



Efecte de l'aplicació de l'intercanvi catiónic sobre la composició i qualitat del Cava

Arnau Just Borràs

Grau en Biotecnologia

Tutors: Fernando Zamora Marín i Joan Miquel Canals Bosch

Curs 2018/2019

Facultat d'Enologia

Grup de Tecnologia enològica. Departament de Bioquímica i Biotecnologia

Índex

1. Abstract.....	3
2. Resum	4
3. Introducció	5
3.1. Elaboració del vi base.....	7
3.2. Elaboració del Cava	10
3.3. Macromolècules del vi base.....	12
3.4. Paràmetres de qualitat dels vins escumosos.....	15
3.5. Efectes del canvi climàtic sobre el Cava.....	17
4. Hipòtesis	20
5. Objectius.....	20
6. Materials i mètodes.....	20
7. Resultats i discussió	30
8. Conclusions	43
9. Perspectives de futur	44
10. Autoavaluació	45
11. Agraïments	45
12. Bibliografia.....	46

1. Abstract

Cava is the brand for the sparkling wine produced mainly in Catalonia. This industry is an important sector for the local economy and it is regulated by the DO Cava. Sparkling wines are the result of the second fermentation of a base wine characterized for having a low alcohol graduation (11° at most).

The Cava must have high acidity levels and low pH to ensure an optimal freshness and conservation during ageing. However, due to climate change the grape juice (must) obtained from the grapes is changing its properties. The main consequence for Cava production is the decrease of pH which, results in a faster industrial maturation. Therefore, the lower pH could endanger the quality of the product in the future years. With the purpose of reverting these effects there are some methods like adding “legal” acids or using cation exchange columns to acidify musts. These columns decrease the pH by changing the potassium ions (K⁺) present in must for protons (H⁺).

This work analyses which effect will have the cation exchange column in the oenological, chemical and organoleptic properties of a Cava wine. To study these effects different blendings have been done by mixing normal must with increasing percentages (from 0% to 45%) of must passed through the columns (FreeK⁺ must). After the blending, the musts have been fermented to obtain the base wine. These base wines have been conducted to a second fermentation in order to obtain Cava.

Different parameters have been analyzed both in the must and in the base wine and also the second fermentation has been monitored. When the minimum time that the “Denominació d’origen Cava” establishes to consider Cava the product (9 months), it will be also analyzed.

Paraules clau

Vi escumós
Cava
Columna d’intercanvi Catiónic
Canvi climàtic
Fermentació alcohòlica
Potassi
Llevat
Saccharomyces cerevisiae
Most
pH
Acidesa
HPLC
Mosalux
Espectròmetre d’emissió atòmica

2. Resum

A Catalunya una de les indústries enològiques més conegudes és la elaboració de vi escumós o Cava. Aquesta indústria en moltes de les regions del territori, està regulada per el Consell Regulador del Cava. Els vins escumosos són el resultat de la refermentació d'un vi base de baixa graduació alcohòlica (com a màxim 11°).

Per la producció del Cava interessa partir de mostos amb acideses elevades i pH baix per tal d' assegurar un òptim nivell de frescor i conservació durant l'envelliment. No obstant, el canvi climàtic està fent que els mostos cada vegada tinguin un pH més elevat, fet que reverteix de forma negativa en el producte final del Cava. Per tal de disminuir aquest efecte existeixen alternatives d'acidificació com l'addició directe d'àcids legals en els mostos o l'ús de columnes amb resines d'intercanvi catiònic, conegudes com columnes FreeK⁺. Aquestes columnes capten el potassi del most (K⁺) i alliberen protons (H⁺) per tal d'acidificar el most.

En aquest treball s'ha estudiat quin és l'efecte sobre varis paràmetres enològics, químics i organolèptics d'un most passat per la columna d'intercanvi catiònic (most FreeK⁺) i el vi resultant. Per estudiar-ho, s'han fet diferents cupatges combinant concentracions creixents (de 0% fins 45%) de most FreeK⁺ amb un most sense tractar. Posteriorment s'ha fet fermentar per obtenir el vi base del Cava. El vi base obtingut ha estat preparat i envasat per tal de que fes la segona fermentació per obtenir Cava.

S'han analitzat diferents paràmetres tant en el most com en el vi base i també s'ha monitoritzat l'evolució de la segona fermentació. Quan hagin transcorregut els 9 mesos mínims que la Denominació d'origen Cava estableix per a que el producte sigui considerat Cava, s'analitzarà el producte final.

3. Introducció

Els vins espumosos són blancs o rosats als quals, després de finalitzar la primera fermentació en la que es transforma el most en vi base, s'afegeixen sucre i llevats prèviament adaptats a les condicions d'aquest a través de la formació del peu de cup.

Els vins espumosos més reconeguts a la Península Ibèrica s'elaboren en llocs determinats i es recullen sota la Denominació d'Origen Cava (DO Cava). Aquesta DO vetlla pel compliment dels requisits per obtenir un producte de qualitat.

La DO Cava defineix el seu producte com “un vi espumós de qualitat, obtingut mitjançant la realització d'una segona fermentació alcohòlica, en ampolla, del vi base i complint el “mètode tradicional”, en una zona geogràfica determinada”. A més a més afegeix que “el vi ha de restar, al menys, nou mesos en contacte amb les lies (massa formada per la població de llevats vius i morts precipitats) i en la mateixa ampolla en la que ha tingut lloc la segona fermentació” ((DO Cava, 2019)).

Per a l'obtenció del Cava cal que el raïm passi per un procés biològic de maduració. A finals d'agost en l'hemisferi Nord, els carrassos de raïm comencen a madurar en els ceps. En aquest punt, es distingeixen 3 tipus de maduració que es tenen en compte a l'hora de fer la verema ja que afecten en el vi final obtingut (Gil-Cortiella, 2014):

- **Maduració fisiològica:** Aquesta maduració es produeix abans del creixement i del verolat (canvi de color) del gra de raïm, quan les llavors s'acaben de formar i són prou madures per generar una nova planta. És poc important ja que avui en dia les llavors no es solen emprar per obtenir nous ceps.
- **Maduració industrial:** Aquesta maduració es produeix quan els sucres sintetitzats en les parts fotosintètiques del cep s'acumulen en els vacúols cel·lulars dels grans de raïm un cop ja s'han format les llavors. En aquest procés és quan es troba el valor màxim de sucres adequat en relació amb el contingut acídic. Els sucres acumulats són majoritàriament glucosa i poden arribar a concentracions de 150 a 250 g/L.

L'acidesa del raïm en el punt òptim de maduració està determinada majoritàriament per la presència d'àcid tartàric (5,5-2 g/L), cítric (1,5-0,5 g/L) i màlic (6,5-1,5 g/L) en la polpa (Mato et al., 2007; Monteiro et al., 2018; Ribereau-Gayon et al., 2006b).

A més, en aquest punt de maduració també existeix un component important de minerals, d'entre els que destaca el potassi. Aquest element s'acumula en la polpa en forma d'ió des del principi del desenvolupament dels grans, ja que no es metabolitza i assoleix concentracions d'entre 0,5-2 g/L. La seva concentració i la relació que té amb l'àcid tartàric marcarà el pH del fruit. Per altra banda, s'acumulen altres minerals en menys quantitat com el calci, el sodi, el magnesi i el ferro (Ribereau-Gayon et al., 2006b).

- **Maduració fenòlica:** En aquesta maduració els metabòlits secundaris i els compostos aromàtics i fenòlics presents en la pell assoleixen la seva màxima concentració. Aquesta maduració pren una importància fonamental en els vins negres, i menor en els vins blancs, ja que en aquests no s'utilitzen les pells en la fermentació (Kontoudakis, 2010).

La paret cel·lular té una forta importància en l'aparició de metabòlits secundaris ja que actua com a font de microfibrilles de cel·lulosa, hemicel·lulosa i sobretot, pectina. Aquesta paret no creix de forma proporcional amb la baina de raïm i es va debilitant amb la maduració del gra.

Units als polisacàrids de la paret cel·lular es troben les protociànidines (tanins) i diferents flavonoides (antocians i hidroxicinamats, majoritàriament) que s'acumulen abans del verolat i que es mantenen en una concentració constant durant la maduració (Gil-Cortiella, 2014).

Històricament, aquests 3 tipus de maduració es podien veure alterats per dos factors. Per una banda els permanents o immutables, relacionats amb la plantació del cep, com el clima, el tipus de sòl, la varietat de raïm, l'orientació de la finca i la densitat de plantació entre altres. Per altra banda, els factors variables que podien afectar la maduració són la temperatura, la radiació o la humitat (Gil-Cortiella, 2014). Els factors variables sempre oscil·len en un rang

determinat pels factors invariables com el clima o la orientació del terreny però degut al canvi climàtic, s'espera que aquests rangs es vegin greument alterats.

3.1. Elaboració del vi base

3.1.1. Varietats utilitzades

El vi base (vi destinat a la producció de Cava) ha d'haver estat obtingut a partir de les varietats acceptades per la DO Cava i ha de complir els requeriments preestablerts per la DO (DO Cava, 2019). Aquestes varietats han de ser:

- Raïm blanc: Macabeu, Xarel·lo, Parellada, Malvasia i Chardonnay.
- Raïm negre: Garnatxa negra, Monestrell, *Pinot Noir* i Trepat.

A més els ceps han de tenir un mínim de 10 anys per tal de que el vi que es produeix pugui ser considerat Cava (DO Cava, 2019).

3.1.2. Primera fermentació

Per fer la primera fermentació, es segueixen els mateixos criteris que es per fer vi blanc però amb alguns matisos.

Per obtenir un bon most destinat a la producció de vi blanc cal collir el raïm quan la maduració industrial es completa, per aportar de base la majoria d'aromes del vi. En el cas del Cava, com que interessa obtenir un most amb una acidesa major que els que es destinen a vins tranquils (vins sense escuma), la verema es realitza abans del punt òptim de maduració industrial. D'aquesta manera, la concentració d'àcids és més elevada i la de sucres més baixa respecte el punt de maduració industrial. Per altra banda, la verema es realitza a temperatures per sota dels 20°C, és a dir, de nit o aviat al matí per no afectar la composició del fruit.

