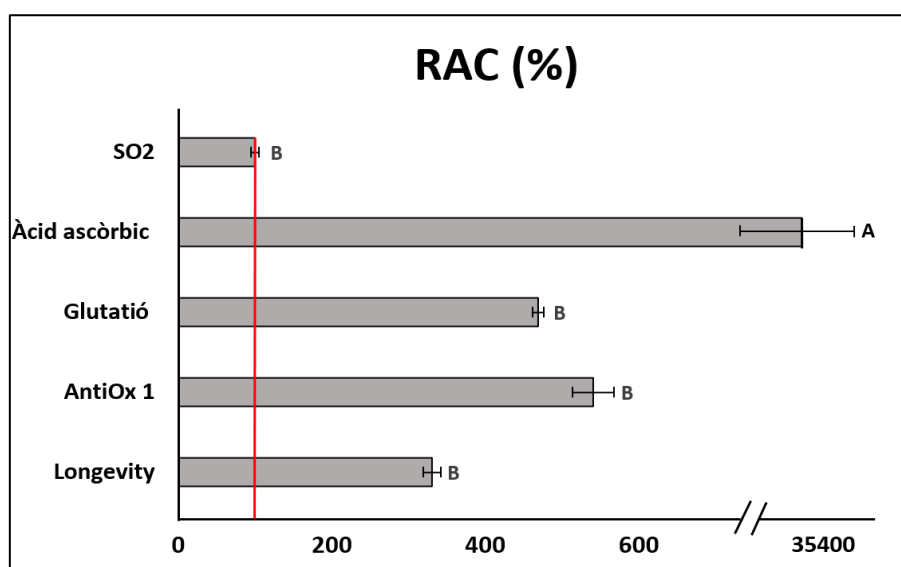


Figura 10. Capacitat Antioxidant Relativa referent al SO_2 (RAC) de l'àcid ascòrbic, el glutatió i els LSI *Longevity* i *AntiOx1*. Els valors s'expressen en percentatges, sent la RAC del SO_2 el 100%. Les lletres A i B indiquen grups amb diferències estadísticament significatives ($p \leq 0.05$).

Es pot observar que totes les RAC són diferents entre elles. Tots els productes antioxidants estudiats tenen una RAC superior que la del SO_2 . L'àcid ascòrbic té una RAC dues unitats logarítmiques superior que la resta. Això indica que aquest producte és molt més eficient que els altres, tal i com indicava la bibliografia (P. Comuzzo & Zironi, 2013; Piergiorgio Comuzzo et al., 2015) i com ja s'ha anat veient al llarg d'aquest estudi. Per altra banda, el LSI *AntiOx1* és el producte antioxidant amb la segona RAC més alta, seguit molt de prop pel glutatió. Aquests tenen una RAC 5,4 i 4,7 vegades superior que la del SO_2 , respectivament. Finalment, el LSI *Longevity* és el producte amb menys eficiència antioxidant d'entre els ja esmentats, tenint una RAC 3,3 vegades superior que la del SO_2 .

4.3. Validació de la modelització del consum d'oxigen

Finalment s'ha validat la modelització del consum d'oxigen dels diferents productes antioxidants estudiats. Aquesta validació s'ha fet substituint els valors A i B de cadascuna de les rectes de la Figura 7 a la següent equació:

$$[O_2] = \frac{t}{A+B \cdot t} \text{ (Figura 8)}$$

La Figura 11 mostra els resultats de la validació de la modelització representats com el consum d'oxigen al llarg del temps.

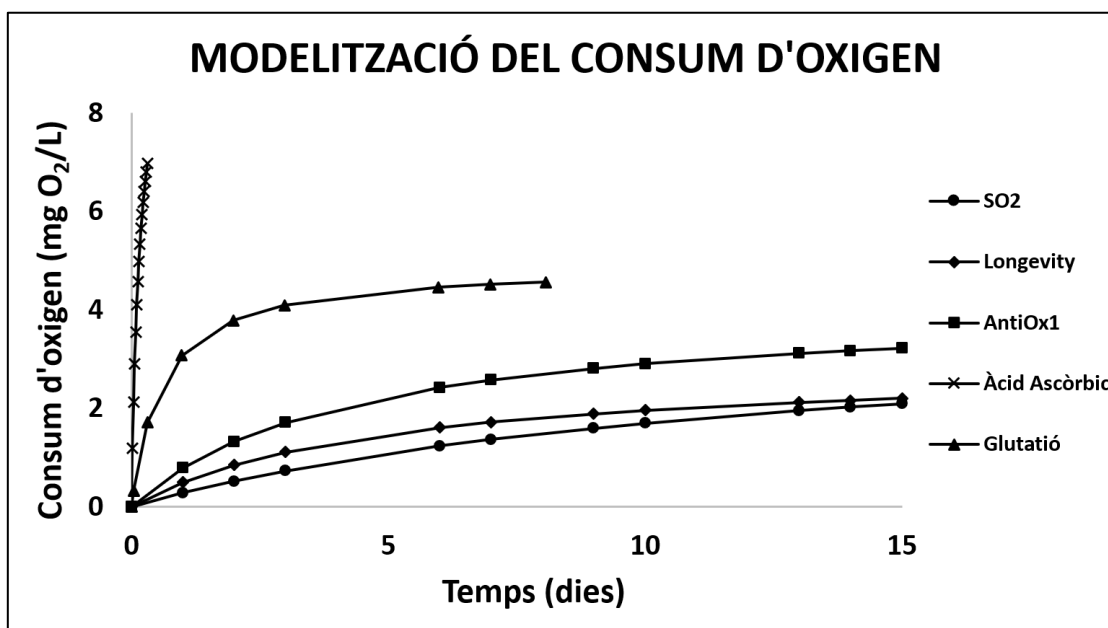


Figura 11. Modelització del consum d'oxigen del SO₂, l'àcid ascòrbic, el glutatió i els LSI *Longevity* i *AntiOx1* en una solució model saturada en oxigen a 20 °C a les dosis utilitzades en aquest estudi (Taula 3).

Els resultats mostren la cinètica de consum d'oxigen real dels diferents compostos antioxidants a les dosis utilitzades en aquest estudi (Taula 3). L'àcid ascòrbic és l'antioxidant que presenta un consum més eficient, tal i com ja hem vist anteriorment. El següent antioxidant més eficient és el glutatió, seguit pels LSI *AntiOx1* i *Longevity*. Finalment, el SO₂ ha resultat ser el compost amb menys eficiència antioxidant dels estudiats.

Els resultats d'aquesta validació concorden amb els de la Figura 5, de manera que es s'ha pogut comprovar que el model cinètic emprat és adequat. Per tant, el model matemàtic utilitzat (Figura 8) es podria extrapolar per estudiar el consum d'oxigen de diferents productes antioxidants en solucions de vi model.

4.4. Concentració de polisacàrids i proteïnes

No s'han pogut obtenir resultats de les concentracions de polisacàrids i proteïnes de les mostres. Els pics obtinguts en l'anàlisi per HPLC han sigut ínfims i no s'han pogut quantificar per extreure'n resultats significatius. Això s'ha degut a una concentració insuficient de les mostres en polisacàrids i proteïnes. S'ha repetit el protocol de preparació de les mostres, però aquesta vegada concentrant-les 1000 vegades més. Tot i això no s'han pogut injectar les mostres a l'equip de HPLC per analitzar-les degut a la impossibilitat d'assistir al laboratori per l'estat d'alarma decretat pel Govern d'Espanya.

5. CONCLUSIONS

El principal objectiu del present estudi era estudiar el potencial de diferents llevats secs inactius (LSI) per ser utilitzats com a alternativa per reduir la dosis d'altres antioxidants actualment utilitzats. Per arribar a una conclusió final s'ha trobat resposta als objectius específics plantejats:

- La caracterització del consum d'oxigen dels 5 LSI en una solució de vi model ha demostrat que el LSI R&D SIY AntiOx 1 és el més efectiu com a antioxidant. Aquest ha tingut una capacitat antioxidant amb una eficiència de vora el doble que la del següent LSI més efectiu, el *Pure-Less™ Longevity*. Els LSI *Noblesse®*, *Finesse®*, i *R&D SIY AntiOx2* han mostrat una cinètica de consum d'oxigen ínfima que s'ha considerat negligible.
- La comparació del consum d'oxigen dels LSI R&D SIY AntiOx1 i *Pure-Less™ Longevity* amb la dels tres additius antioxidants més utilitzats (SO₂, àcid ascòrbic i glutatió) ha mostrat que aquests consumeixen menys oxigen que l'àcid ascòrbic però més que el SO₂ a les dosis habituals d'ús. Per altra banda, s'ha pogut veure que el LSI *AntiOx1* és lleugerament més eficient que el glutatió reduït, però el LSI *Longevity* no.
- L'estudi de l'alliberament de polisacàrids i proteïnes per part dels LSI no s'ha pogut realitzar degut al confinament per la pandèmia de la COVID-19, pel que no s'ha pogut dur a terme una caracterització completa dels LSI.

Finalment, es pot concloure que els llevats secs inactius *Longevity* i *AntiOx1* consumeixen oxigen en una solució model de vi a una velocitat inferior que la de l'àcid ascòrbic, però superior que la del diòxid de sofre a les dosis habituals d'ús. Per tant, aquests poden ser eines interessants per complementar i disminuir les dosis de SO₂ per prevenir el vi de l'oxidació. A més a més, l'*AntiOx1* és més eficient que el *Longevity*. Això, juntament amb que aquest LSI encara no es troba al mercat, posiciona l'*AntiOx1* com a nou LSI amb les capacitats antioxidants més eficients. Tot i l'interès d'ambdós LSI degut a les seves capacitats antioxidants, cal tenir en compte que aquests no tenen propietats antisèptiques. Per tant, els LSI no podran substituir aquesta funció del SO₂ i, conseqüentment, no podran substituir completament el SO₂.

6. PERSPECTIVES DE FUTUR

Degut a la pandèmia de la COVID-19 no s'ha pogut tenir accés al laboratori durant la major part del període de temps que es tenia previst per realitzar aquest estudi. Per aquest motiu no s'han pogut acabar de completar l'estudi.

Es van congelar les mostres de les solucions model macerades amb els LSI. El següent pas haurà de ser l'estudi de l'alliberament de polisacàrids i proteïnes al medi per part dels diferents LSI. Una vegada s'obtinguin els resultats s'haurà de fer una comparativa entre el consum d'oxigen i l'alliberament de polisacàrids i proteïnes de cadascun dels LSI utilitzats. Per altra banda també s'haurà de comparar el consum d'oxigen consumit amb la quantitat de glutatió de cada LSI. Això permetrà veure si l'efecte antioxidant de les LSI és directament proporcional amb la quantitat de glutatió que aquests contenen. Un bon mètode per realitzar aquestes comparatives podria ser una anàlisi de components principals (PCA, de l'anglès *Principal Component Analysis*).

A continuació s'hauria de repetir el mateix estudi variant les condicions per veure l'efecte de diferents paràmetres. Per una banda s'hauria d'estudiar l'efecte de la concentració i la temperatura sobre el consum d'oxigen. Per això, s'haurà de repetir el procés utilitzant diferents concentracions de cada producte i a diferents temperatures. Per altra banda, s'hauria d'estudiar si els LSI interfereixen en l'activitat del SO_2 i a l'inrevés. En aquest cas, s'haurà de repetir el procés utilitzant diferents combinacions del SO_2 amb aquests LSI. Si s'utilitzen dosis habituals de SO_2 (50 mg/L) amb concentracions creixents dels LSI, es podrà veure si s'aconsegueix combinar la capacitat antioxidant de cada producte amb la del sulfurós i es comprovarà que no es neutralitzin entre ells. D'aquesta manera s'avaluarà el potencial que tenen aquests LSI per combinar-los per reduir les dosis de SO_2 utilitzades en la vinificació.