Els vins blancs i per tant el Cava, s'obtenen a partir de varietats de raïm blanques o varietats negres concretes que permeten obtenir most blanc (blanc de negres). Mentre que els vins negres s'obtenen a partir de la fermentació del most amb pells i llavors, en els vins blancs la fermentació es fa sense aquestes parts sòlides del gra. És molt important separar la fase sòlida del most el més

aviat possible per tal de reduir els possibles aromes i gustos astringents que podria aportar, però és inevitable un petit grau de maceració conjunta mentre es fa el premsat previ a la primera fermentació. Tanmateix, aquesta maceració permet que les pells transfereixen al most algunes aromes i precursors d'aromes.

Per obtenir un vi de major qualitat és important que el most quedi el més clarificat i menys oxidat possible. Per fer-ho, es recomana obtenir-lo a baixa pressió de premsat i aplicació progressiva de la pressió així com minimitzar l'activitat mecànica per evitar al màxim el trencament de les llavors i de la pell del gra que podria suposar l'alliberació de substàncies no desitjades i a una temperatura inferior a 20°C per no afectar la composició del most (Ribereau-Gayon et al., 2006a).

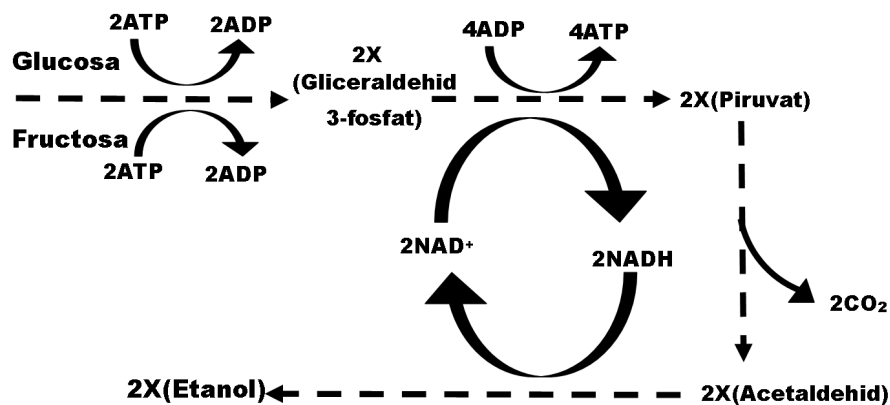
Cal protegir el most de l'oxigen ja que aquest podria afectar les aromes i el color produint un enfosquiment. Per fer-ho es combina la utilització de cups saturats amb gasos inerts i l'addició de diòxid de sofre (SO₂) en el most per bloquejar l'acció dels enzims que oxiden els compostos fenòlics. L'addició de SO₂ (que a més a més té capacitat microbicides) s'ha de fer repetidament en concentracions que en la UE no poden assolir els 200 mg/L finals en vins (Ardilouze, 2006; Lisanti et al., 2019).

Avui en dia estan sorgint altres tècniques alternatives a l'addició de SO₂ degut als seus efectes sobre persones amb hipersensibilitat tot i que cap té la mateixa eficàcia antioxidant i microbicides. En relació amb aquesta, es coneixen tècniques microbicides alternatives com l'addició de dimetil dicarbonat, lizozims o àcid sòrbic. Per altra banda, també hi ha altres mètodes útils per estabilitzar i clarificar el vi diferents a l'addició de SO₂ com l'addició de compostos fenòlics, *quitosano* o β -glucanasses o escalfar els mostos a 60°C durant uns minuts per desnaturalitzar les oxidases (Lisanti et al., 2019; Ribereau-Gayon et al., 2006a).

La clarificació del most, és a dir, treure els sòlids, és molt important ja que ens podrien afectar en la transformació del most a vi. Aquest procediment es sol fer filtrant el most juntament amb l'ús de bentonita, una argila que fa precipitar la

major part de proteïnes i cossos en suspensió que hi ha en el most (Sipag Bisalta).

Un cop clarificat, el most està llest per la inoculació dels llevats. Aquests llevats inoculats duren a terme la transformació del most en vi base que és, metabòlicament, una fermentació alcohòlica. Els llevats (*Saccharomyces cerevisiae*) transformen la glucosa i la fructosa en dues molècules de piruvat per tal de generar 2 molècules d'ATP i poder reductor en forma de NADH. El piruvat es transforma en acetaldehid i diòxid de carboni. L'acetaldehid es transforma en etanol a través d'una reacció facilitada pel poder reductor NADH generat anteriorment (Il·lustració 1).



Il·lustració 1: Esquema del procés metabòlic de la fermentació alcohòlica.

Tradicionalment s'havien emprat cultius *starter* de llevats que les bodegues feien amb els seus mostos i la fermentació espontània a partir dels llevats presents en la mostra, però en els últims anys s'ha substituït el mètode tradicional per la inoculació de llevats secs actius en el most. Aquests s'inoculen en una concentració de 10 a 15 g/hL o 10⁶ cèl·lules/mL de most just després de la clarificació (Ribereau-Gayon et al., 2006a).

Per tal d'afavorir que el llevat pugui desenvolupar la fermentació, el most ha de complir unes condicions:

- Si el most té menys de 25 mg de catió amoni o menys de 160 mg de nitrogen assimilable per litre s'ha de suplementar amb sulfat d'amoni fins assolir una concentració entre els 30 i 50 mg/L. Així s'aporta el nitrogen necessari perquè el llevat pugui fer la fermentació.

- La temperatura del tanc ha de trobar-se entre els 12 i els 24°C per afavorir el desenvolupament del llevat i no afectar les aromes del vi.

3.2. Elaboració del Cava

Els llevats són microorganismes molt resistents a l'alcohol que generen, això els hi confereix un avantatge per sobre dels altres microorganismes presents en la mostra ja que poden sobreviure en condicions més extremes. A més, per a les segones fermentacions s'utilitzen soques com la de *Saccharomyces cerevisiae* IOC 18-2007 adaptades a treballar sota altes pressions com les que es generen en el Cava (IOC, 2014).

El peu de cup s'obté en un procés en el que es fa créixer una població de llevats en un medi que es modifica progressivament per ser cada cop més similar al vi base i on s'hi afegeix sacarosa. Amb això, es busca l'adaptació i la multiplicació dels llevats a les condicions del medi per a que quan aquests siguin inoculats al vi base siguin capaços de reproduir-se i dur a terme la segona fermentació de manera eficaç (Pons Mercadé, 2015).

La formació d'un peu de cup és molt important ja que afavoreix que el llevat comenci la fermentació un cop es posa en contacte amb el vi base i per tant li atorga avantatge respecte les altres espècies microbianes que podrien estar presents en el vi.

Segons la DO Cava la segona fermentació que convertirà el vi base en Cava ha de transcórrer tota en la ampolla situada de forma horitzontal. Durant aquest procés els llevats són capaços de fermentar el sucre present en la mostra i convertir-lo en alcohol i CO₂ (DO Cava, 2019).

En la segona fermentació, a més del peu de cup s'afegeix sucre en forma de dextrosa per tal de que els llevats puguin dur a terme la segona fermentació. Aquest sucre s'acabarà digerint tot.

Malgrat que la segona fermentació es completi en un termini aproximat de 3 mesos, la DO Cava estableix que el procés ha de durar un temps determinat en funció de l'etiqueta que es vulgui donar al producte:

- 9 mesos, si és un Cava jove.
- 15 mesos si és un Cava Reserva.
- 30 mesos si és un Cava Gran Reserva.

Durant aquest temps el Cava està en contacte amb les lies sense que s'obri l'ampolla. S'estableix un procés d'envelliment que confereix caràcter al producte i s'inicia l'autòlisi dels llevats (*Il·lustració 2*).

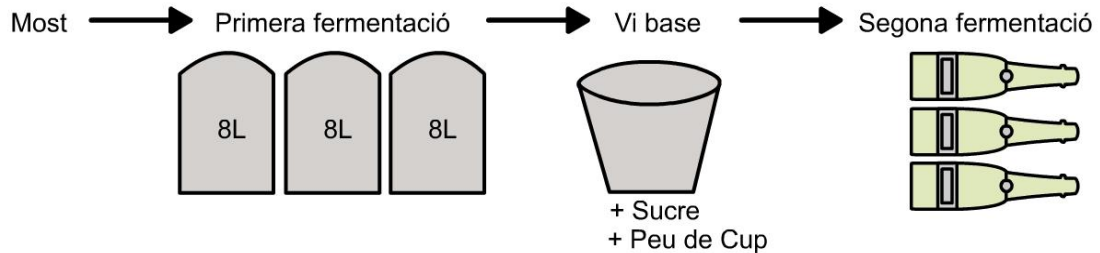
Quan ha passat el temps de fermentació hi ha un procés de remogut en que les ampolles es situen en posició vertical i invertida. Amb aquest canvi de posició s'aconsegueix acumular les lies al coll de l'ampolla i aturar la fermentació i autòlisis, a l'hora que les lies mateixes actuen com a inhibidors de l'oxidació que podria generar-se per l'entrada d'oxigen des del tap.

Quan s'han acumulat les lies al coll de l'ampolla s'ha de fer el degollat o extracció de les lies. Per fer-ho tradicionalment s'havia necessitat la mà d'experts degolladors que eren capaços d'obrir l'ampolla amb prou destresa com per eliminar totes les lies sense perdre contingut de Cava. Avui en dia moltes empreses ho fan a través de la congelació de les lies submergint el coll de l'ampolla en una solució molt freda de propilenglicol. Aquest procediment converteix les lies en un bloc congelat que surt per la pressió quan s'obre l'ampolla.

Durant el procés de degollat es perd una petita part de producte que pot ser reemplaçada amb el mateix producte o amb licor d'expedició (mescla de sacarosa, most de raïm, most parcialment fermentat, most concentrat, most rectificat, vi base o una mescla dels productes anteriors) però l'addició d'aquest últim mai pot superar el 0,5% de volum. En funció del producte emprat per reomplir l'ampolla s'obtindrà una categoria de Cava o una altra (DO Cava, 2019).

- Brut nature: contingut inferior a 3g/L de sucre i sense sucre afegit.
- Extra brut: contingut entre 0 i 6 g/L de sucre.

- Brut: contingut menor de 12g/L de sucre.
- Extra sec: contingut entre 12 i 17 g/L de sucre.
- Sec: contingut comprés entre 17 i 32 g/L de sucre.
- Semi-sec: contingut comprés entre 32 i 50 g/L de sucre.
- Dolç: conté més de 50 g/L de sucre.



Il·lustració 2: Procés d'elaboració del Cava fins on s'ha dut a terme en l'experiment.

3.3. Macromolècules del vi base

3.3.1. Polisacàrids

Al llarg de la maduració industrial, en els grans de raïm s'acumulen sucres en forma de glucosa i fructosa lliure (150-250 g/L en el most). A més, s'hi poden trobar altres monosacàrids minoritaris com la D-galactosa (0,1 g/L) i altres pentoses (0,3-2 g/L). Els disacàrids s'acumulen en concentracions molt més petites i ho solen fer en la forma de sacarosa (2-5 g/L). Aquest sucre format per glucosa i fructosa sol ser hidrolitzat en el mateix gra (Ribereau-Gayon et al., 2006b).

Els polisacàrids presents en el most provenen de la ruptura de les parets cel·lulars que formen el gra del raïm durant el procés de maduració i en el premsat. Els polisacàrids presents en el most es poden classificar en pectines (formades per àcid galacturònic i ramnosa) altament esterificades i gomes, les més abundants, (formades per -oses neutres com l'arabinosa, ramnosa i galactosa) (Madalena et al., 2014).

Els polisacàrids del most són trencats per pectinases presents de forma natural en el most, aquestes acabaran actuant, tal com ho fan la glucosa i fructosa, de font de carboni bàsica per als llevats que converteixen la matèria prima en el vi.

Per altra banda hi ha polisacàrids provinents dels llevats, que els alliberen durant la fermentació. Aquests són manoproteïnes (en un 80%) constituïdes per manosa en un 90% i per un 10% de proteïna. Els llevats també alliberen glucomanoproteïnes constituïdes per glucosa i manosa en un 50% i proteïnes en un 50%. Al llarg del temps, sobretot quan la segona fermentació ha acabat, l'autòlisi acaba provocant una alliberació d'enzims endo-glucànics que tallen part dels polisacàrids. Aquests fragments són importants perquè confereixen al Cava capacitat estabilitzadora de proteïnes, redueixen l'astringència i milloren l'aroma del producte. També s'ha vist que poden absorbir compostos fenòlics oxidants de manera que eviten l'enfosquiment (Barrio-Galán et al., 2016).

L'alliberació dels polisacàrids depèn bàsicament del tipus d'envelliment de la mostra, del contacte que aquesta tingui amb les lies i de la temperatura en la qual s'emmagatzemi. S'ha comprovat que els llevats n'alliberen més com més temperatura hi ha en el recipient. Així doncs malgrat els efectes positius que aquests polisacàrids tenen sobre el producte, s'alliberen de forma molt lenta (Barrio-Galán et al., 2016).

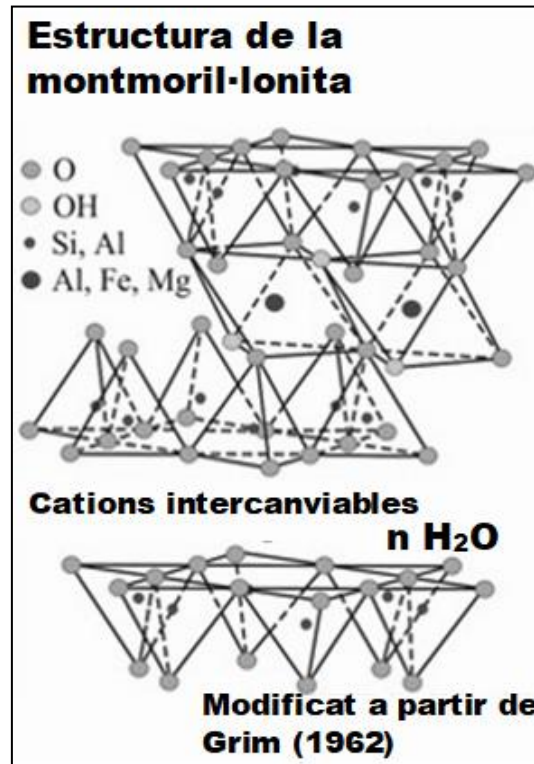
3.3.2. Proteïnes

Les concentracions de proteïnes en vi poden variar molt en funció del tipus de most del qual es parteix i sol ser entre unes desenes i uns 300 mg/L de most. La majoria de proteïnes són d'origen microbiològic i s'acumulen durant l'envelliment del vi degut a la autòlisi dels llevats però també en podem trobar d'origen vegetal.

Les proteïnes i els aminoàcids són els compostos de nitrogen més importants en el most, en el vi i a conseqüència, en el Cava. A més, però, podem trobar el nitrogen en altres formats que poden ser compostos inorgànics (sals d'amoni) o orgànics (amides, bioamines, nitrògens nucleics, amino sucres i pirazines).

Fins que el raïm no inicia l'etapa de "maduració industrial", les sals d'amoni són la forma més habitual en la que trobem el nitrogen fins que aquest comença a fer la "maduració industrial" on es converteix el nitrogen en orgànic o en altres formes de nitrogen inorgànic (Ribereau-Gayon et al., 2006b).

Després de la primera fermentació, el vi resultant sol tenir una terbolesa associada a les proteïnes d'origen vegetal d'una massa molecular petita (12-35 kDa). Per tal de resoldre el problema de la terbolesa, tradicionalment s'ha emprat Bentonita.



Il·lustració 3: Estructura química de la Bentonita (Sipag Bisalta).

Bentonita és el nom comercial de l'argila montmoril·lonita i inclou un grup de silicats d'alumini hidratat amb càrrega negativa que s'uneix a les proteïnes que es troben carregades de forma positiva degut al pH àcid del vi. Aquestes unions formen agregats insolubles que precipiten. Per altra banda, també s'ha demostrat que la Bentonita evita la precipitació del coure del vi i l'acció dels enzims oxidatius presents en el most. Aquesta argila s'ha popularitzat ja que en les concentracions que s'empra (80-120 g/hL) no genera gustos ni aromes secundaris (Ribereau-Gayon et al., 2006b).

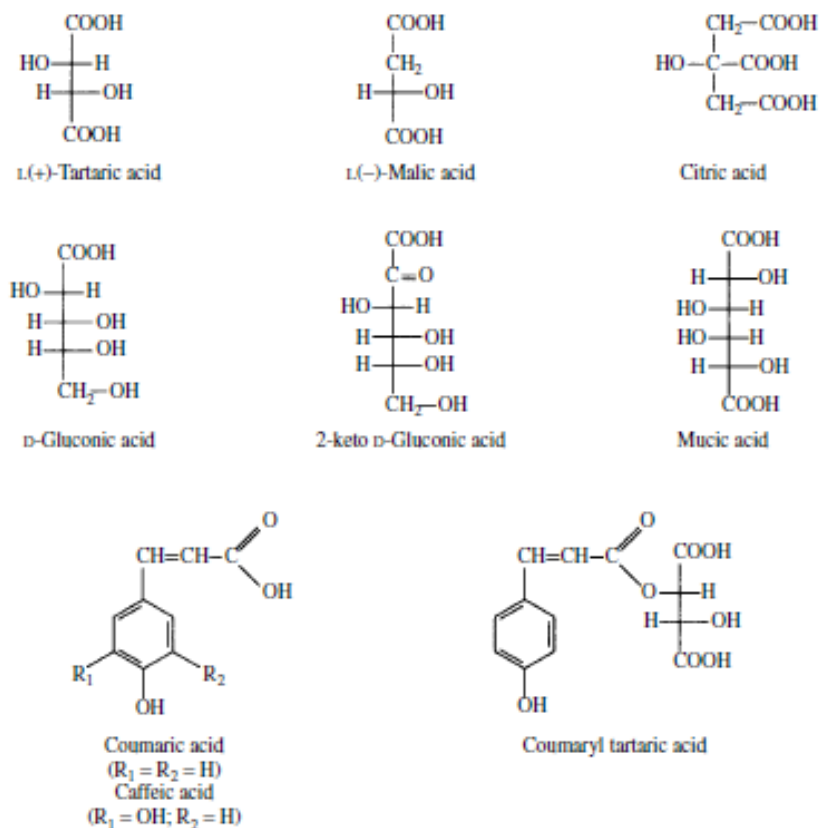
Avui en dia s'està investigant amb altres tractaments que poguessin tenir el mateix efecte que la Bentonita, com la ultrafiltració, la proteòlisi enzimàtica o escalfar el vi a 70-80°C durant un temps per desnaturalitzar i posteriorment fer precipitar les proteïnes al refredar-se el vi.

3.4. Paràmetres de qualitat dels vins escumosos

3.4.1. L'acidesa

L'acidesa és la concentració d'àcids presents en la mostra i no s'ha de confondre amb el pH. En el most ve determinada principalment per la concentració de 3 àcids (tartàric, màlic i cítric) i a mesura que les fermentacions avancen es generen altres àcids d'entre els quals destaquen el làctic (D i L), succínic, acètic, citramàlic, oxaloacètic i fumàric (Ribereau-Gayon et al., 2006b).

L'acidesa es mesura en mil·lilitres d'hidròxid de sodi consumits en una valoració que es fa fins a pH=8,2 i expressada en g/L d'àcid sulfúric o tartàric (Miller, 2015). Per altra banda, el pH depèn de la constant d'equilibri de tots els àcids (Ka) en el medi. Degut a la capacitat tamponant que té el mateix most, per les proteïnes i els àcids, el pH baixa molt poc durant la fermentació i això facilita la vida a *Saccharomyces cerevisiae*.



Il·lustració 4: Estructuració química dels diferents àcids que es poden trobar en el most (Ribereau-Gayon et al., 2006b).