Finalment s'haurien de provar els LSI en una vinificació real a petita escala per veure com afecten realment a la qualitat del vi, ja que les solucions models utilitzades en aquest estudi eren molt estandarditzades. S'haurà de comparar el vi resultant amb un anàlisi organolèptic complet, de manera que es podrà veure si els LSI són capaços de garantir una estabilitat i qualitat del vi, tal i com la garanteix el SO_2 . Tot i això, caldrà tenir en compte que el SO_2 té propietats antioxidants però també antisèptiques. En canvi els LSI són molt interessants degut a les seves capacitats antioxidants, però no són antisèptics, de manera que els LSI podrien reduir l'oxidació del vi, però no podrien controlar totes les possibles contaminacions per *Brettanomyces* i bacteris acètics. Per tant, tots els resultats que s'obtinguin estaran destinats a reduir les dosis de SO_2 , però no eliminar-lo completament.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abramovič, H., Košmerl, T., Ulrih, N. P., Cigic' ſ, B., & Cigic' ſ, C. (2015). Contribution of SO₂ to antioxidant potential of white wine. *Food Chemistry*, 174, 147–153.
- Andújar-Ortiz, I., Chaya, C., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., & Pozo-Bayón, M. A. (2014). Impact of Using New Commercial Glutathione Enriched Inactive Dry Yeast Oenological Preparations on the Aroma and Sensory Properties of Wines. *International Journal of Food Properties*, 17(5), 987–1001.
- Ayestarán, B., Guadalupe, Z., & León, D. (2004). Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 29–39.
- Canals, J. M., Arola, L., & Zamora, F. (1998). Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(4), 383–388.
- Commission of the European Communities. (2009). *COMMISSION REGULATION (EC) No 607/2009*.
- Comuzzo, P., & Zironi, R. (2013). Biotechnological Strategies for Controlling Wine Oxidation. *Food Engineering Reviews*, 5(4), 217–229.
- Comuzzo, Piergiorgio, Battistutta, F., Vendrame, M., Silvina Páez, M., Luisi, G., & Zironi, R. (2015). Antioxidant properties of different products and additives in white wine. *Food Chemistry*, 168(1), 107–114.
- Diéval, J.-B., Vidal, S., & Aagaard, O. (2011). Measurement of the Oxygen Transmission Rate of Co-extruded Wine Bottle Closures Using a Luminescence-Based Technique. *Packaging Technology and Science*, 24(7), 375–385.
- Du Toit, Wessel; Salmon, J.-M. (2013). El glutatión y su aplicación en la elaboración del vino. *The Wine Expert (Lallemant)*.
- Enologica Vason S.p.A. (2016). X-PRO ® FINESSE específicas levaduras inactivadas con efecto estabilizante, para la preservación natural de la finura de los vinos espumosos y para la mejoría del perlage.
- Falguera, V., Forns, M., & Ibarz, A. (2013). UVevis irradiation: An alternative to reduce SO₂ in white wines? *Food Science and Technology*, 51(1), 59–64.
- Fornairon-Bonnefond, C., Camarasa, C., Moutounet, M., & Salmon, J. M. (2002). New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: A bibliographic review. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, 36(2), 49–69.

- Fornairon-Bonnefond, C., & Salmon, J.-M. (2003). Impact of Oxygen Consumption by Yeast Lees on the Autolysis Phenomenon during Simulation of Wine Aging on Lees. *Food Chemistry*, 51, 2584–2590.
- González-Royo, E., Esteruelas, M., Kontoudakis, N., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2017). The effect of supplementation with three commercial inactive dry yeasts on the colour, phenolic compounds, polysaccharides and astringency of a model wine solution and red wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), 172–181.
- González-Royo, E., Urtasun, A., Gil, M., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., ... Zamora, F. (2013). Effect of yeast strain and supplementation with inactive yeast during alcoholic fermentation on wine polysaccharides. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64(2), 268–273.
- Guerrero, R., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 27–43.
- Karbowiak, T., Gougeon, R. D., Alinc, J. B., Brachais, L., Debeaufort, F., Voilley, A., & Chassagne, D. (2010). Wine oxidation and the role of cork. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(1), 20–52.
- Malićanin, M., Rac, V., & Rakić, V. (2017). The effect of inactivated yeast-based products on the process of wine aging, phenolic compounds and sensory characteristics of red wine Prokupac. *BIO Web of Conferences*, 9, 02004.
- Medina-Trujillo, L., Matias-Guiu, P., López-Bonillo, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2017). Physicochemical Characterization of the Foam of White and Rosé Base Wines for Sparkling Wine Production (AOC Cava). *American Journal of Enology and Viticulture*, 68(4), 485–495.
- Navarro, M., Kontoudakis, N., Giordanengo, T., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Fort, F., ... Zamora, F. (2016). Oxygen consumption by oak chips in a model wine solution; Influence of the botanical origin, toast level and ellagitannin content. *Food Chemistry*, 199, 822–827.
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5), 1115–1126.
- Pascual, O., Vignault, A., Gombau, J., Navarro, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., ... Zamora, F. (2017). Oxygen consumption rates by different oenological