Es distingeixen principalment dos tipus d'acidesa:

- **Acidesa total:** És la suma de tots els cations àcids. La contribució que fan tots els àcids ve determinada per la seva força (pKa) i que alhora determina el seu estat de dissociació i el grau en que es troben formant sals. Durant la fermentació l'augment d'alcohol fa disminuir la solubilitat d'algunes sals formades a partir dels àcids dissociats com és el cas del bitartrat de potassi i això fa baixar l'acidesa.
- **Acidesa volàtil:** És una petita part de l'acidesa total. Aquesta ve determinada majoritàriament per la concentració d'àcid acètic i està relacionada amb la contaminació per bacteris acètics. Aquest àcid es forma en presència d'oxigen i en el principi i final de la fermentació, quan disminueix de velocitat. Sol prendre importància durant la fermentació malolàctica, o durant fermentacions que tenen problemes i/o contaminacions de llevats diferents als utilitzats industrialment.

Pel que fa el Cava, segons la normativa vigent de la Denominació d'Origen, l'acidesa ha de trobar-se al voltant de 5 g/L i la acidesa volàtil ha de ser menor a 0,65 g/L. Pel que fa el pH s'estableix un rang de pH òptim comprès entre 2,8 i 3,4 (DO Cava, 2019).

3.4.2. La capacitat escumant

L'escuma és un paràmetre de qualitat de la mostra molt important. Cal que l'escuma tingui una durabilitat llarga, la qual es veu influenciada per la mida de les bombolles, que com més petites siguin millor.

Degut a la segona fermentació en ampolla, el CO₂ queda retingut en el Cava i genera una gran pressió dins de l'ampolla. La pressió generada fa que al obrir-se de cop l'ampolla el CO₂ s'alliberi i interaccioni amb els constituents del Cava formant l'escuma. Per tant l'escuma és una mescla heterogènia de diòxid de carboni, proteïnes, polisacàrids, manoproteïnes i glúcids que formen aquestes xarxes (Martínez-lapiente et al., 2015).

Els aminoàcids lliures són components importants en l'estabilitat de les bombolles de CO₂ ja que els confereixen més resistència i per tant n'augmenten la durabilitat en copa. Les proteïnes s'han establert com a

components importants per a l'estabilització de l'escuma, però poc importants en la seva formació. Per altra banda les glicoproteïnes i les manoproteïnes procedents dels llevats s'han caracteritzat com a els formadors d'escuma més importants (Martínez-lapiente et al., 2015).

3.5. Efectes del canvi climàtic sobre el Cava

El canvi climàtic, cada cop més evident, té un efecte clar sobre la maduració del raïm, per això en els últims anys ha estat molt estudiat.

La *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC), el panell de la ONU centrat en el canvi climàtic, ha estimat que la temperatura global està augmentant 0,2°C per dècada. Aquest fenomen s'espera que sigui molt més pronunciat en l'hemisferi Nord, degut a la major massa d'aigua que hi ha. A més, les pluges es concentraran en determinats períodes de l'any provocant èpoques més llargues de sequera (Masson-Delmotte et al., 2018).

Aquest fenomen fa que les condicions òptimes de creixement de vinya cada cop es situïn en cotes més elevades i que el procés de maduració del raïm estigui variant. L'augment de les temperatures ha provocat que la verema s'hagi anat avançant degut a que la maduració industrial s'ha avançat. Per contra la maduració fenòlica no ho ha fet de la mateixa manera provocant una variació en les dates en les que les dues maduracions esdevenen (Mira De Orduña, 2010; Royo, 2015).

El pH habitual dels mostos està per sota de 4, però avui en dia és habitual trobar mostos amb pH superiors a aquesta xifra en climes més càlids. Això es deu a la ràpida acumulació de sucres que fa que la concentració d'àcids disminueixi de forma més ràpida. Aquest fenomen s'ha observat especialment en l'àcid màlic.

Per altra banda també s'ha observat que amb el canvi climàtic ha augmentat la presència de cations de potassi (K^+) en el most. Aquests entren a l'espai intercel·lular al ser intercanviats a través de la membrana cel·lular per protons (H^+) que es trobaven dins provocant un augment del pH.

El Cava assoleix el seu nivell òptim com a producte de qualitat a partir d'un pH de 3,4, per això tradicionalment el raïm destinat al Cava es verema abans que assoleixi la maduració industrial. Aquest nivell baix de pH avui és més difícil d'obtenir degut a que els mostos i per tant els vins base són menys àcids.

Per tal de solucionar aquest problema existeixen diferents mètodes d'actuació sobre els mostos.

3.5.1. Acidificació

Tradicionalment els anys en que el most era poc àcid s'afegien àcids orgànics febles, majoritàriament àcid tartàric, per mantenir la frescor i fermesa dels vins i la capacitat antimicrobiana. No obstant, la baixa solubilitat d'aquest àcid i la formació de sals insolubles són un inconvenient.

Altres mètodes tradicionals per acidificar el pH eren l'addició de most de raïm veremat abans del seu punt de maduració industrial, o l'addició d'àcid cítric o làctic però ambdós mètodes tenen efectes secundaris sobre les propietats del vi (Ribereau-Gayon et al., 2006b).

3.5.2. Columna d'intercanvi catiònic

Avui en dia existeix una tècnica moderna que rep el nom d'intercanvi catiònic. Aquesta aprofita l'elevada presència d'ions de potassi en el most per intercanviar-lo per protons de la mateixa manera que ocorre en les cèl·lules dels grans de raïm.

Les columnes d'intercanvi catiònic estan compostes per resines específiques per a cations. En el cas dels vins són resines específiques per capturar ió potassi (K^+) i substituir-los per protons (H^+). Amb aquest mètode no només s'aconsegueix rebaixar el pH sinó que també s'evita la formació de bitartrat de potassi i s'afavoreix la presència d'àcid tartàric i a conseqüència s'estabilitza el most (Agrovin, 2011).

Aquest mètode, aprovat per la legislació europea (CE) i regulat per la *Organització Internacional de la Vinya (OIV)*, manté algunes restriccions sobre el mètode (Comunitat Europea, 2009; OIV, 2000):

- El tractament no ha d'alterar la natura del vi.

- El tractament no ha de reduir la intensitat del color del vi.
- El tractament no ha de reduir la concentració d' ions metàl·lics per sota de 300mg/L
- El tractament no ha de baixar el pH per sota de 3.0 i la disminució de pH no pot superar les 0,3 unitats de pH.
- La resina no ha de deixar substàncies en el vi o donar-li característiques que normalment no existeixen en el vi.

4. Hipòtesis

Les columnes d'intercanvi catiònic són un mètode d'acidificació del most que pot servir per reduir el pH del most i com a conseqüència del vi base i el Cava.

La columna d'intercanvi catiònic pot ser una eina útil en un futur per tal de revertir l'augment de pH dels mostos degut a l'efecte del canvi climàtic.

La columna d'intercanvi catiònic pot tindre un efecte sobre les macromolècules dissoltes en el most i les propietats enològiques.

5. Objectius

El canvi climàtic està fent que el most de Cava cada cop tingui un pH menys àcid. Aquest fet afecta la qualitat del producte i és necessari investigar en nous mètodes eficaços i segurs d'acidificació. Així, l'objectiu d'aquest treball és comprovar que les columnes d'intercanvi catiònic redueixen de forma efectiva el pH del most i vi i que no afecten en el procés de fermentació del Cava així com als seus paràmetres de qualitat.

6. Materials i mètodes

6.1. Most

Per fer l'experiment es partia de most obtingut de vinyes de Macabeu de l'Alt Penedès de les Bodegues Juvé & Camps. Aquest most (grup control) tenia una acidesa inicial de 5,7 g/L d'àcid tartàric; un pH de 3,2; un grau alcohòlic probable de 9,8 i un contingut en potassi de 765 mg/L. Part d'aquest most es va fer circular per la columna d'intercanvi catiònic fins a obtenir un most amb una acidesa de 8,7 g/L d'àcid tartàric; un pH de 1,9 i un contingut en potassi de 26,76 mg/L (a partir d'ara, most FreeK⁺).

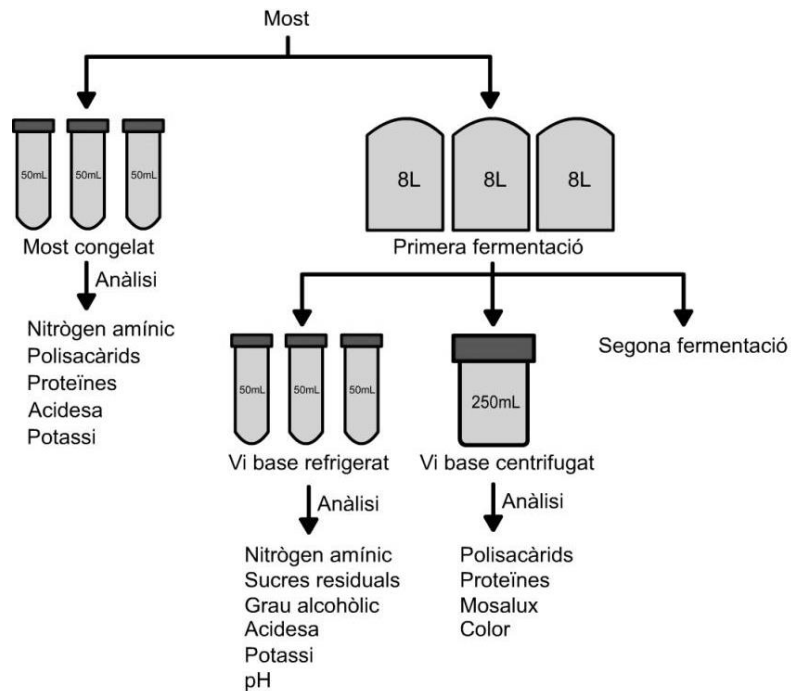
Per tal de comprovar que la columna d'intercanvi catiònic no afectava la qualitat del Cava, es van analitzar diferents paràmetres. Es van fer diferents grups experimentals als quals s'hi afegia un 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 35% o un 45% de most passat per la columna d'intercanvi catiònic (most FreeK⁺).

Les analítiques es van fer, excepte en alguns casos, tant pel most com pel vi base i transcorreguts 9 mesos del tiratge del Cava (segona fermentació), s'hauran de fer les mateixes al producte acabat.

Recepció de les mostres

Les mostres del most es van mantenir congelades a -22°C en tubs falcon de 50mL des del moment en que es va obtenir el most fins que va ser l'hora de fer-ne els anàlisis. Durant el procés de congelació la mostra perd tot el gas i també precipiten tots els elements que podrien provocar interferències en futurs anàlisis.

Per altra banda les mostres de vi base es van obtenir dels tancs en que es va fer fermentar el most. Aquestes mostres es van posar en envasos de centrifugació de 250mL i es van centrifugar a 16266g 15 minuts per tal de que perdessin el gas i precipitessin les impureses. Aquestes mostres es van emprar per fer les analítiques que necessitaven més volum de mostra. Per altra banda es van omplir 2 tubs falcon de 50mL de cada una de les mostres que es van mantenir en refrigeració. Un es va emprar per fer els anàlisis de kits (procediments experimentals per trobar un component d'una mostra dissenyats i certificats per empreses les quals venen els reactius ja preparats) i l'altre tub falcon es va utilitzar per fer els anàlisis enològics bàsics.



Il·lustració 5: Esquema del tractament que s'ha fet a les mostres. Les mostres de most es van conservar congelades per evitar al màxim que qualsevol microorganisme hi creixés.

6.2. Fermentacions

Primera fermentació

Per a la primera fermentació, es va inocular llevat comercial *Saccharomyces cerevisiae* EC118 (Lallemand) al most. Aquesta va ser realitzada en dipòsits de 8L a una temperatura controlada de 17°C i la seva evolució va ser monitoritzada diàriament mesurant la densitat de sucres i es va donar per acabada quan la quantitat de sucres va ser inferior a 1g/L. Posteriorment totes les mostres es van guardar en una cambra freda a 4°C per tal d'estabilitzar i clarificar el vi.

El seguiment de la primera fermentació es va fer emprant un densímetre *Mettler Toledo (PortableLab™)*. Aquest aparell permet conèixer la densitat del most. A mesura que avança la fermentació la concentració de sucres es redueix i per tant la densitat també ho fa de forma proporcional. Així doncs, a partir de la mesura diària de la densitat dels diferents dipòsits es va poder determinar com avançava la fermentació. Tots els grups experimentals van seguir els procediments per triplicat.

Segona fermentació

El peu de cup es va realitzar amb vi de la varietat Macabeu, aigua i sacarosa amb concentracions creixents de vi i sucre fins assolir una població que en el vi final suposés una concentració de llevats *Saccharomyces cerevisiae* IOC 18-2007 de 2 milions de cèl·lules/mL.

La segona fermentació es va realitzar segons el mètode tradicional de segona fermentació en ampolla. Es van emprar ampolles verdes, obturador de plàstic i xapa metàl·lica. El seguiment de l'evolució de la fermentació es va realitzar amb un mètode de determinació de la pressió dins de l'ampolla.

Per calcular les pressions es va emprar l'equip *L. Sensor CO₂ (FTSYSTEM)* que permet conèixer la pressió de CO₂ en l'interior de les ampolles de forma no destructiva. Es van mesurar les pressions de les 3 ampolles de cada grup experimental en intervals creixents d'entre 3 i 7 dies.

6.3. Concentració de polisacàrids

Per tal de calcular la concentració de polisacàrids presents en les mostres s'emprà un protocol de determinació per cromatografia líquida d'alta resolució (*High Performance Liquid Chromatography - HPLC*).

Es parteix d'1mL de les mostres de vi base que es dilueixen en 9mL d'alcohol àcid (dissolució 0,3M d'HCl en etanol pur). Aquesta dilució es deixa en repòs 24h en cambra freda (4°C) per tal de que els polisacàrids precipitin.

Seguidament, es centrifuga la mostra 20 minuts a 11752g, es resuspèn en 1mL d'aigua miliQ i es congela. Finalment, es liofilitza (*Telstar LyoQuest*) i es resuspèn el *pelet* amb 0,5mL de formiat d'amoni 50mM.

Un cop resuspès, el *pelet* de polisacàrids es filtra i es passa en un vial d'HPLC. En aquest punt, la mostra ja és apta per ser analitzada al cromatògraf d'alta resolució (*Agilent Technologies 1200-1100*).

L'HPLC analitza els 100µL de mostra que són injectats a la columna. Les columnes Shodex OHpak SB-803 HQ i SB-804 HQ es connecten en sèrie. La

fase mòbil és la mateixa solució que s'utilitza per resuspendre el *pelet* de format d'amoni (50mM). S'estableix un cabal de 0,6mL/min i l'anàlisi dura 60 minuts. La calibració dels temps d'exclusió molecular es va fer a través de l'anàlisi de diferents dextrans de diferents pesos moleculars per la columna. La recta patró es va obtenir injectant solucions patró en les mateixes condicions en rangs de 0 a 2g/L.

Taula 1: Separació dels diferents grups de sacàrids segons el temps d'exclusió molecular de cadascun en HPLC.

Temps inici exclusió (minuts)	Temps final exclusió (minuts)	kDa	Grup
17,5	21,1	≥ 180	Polisacàrids
21,1	24,1	180-40	
24,1	27,4	40-7,5	
27,4	33	7,5-1	Oligosacàrids
33	43	≤ 1	

6.4. Concentració de proteïnes

Per tal de preparar les mostres per quantificar les proteïnes amb l'HPLC es va fer una diàlisi prèvia per purificar-les al màxim i evitar la interferència dels tanins.

La diàlisi es va fer col·locant 15mL de mostra en saquets de cel·lulosa amb una porositat de 3500 Daltons. Amb aquesta porositat s'aconsegueix que les partícules més petites surtin cap el medi exterior. El procés de diàlisi dura 4 dies, els dos primers les mostres es submergeixen en una solució 0.3M d'acetat d'amoni per eliminar els tanins de la mostra i els altres dos en aigua miliQ per acabar d'afavorir la diàlisi.

Un cop acabada la diàlisi es posa el "dialitzat" del saquet en plaques de petri, es congelen i es liofilitzen. Seguidament, es recupera el *pelet* amb 1,5 mL d'aigua miliQ i es torna a liofilitzar. Després, es suspèn el *pelet* amb 0,6mL d'acetat d'amoni 300mmol/L, es filtra i es passa a un vial d'HPLC.

L'anàlisi es va fer amb l'HPLC *Agilent Technologies 1200-1100* i utilitza 100µL de mostra que són injectats a la columna. En aquest cas es va fer servir la columna 165 Shodex OHPak SB-803 HQ. La fase mòbil és acetat d'amoni 300mmol/L. S'estableix un cabal de 0,6mL/min i l'anàlisi dura 70 minuts. La

calibració (qualitativa) dels diferents temps d'exclusió molecular es fa amb diferents proteïnes des de 2 fins a 150 kDa. La recta de calibració quantitativa es va realitzar amb Bovine Serum Albumin (BSA) en les mateixes condicions en unes concentracions entre 0 i 6000mg/mL.

Taula 2: Separació dels diferents grups de proteïnes segons el temps d'exclusió molecular de cadascun en HPLC.

Temps inici exclusió (minuts)	Temps final exclusió (minuts)	kDa	Grup
9,00	10,75	≥150	Alt pes molecular
10,75	12,27	150-75	
12,27	13,15	75-50	Mitjà pes molecular
13,15	14,68	50-25	Petit pes molecular
14,68	20,21	25-2	Pèptids
20,21	30,00	≤2	

6.5. Nitrogen amínic

El nitrogen amínic va ser calculat amb el kit de *Biosystems* per a nitrogen orgànic (nitrogen amínic primari) que es basa en el principi de reacció entre el nitrogen i el o-ftaldialdehid en presència d'un reductor de medi bàsic. Es llegeix per espectrofotometria a 340nm.

6.6. Paràmetres enològics

Tant en el most com en el vi base es van utilitzar les mateixes tècniques per calcular el grau alcohòlic adquirit, l'acidesa total i volàtil i el pH. El grau alcohòlic es va calcular amb el microebulliòmetre (*μEBU GAB*). L'acidesa total es va calcular a través d'una valoració àcid-base amb NaOH 0,1 normal fins assolir un pH de 8,2 i la volàtil amb un volatímetre (OIV, 2015). En el cas del pH es va calcular amb un pH-metre (*CRISON pH-meter Basic 20+*).

Un altre dels paràmetres enològics que es van mesurar va ser la concentració de sucres residuals de la primera fermentació (glucosa i fructosa). Aquesta va ser calculada amb el kit enzimàtic *Boehringer mannheim/r-biopharm Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis* de l'empresa *r-biopharm (Roche)*.

El kit consisteix en una reacció enzimàtica. Els sucres residuals en la mostra (glucosa i fructosa) són fosforilats amb ATP al afegir l'enzim hexocinasa. Aquesta reacció genera ADP i glucosa/fructosa-6-fosfat. La fructosa-6-fosfat es converteix a través del glucosa isomerasa en glucosa-6-fosfat. Tota la glucosa-6-fosfat reacciona amb la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa generant D-gluconat-6-fosfat i $\text{NADPH}+\text{H}^+$. La producció de $\text{NADPH}+\text{H}^+$ és proporcional a la concentració de sucres residuals i es pot detectar espectrofotomètricament.