tannins in a model wine solution. *Food Chemistry*, 234, 26–32.

Pons, P., Heras, J. M., Sieczkowski, N., Canals, J. M., Zamora, F. (2019). Determinación de la tasa de consumo de oxígeno por parte de una levadura seca inactivada (LSI) seleccionada para proteger al vino de la oxidación. *Enólogos*, 117, 62–67.

Rodríguez, M., Lezáun, J., Canals, R., Llaudy, M. C., Canals, J. M., & Zamora, F. (2005). Influence of the Presence of the Lees during Oak Ageing on Colour and Phenolic Compounds Composition of Red Wine. *Food Science and Technology International*, 11(4), 289–295.

Salmon, J.-M., Fornairon-Bonnefond, C., Mazauric, J.-P., & Moutounet, M. (2000). Oxygen consumption by wine lees: impact on lees integrity during wine ageing. *Food Chemistry*, 71, 519–528.

AUTOAVALUACIÓ

Al inici d'aquest treball tenia ganes de conèixer com era el món de la investigació científica des de dins i aprendre més coses sobre un camp que m'atrau molt, com és el de l'enologia i el de les begudes fermentades.

Durant el desenvolupament d'aquest estudi he anat aplicant coneixements assolits al llarg del grau i també n'he après molts sobre enologia gràcies a l'ajuda dels companys de laboratori.

A més, tot i no haver pogut estar tot el temps desitjat al laboratori per causa de la situació excepcional de la COVID-19, he adquirit experiència al laboratori, autonomia en la organització dels diferents protocols, millorat la cerca de bibliografia i enriqueit el meu estil d'escriptura científica.

En conclusió, aquest treball el valoro com a una experiència positiva que m'ha permès enriquir-me amb coneixements i endinsar-me en el món científic.

AGRAÏMENTS

Primerament voldria agrair al Dr. Fernando Zamora i al Dr. Joan Miquel Canals per donar-me l'oportunitat de treballar al seu grup de recerca i per la proposta del tema del present treball.

També m'agradaria donar les gràcies a tots els companys del grup TECNENOL i del laboratori per introduir-me al funcionament del laboratori, explicar-me els protocols del grup i ajudar-me a entendre el funcionament de l'equipament utilitzat, en especial al Pere, el Pol i l'Arnau.

A l'Anna, pels consells i l'ajuda. Moltes gràcies pel teu suport i companyia durant aquests anys de carrera, han estat essencials.