6.7. Escumabilitat

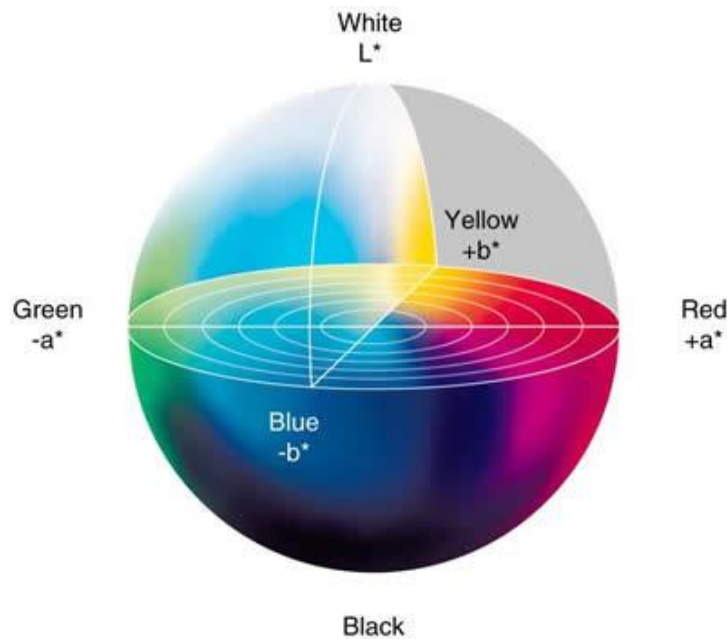
L'escumabilitat relativa es va mesurar amb la tècnica semiquantitativa de *Mosalux*. Amb aquesta es poden determinar el pic màxim d'escumabilitat (HM) i el moment en que l'escuma es manté estable en un nivell concret (HS) a partir de 100mL de vi base.

Aquesta tècnica utilitza una columna graduada connectada a un flux continu de CO_2 que s'ajusta a una pressió de 2 bars. El CO_2 es dirigeix cap a un "flow meter" que es regula a 7L/hora i d'aquí es dirigeix cap a la columna que té una membrana de cel·lulosa porosa per sobre del flux per evitar que el líquid baixi i afavoreix la penetració del gas en la mostra. D'aquesta manera obtenim l'alçada d'escuma aconseguida en cada mostra.

6.8. Color

El color de les mostres es va calcular a través de l'absorbància de cada mostra en 4 longituds d'ona diferents (450nm, 520nm, 570nm i 630nm). Les mostres desgasades es posaven en cubetes de 10mm.

Un cop obtinguts els valors de les 4 absorbàncies s'introdueixen les dades en el programa *MSCV-Coordenadas*. Aquest programa integra les absorbàncies per tal de convertir-les en coordenades d'una esfera de color (Esfera CIELAB – Espai de color *CIE 1976 L*a*b**). En l'esfera de color hi ha tres eixos, a i b ens aporten la saturació o croma i l'L la claredat. L'eix "a" indica els valors de verd (-) a roig (+) i l'eix "b" els valors de blau (-) a groc (+) (Fernando Zamora, 2004).

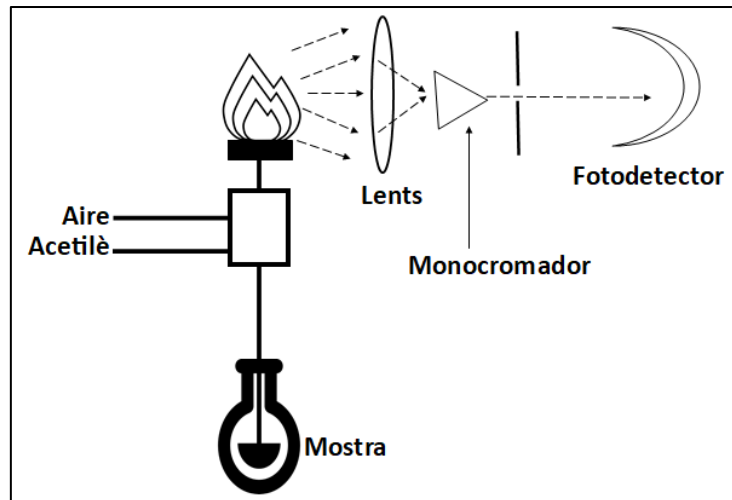


Il·lustració 6: Esfera CIELAB.

6.9. Potassi

El contingut de potassi del vi base i del most es va analitzar a través del mètode d'espectroscòpia d'emissió atòmica amb flama. L'aparell *UNICAM969 AA SPECTROMETER* genera una flama que combina aire comprimit i acetilè. La mostra es polvoritza en la flama que en provoca l'evaporació i el trencament dels enllaços químics per crear àtoms lliures.

L'energia tèrmica excita els electrons que emeten llum quan tornen al seu estat normal. Aquesta llum es dirigeix a través d'un seguit de lents cap a un prisma monocromador i impacta sobre una superfície opaca amb una obertura de mida regulable (en cas del potassi 0,2nm) (Department of chemical Pathology, 1961). La quantitat de l'element d'interès és directament proporcional a la llum captada pel detector.



Il·lustració 7: Esquema del funcionament del espectrofotòmetre de flama.

Aquest mètode pel potassi és lineal fins a les 3ppm. Per tal de fer la recta patró es van fer un seguit de dilucions (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3) i es va traçar una recta de regressió. Per tal d'evitar l'efecte que pogués tenir la matriu del vi i most sobre la mesura els patrons es van preparar amb un contingut de:

- Matriu del most: sucrosa (300mg/L), àcid tartàric (383mg/L) i clorur de potassi (191mg/L). La matriu per fer dilucions tenia el mateix contingut però sense el clorur de potassi.
- Matriu del vi base: alcohol pur (100mL/L), àcid tartàric (383mg/L) i clorur de potassi (191mg/L). La matriu per fer dilucions tenia el mateix contingut però sense el clorur de potassi.

Per les mostres de most es van realitzar dilucions de 1/500 per tal de poder interpolar els resultats dins de la recta de calibració. Per mesurar les mostres del grup FreeK⁺ es van fer una dilucions 1/100 ja que el contingut de potassi en aquest era més.

6.10. Tractament estadístic

Les dades mostrades a continuació són mitjanes aritmètiques de 3 mostres de cada grup amb la desviació estàndard mostral per cada paràmetre. Les dades experimentals obtingudes van ser analitzades amb el programa estadístic XLSTAT. Es van fer tests ANOVA de comparacions per parelles mitjançant el

test de Tukey (HSD) per comparar mostres intragrups i intergrups. L'interval de confiança utilitzat en els tests ha estat del 95% ($\alpha=0,05$).

En les figures s'ha assenyalat amb asteriscs (*) les diferències significatives intragrups (p valor $< 0,05$). Per altra banda s'utilitzen lletres per diferenciar les diferències significatives intergrups (p valor $< 0,05$).

7. Resultats i discussió

7.1. Acidesa del most

Tal com diu l'apartat 6.1. *Most*

, el most de partida era un most amb una acidesa de 5,7 g/L d'àcid tartàric i un pH de 3,2 i el most FreeK⁺ tenia una acidesa de 8,7 g/L d'àcid tartàric i un pH de 1,9. Un cop obtingut el most FreeK⁺ es van realitzar diferents cupatges entre el most inicial i el FreeK⁺ (*Taula 3*).

Taula 3: Composició de cada grup experimental així com l'acidesa i el pH. Les lletres indiquen els grups de most que tenen característiques estadísticament iguals.

Grup experimental	% Most	% FreeK ⁺	pH		Acidesa (g/L d'àcid tartàric)	
C	100	0	3,21	A	5,70	F
5	95	5	3,15	A	5,93	EF
10	90	10	3,13	A	5,93	EF
15	85	15	3,05	B	6,00	DEF
20	80	20	3,02	B	6,23	DE
25	75	25	2,98	B	6,38	CD
35	65	35	2,90	C	6,68	BC
45	55	45	2,77	D	6,98	B
FreeK⁺	0	100	1,90	E	8,70	A

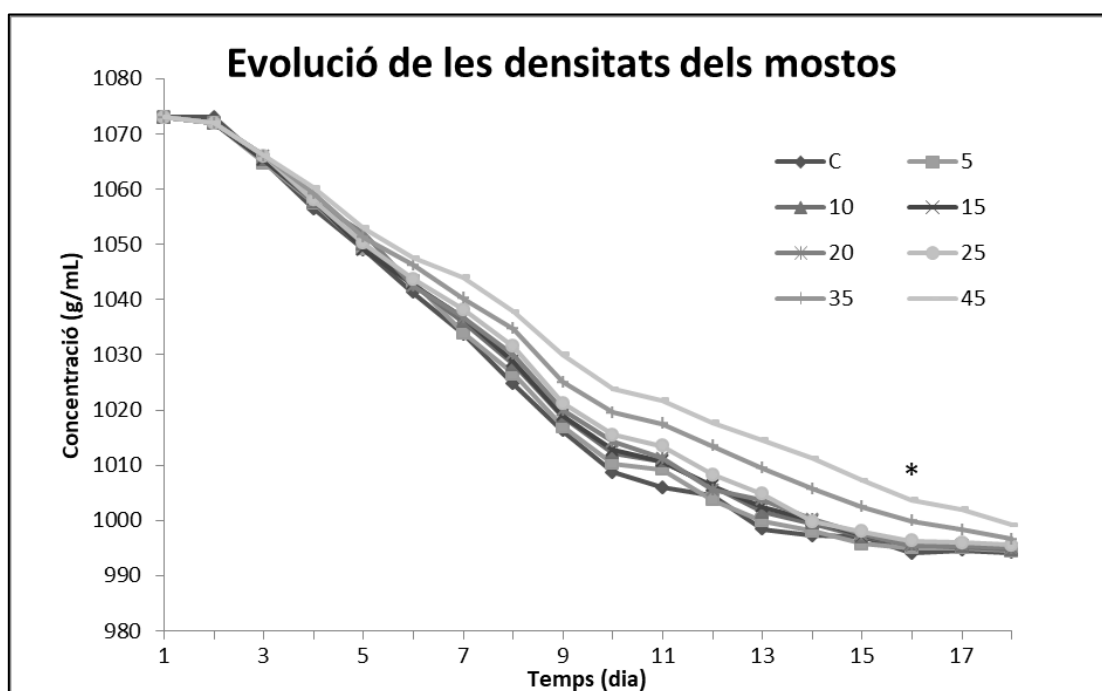
Els resultats mostren que l'addició de protons en el most ha provocat una disminució del pH, tot i això, aquesta ha estat menor de l'esperada degut a l'efecte tampó del vi.

L'efecte tampó del vi és la capacitat de resistir canvis de pH quan s'hi afegeix una base forta. Està determinat principalment per la concentració d'àcid tartàric i màlic tot i que també hi influeixen l'àcid cítric i succínic. Aquests àcids intrínsecs del vi perden protons que neutralitzen l'efecte de la base. Es per això que en fer el cupatge el pH baixa menys de l'esperat (Jeandet, 2000; Pláteník).

Per altra banda, tal com s'observa en la *Taula 3*, l'acidesa respecte el grup control en els diferents cupatges ha augmentat, tot i que només ho ha fet de forma significativa a partir del grup 20. Aquest fenomen és atribuïble al fet que en les mostres del grup 25 al FreeK⁺ hi ha poc potassi disponible per fer la reacció amb l'àcid tartàric formant bitartrat de potassi que precipita.

7.2. Evolució de la densitat

La densitat dels mostos al llarg de la primera fermentació es va mesurar diàriament (*Gràfic 1*). Com era d'esperar, la densitat disminueix a mesura que augmenta la fermentació ja que durant aquesta els llevats consumeixen els sucres presents en el most i els transformen en etanol. Al principi veiem una fase breu de latència que es pot relacionar amb el creixement poblacional i l'adaptació al medi dels microorganismes. Posteriorment s'observa una fase exponencial de degradació de sucres que representa l'evolució de la fermentació. A mesura que la presència d'etanol augmenta, la velocitat de fermentació disminueix fins a assolir la fase d'estacionament. Aquests resultats encaixen amb una corba estàndard de creixement poblacional de llevats.



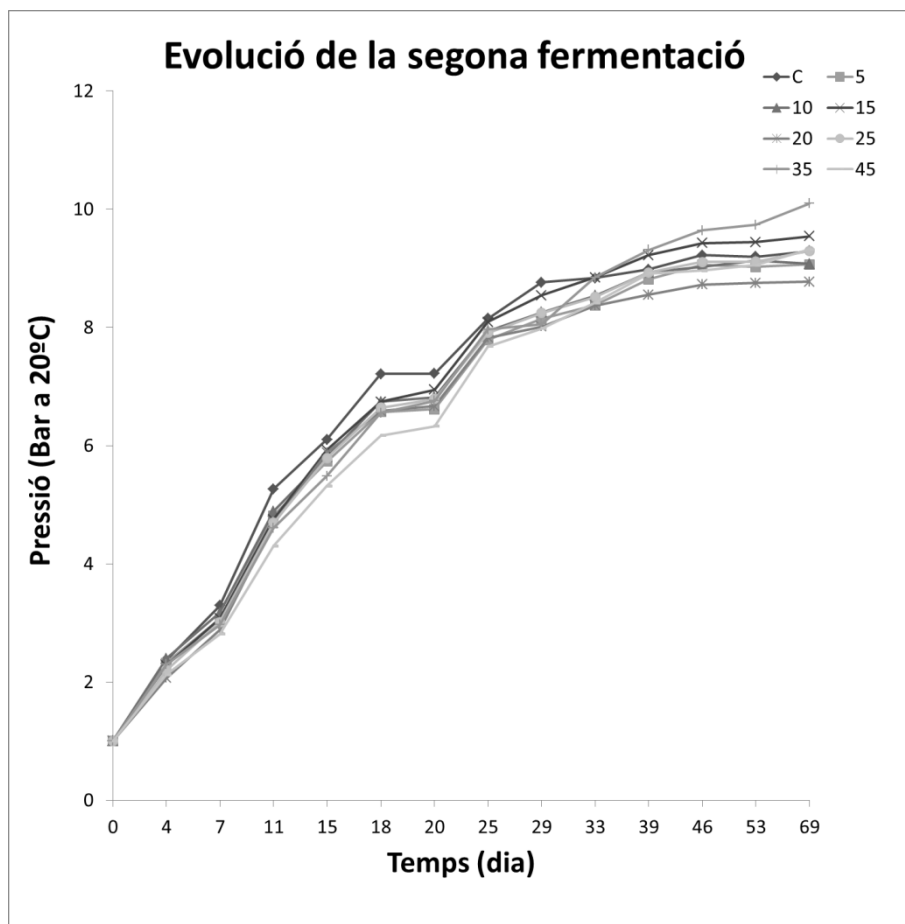
Gràfic 1: Evolució de les densitats dels diferents mostos durant la primera fermentació. La densitat dels mostos baixen perquè baixa el contingut en sucres. L'asterisc () indica el dia que acaba la fermentació alcohòlica del most control.*

Tots els grups experimentals, tot i tenir acideses i pHs diferents, presenten una tendència similar en l'evolució de la densitat. Tanmateix, el dia 16 (*) el control i els grups 5, 10, 15 i 20 acaben la fermentació, en aquest dia, hi ha diferències significatives de densitat entre els anteriors grups i els grups 35 i 45 i entre el grup 25 i el control. Aquest fet, demostra que els grups 25, 35 i 45 presenten un cert retard en la finalització de la fermentació alcohòlica. Aquest endarreriment

segurament és degut a l'estrès que suposa per al llevat fermentar en un medi amb un pH baix.

7.3. Evolució de la pressió

L'observació de la pressió de les ampolles ha permès seguir l'evolució de la segona fermentació. S'ha pogut veure que, independentment del percentatge, el most acidificat a través de la columna d'intercanvi catiónic afegit no ha modificat significativament l'evolució de la fermentació (*Gràfic 2*). D'aquesta manera, el llevat ha estat capaç de culminar en tots els casos la segona fermentació (arribant a una pressió superior als 7 bars) sense diferències importants en la velocitat de fermentació (Martínez-garcía et al., 2017).



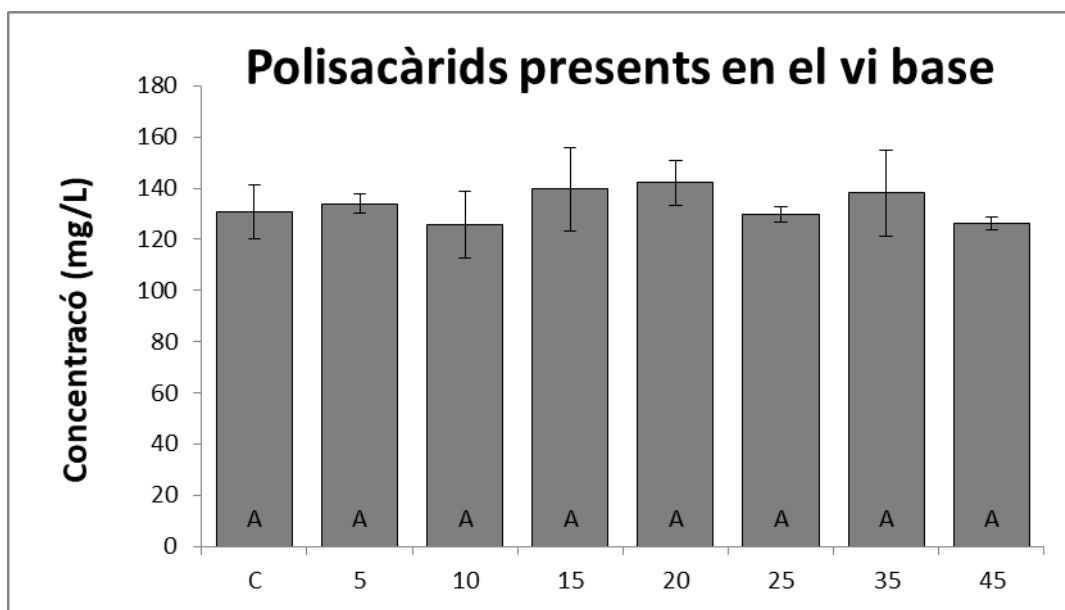
Gràfic 2: Evolució de les segones fermentacions del vi base a partir de la pressió interna de l'ampolla.

7.4. Presència de polisacàrids

L'anàlisi del contingut de polisacàrids i oligosacàrids del vi base, ha mostrat que no hi ha diferències significatives entre els grups (*Gràfic 3*). Com ja sabem, els polisacàrids del vi provenen del raïm i dels llevats (Barrio-Galán et al., 2016). Per tant, els resultats són coherents ja que tot el most utilitzat va ser processat enològicament seguint el mateix mètode (amb excepció del pas per columna) i també s'ha utilitzat en tots els casos el mateix llevat.

No veure un canvi en la concentració final de polisacàrids és interessant per al nostre estudi. Demostra que els mostos amb diferents pHs i acideses aconseguits via la columna d'intercanvi catiònic no presenten diferències significatives respecte el control en aquest aspecte.

Les petites diferències que es poden observar, però que no són significatives, poden ser degudes al propi procés de fermentació que es va realitzar en tancs diferents, la posterior estabilització en fred i la separació del vi i les lies que es va realitzar manualment.

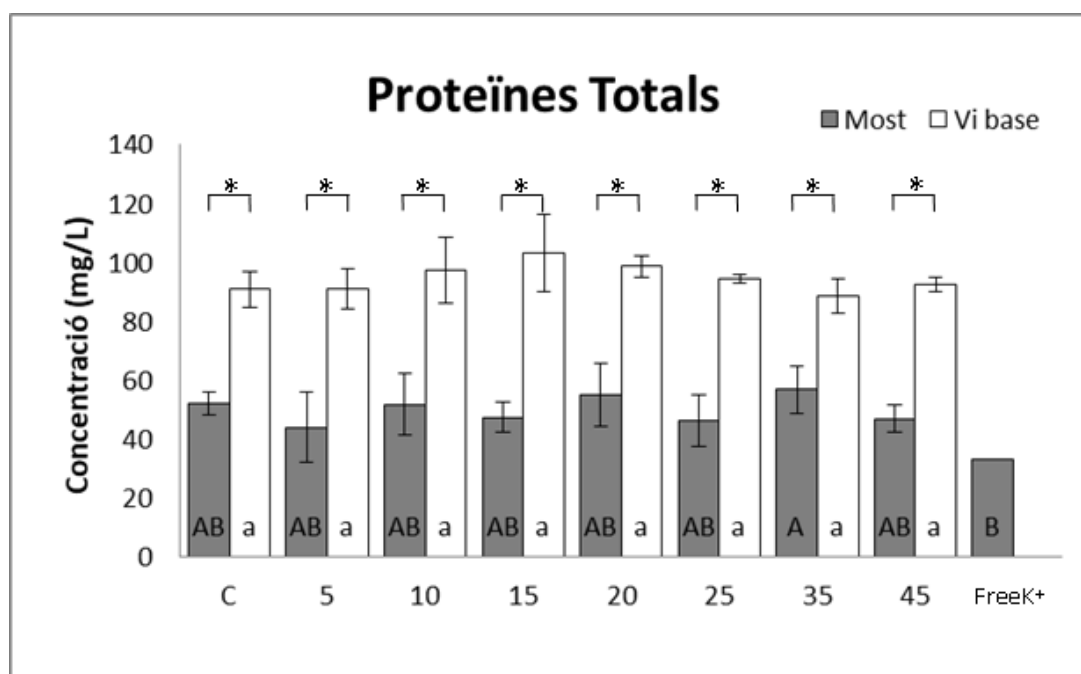


Gràfic 3: Diferents concentracions de polisacàrids presents en el vi base segons el grup experimental. Les lletres indiquen els grups de vi base que tenen característiques estadísticament iguals.