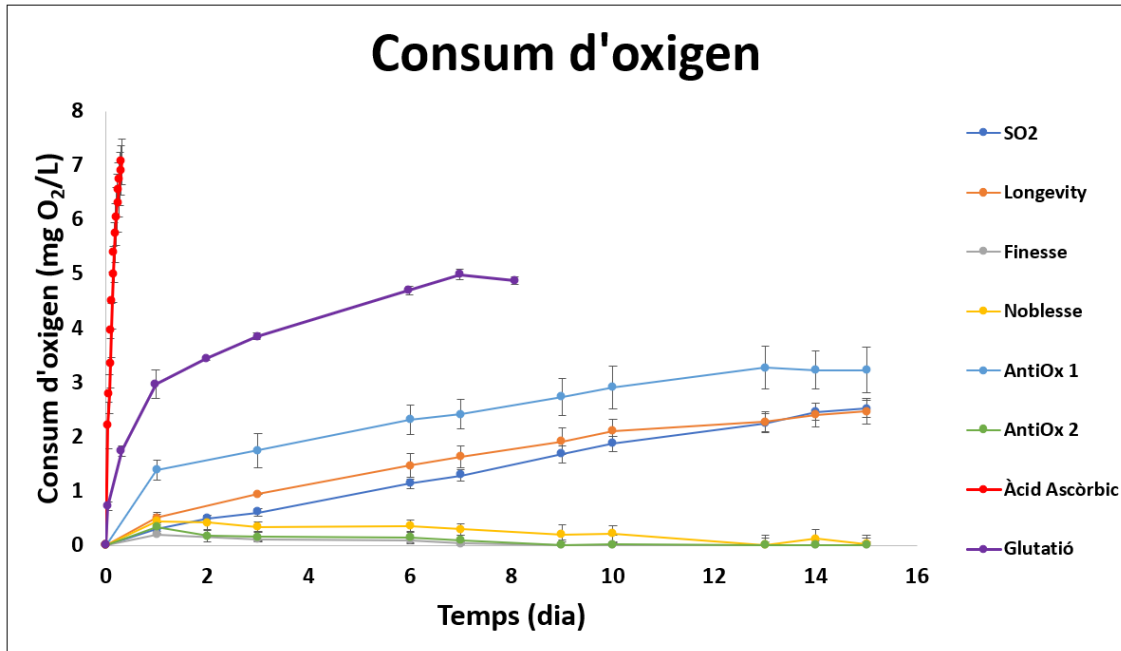
Finalment m'agradaria donar les gràcies als meus pares, l'Àngels i el Rafel, i a la meua germana, la Mireia, pel seu suport i la paciència que han tingut durant aquestes últimes setmanes. Gràcies a ells he pogut arribar on sóc actualment i els estic molt agraït per tot el que han fet per mi durant tots aquests anys.

ANNEXOS

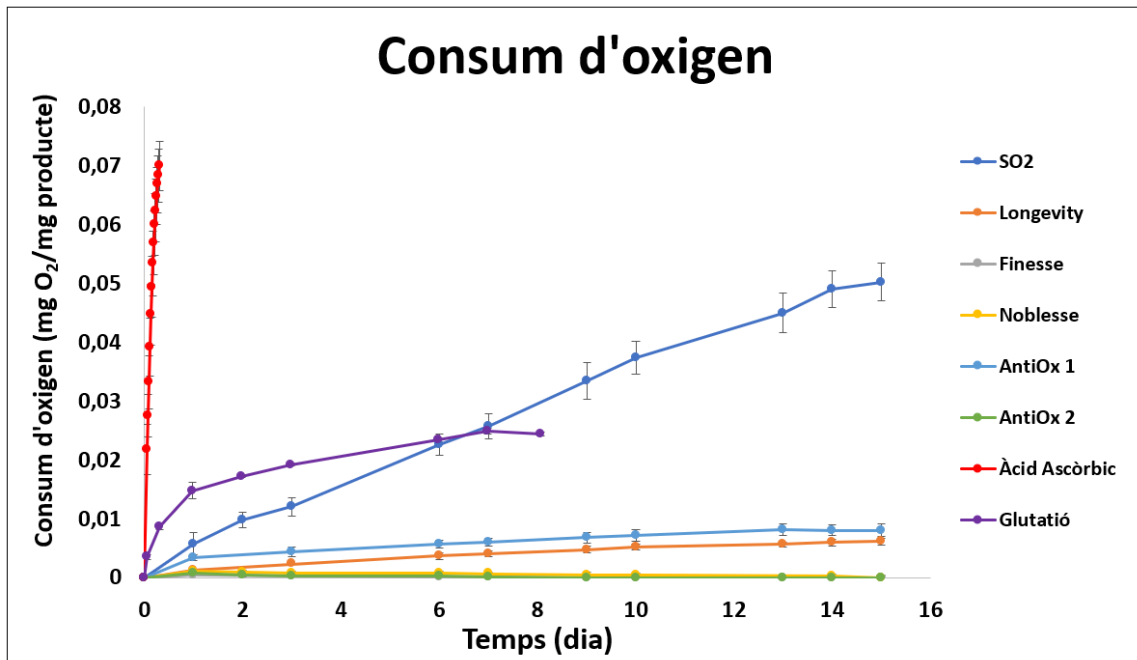
Annex 1. Taula d'abreviatures.

Abreviatura	Significat
LSI	Llevat Sec Inactiu
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
AOP	<i>Antioxidant Potential</i>
HCT	<i>Hydroxycinnamoyltartaric acids</i>
PPO	<i>Poliphenoloxidase</i>
POD	<i>Peroxydase</i>
PEF	<i>Pulsed Electric Fields</i>
HPP	<i>High Pressure Processing</i>
ASC	Àcid ascòrbic
GSH	Glutatió reduït
GSSG	Glutatió oxidat
GRP	<i>Grape Reaction Product</i>
OIV	<i>Organization Internationale de la Vigne et du Vin</i>
LAB	<i>Lactic Acid Bacteria</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
TCOt₀	Taxa de consum d'oxigen a temps 0
RAC	<i>Relative Antioxidant Capacity</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>

Annex 2. Consum d'oxigen de l'àcid ascòrbic, el glutatió, el SO₂ i els LSI *Longevity*, *Finesse*, *Noblesse*, *AntiOx1* i *AntiOx2* en una solució model de vi saturada en oxigen a 20°C.



Annex 3. Consum d'oxigen d'1 mg d'àcid ascòrbic, glutatió, SO₂ i dels LSI *Longevity*, *Finesse*, *Noblesse*, *AntiOx1* i *AntiOx2* en una solució model de vi saturada en oxigen a 20°C.



Annex 4. Taula resum dels valors de les equacions obtingudes en l'aplicació del model del consum d'oxigen ($y = A \cdot x + B$). El valor $TCOt_0$ s'obté de la inversa del pendent de la recta ($1/A$). Les lletres A, B i C indiquen grups amb diferències estadísticament significatives ($p \leq 0,05$).

VALORS RECTES (MG O₂ / L)							
Producte	Equacions rectes	R ²	A	B	TCOt ₀ (=1/A)	ERROR OCR	GRUP ESTADÍSTIC
Àcid ascòrbic	$y = 0,0157x + 0,0931$	0,992	0,016	0,093	63,694	1,653	A
Glutatió	$y = 0,1184x + 0,2045$	0,982	0,118	0,205	8,446	0,755	B
AntiOx 1	$y = 1,0275x + 0,2417$	0,975	1,028	0,242	0,973	0,273	C
Longevity	$y = 1,6802x + 0,3424$	0,982	1,680	0,342	0,595	0,111	C
SO ₂	$y = 3,3327x + 0,2561$	0,983	3,333	0,256	0,300	0,081	C

Annex 5. Taula resum dels resultats de l'anàlisi estadística dels valors del consum d'oxigen. Es va realitzar amb l'anàlisi unidireccional de variància (ANOVA) utilitzant els tests comparatius de Tukey (HSD). Les lletres A, B, C i D indiquen grups amb diferències estadísticament significatives ($p \leq 0,05$).

ANÀLISI ESTADÍSTICA																													
Temps / Tukey (HSD) / Anàlisi de les diferències entre les categories con un interval de confiança de 95%:																													
TEMPS		DIA 1		DIA 2		DIA 3		DIA 6		DIA 7		DIA 9		DIA 10		DIA 13		DIA 14		DIA 15									
CONSUM D'OXIGEN (mg O ₂ /L)	AMB CONTROL		Control	A	Control	B	Glutatió	A	Control	B	Glutatió	A	Control	A	Control	A	Control	A	Control	A	Control	A							
			Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B							
			AntiOx 1	C	AntiOx 1	C	AntiOx 1	C	AntiOx 1	C	AntiOx 1	C	AntiOx 1	B	AntiOx 1	C	AntiOx 1	B	AntiOx 1	C	AntiOx 1	B							
			Longevity	D	Longevity	CD	Longevity	D	Longevity	D	Longevity	D	Longevity	D	Longevity	C	Longevity	C	Longevity	C	Longevity	C							
CONSUM D'OXIGEN (mg O ₂ /mg producte)	SENSE CONTROL		SO2	D	SO2	D	SO2	D	SO2	D	SO2	D	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	B							
			Glutatió	A	Glutatió	A	Glutatió	A	Glutatió	A	Glutatió	A	Glutatió	A	Glutatió		Glutatió		Glutatió		Glutatió								
			AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	A	AntiOx 1	A	AntiOx 1	A	AntiOx 1	A							
			Longevity	C	Longevity	BC	Longevity	C	Longevity	C	Longevity	C	Longevity	C	Longevity	B	Longevity	B	Longevity	B	Longevity	AB							
CONSUM D'OXIGEN (mg O ₂ /mg producte)	AMB CONTROL		SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	B	SO2	B	SO2	B	SO2	B							
			Control	A	Control	A	Control	A	Control	A	Control	A	Control	A	Control	A	Control	A	Control	A	Control	A							
			Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B							
			SO2	C	SO2	C	SO2	C	Glutatió	C	Glutatió	C	Glutatió	C	Glutatió		Glutatió		Glutatió		Glutatió								
CONSUM D'OXIGEN (mg O ₂ /mg producte)	SENSE CONTROL		AntiOx 1	CD	AntiOx 1	D	AntiOx 1	D	AntiOx 1	CD	AntiOx 1	C	AntiOx 1	C	AntiOx 1	C	AntiOx 1	C	AntiOx 1	C	AntiOx 1	C							
			Longevity	D	Longevity	D	Longevity	D	Longevity	D	Longevity	C	Longevity	C	Longevity	C	Longevity	C	Longevity	C	Longevity	C							
			Glutatió	A	Glutatió	A	Glutatió	A	Glutatió	A	SO2	A	SO2	A	SO2	A	SO2	A	SO2	A	SO2	A							
			SO2	B	SO2	B	SO2	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió		Glutatió		Glutatió		Glutatió								
APLICACIÓ DEL MODEL DE CONSUM D'OXIGEN	AMB CONTROL		AntiOx 1	BC	AntiOx 1	C	AntiOx 1	C	AntiOx 1	BC	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B							
			Longevity	C	Longevity	C	Longevity	C	Longevity	C	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A							
			AntiOx 1	B	AntiOx 1	AB	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B							
			SO2	B	SO2	AB	SO2	C	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió		Glutatió		Glutatió		Glutatió								
APLICACIÓ DEL MODEL DE CONSUM D'OXIGEN	AMB CONTROL		Glutatió	B	Glutatió	AB	Glutatió	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	B							
			Control	B	Control	B	Control	C	Control	C	Control	C	Control	C	Control	C	Control	C	Control	C	Control	B							
			Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A							
			AntiOx 1	B	AntiOx 1	AB	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B	AntiOx 1	B							
APLICACIÓ DEL MODEL DE CONSUM D'OXIGEN	SENSE CONTROL		SO2	BC	SO2	AB	SO2	C	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió	B	Glutatió		Glutatió		Glutatió		Glutatió								
			Glutatió	C	Glutatió	B	Glutatió	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C	SO2	C							
			Control	C	Control	B	Control	C	Control	C	Control	C	Control	C	Control	C	Control	C	Control	C	Control	C							
			Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A	Longevity	A							

Annex 6. Resultats de l'anàlisi estadística dels valors de la TCot₀, la TCot₀ a les dosis habituals i la RAC. Es va realitzar amb l'anàlisi unidireccional de variància (ANOVA) utilitzant els tests comparatius de Tukey (HSD). Les lletres A, B, C i D indiquen grups amb diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$).

TCot₀				
Categoria	LS means (Var1)	Grups		
Àcid ascòrbic	63,694	A		
Glutatió	8,446		B	
AntiOx1	0,973			C
Longevity	0,595			C
SO₂	0,300			C

TCot₀ dosis habituals			
Categoria	LS means (Var1)	Grups	
Àcid ascòrbic	63,694	A	
AntiOx1	0,973		B
Glutatió	0,845		B
Longevity	0,595		B
SO₂	0,181		B

RAC (%)			
Categoria	LS means (Var1)	Grups	
Àcid ascòrbic	35378,981	A	
AntiOx1	540,584		B
Glutatió	469,130		B
Longevity	330,586		B
SO₂	100,000		B