7.5. Presència de proteïnes

Pel que fa a la presència de proteïnes, els resultats mostren que no hi ha diferències significatives entre els grups de vi base però sí entre els grups de most (Gràfic 5). Per tant, no s'evidencia cap efecte sobre aquest paràmetre en relació amb el % de most FreeK⁺ afegit.

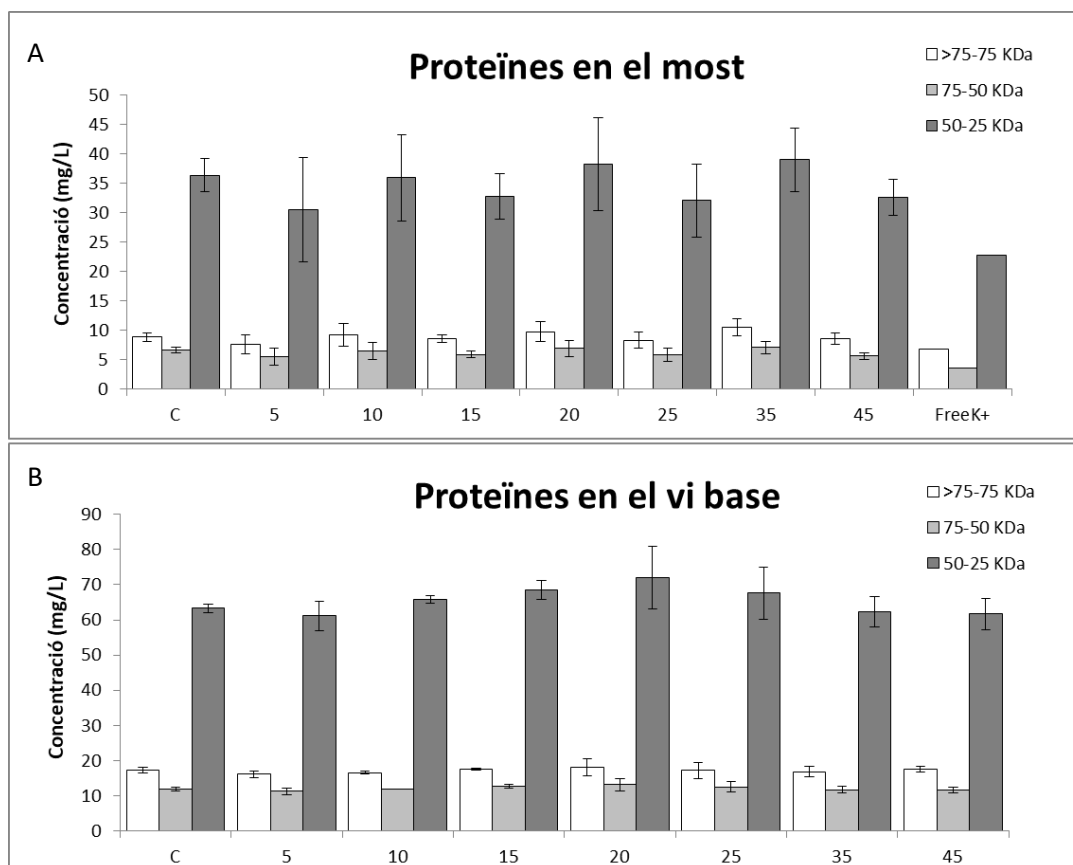
Per altra banda, observem un augment significatiu de la concentració de proteïnes des del most fins al vi base. El Gràfic 4 mostra que s'ha assolit un contingut proteic al voltant de 95 mg de proteïna/L de vi base en tots els grups. Aquest augment és degut a la síntesi i alliberació d'aquestes que fan els llevats durant la fermentació (Ribereau-Gayon et al., 2006b).



Gràfic 4: Evolució del contingut proteic del most al convertir-se en vi base després de la primera fermentació. Els asteriscs (*) indiquen diferències entre el most i el vi base del mateix grup. Les lletres indiquen els grups de most o vi base que tenen característiques estadísticament iguals.

Els resultats mostren que les diferències de contingut proteic entre els diferents mostos (des del control (C) fins al 45) no són significatives. Com s'ha postulat en la hipòtesi, es pot suposar que hi ha una retenció de petits pèptids per part de la columna d'intercanvi catiónic degut a la seva inespecificitat. Aquesta atrapa els aminoàcids presents en el most que tenen càrrega positiva.

Quan s'observen les proteïnes en funció de la seva mida, es veu que no hi ha diferències entre els grups de most i vi base. Aquests resultats poden mostrar que la síntesi de proteïnes per part dels llevats no es veu afectada o, per altra banda, que la columna d'intercanvi reté de forma inespecífica les proteïnes independentment de la seva mida (*Gràfic 5*).



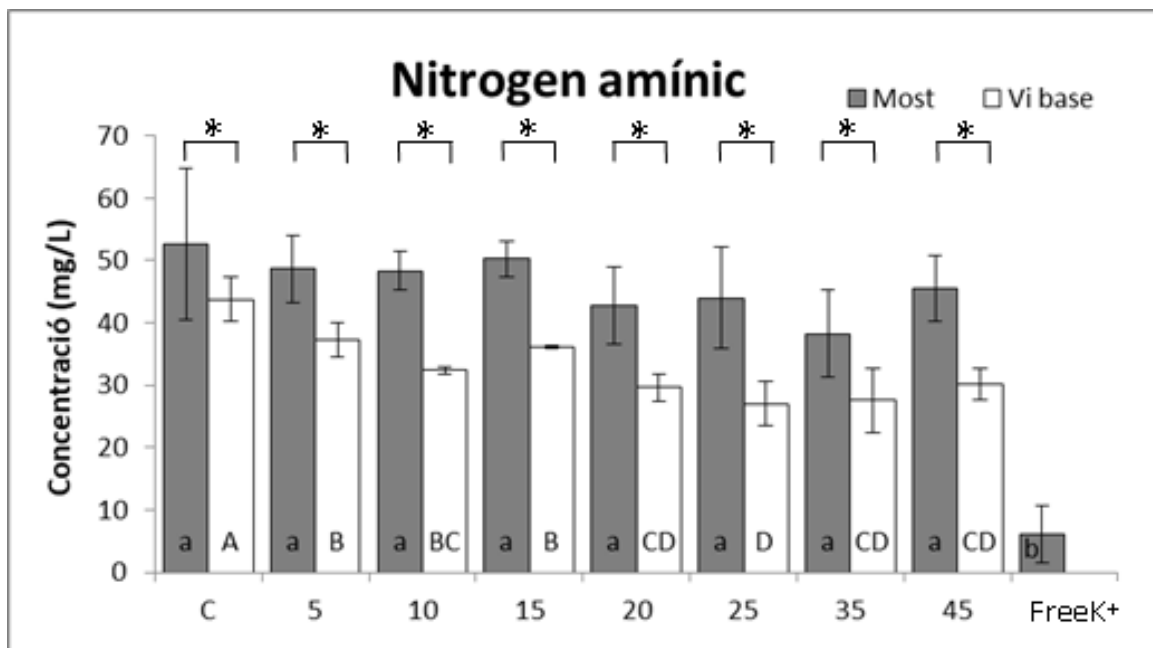
Gràfic 5: Contingut proteic dels diferents grups experimentals separat en tres fraccions de pes molecular. No s'aprecien diferències significatives intergrupals.

7.6. Nitrogen amínic

La prova del nitrogen amínic va detectar tot el nitrogen que formava part d'aminoàcids i proteïnes en la mostra. En el most només es van observar diferències entre el FreeK⁺ i la resta dels grups (*Gràfic 6*). La disminució del contingut de nitrogen orgànic en el most FreeK⁺ té relació amb la inespecificitat de la columna ja que al passar el most per la columna poden quedar retinguts altres compostos carregats positivament com els cations de les amines primàries (NH₂⁺).

Per altra banda, en el vi base s'observa que en els grups amb major percentatge de most FreeK⁺ hi ha menys concentració de nitrogen amínic. No obstant, en l'apartat anterior no es veu un augment en la concentració de proteïnes entre els diferents vins base. Això es degut a un major consum de nitrogen en situacions d'estrès per part del llevat, ja que aquest necessita sintetitzar més proteïnes de membrana que no té perquè secretar i per tant no detectaríem en l'anàlisi de proteïnes.

Finalment, la comparació entre el most i el vi base del mateix cupatge ens mostra que hi ha hagut un consum de nitrogen amínic destinat a la síntesi proteica durant la fermentació, que sí que concorda amb l'augment de proteïnes entre els mostos i els vins. Per acabar d'entendre aquests resultats és necessari avaluar el contingut de nitrogen inorgànic dels diferents cupatges.



Gràfic 6: Evolució de la presència de nitrogen orgànic en els grups experimentals abans (most) i després de fermentar (vi base). Els asteriscs (*) indiquen diferències entre el most i el vi base del mateix grup. Les lletres indiquen els grups de most o vi base que tenen característiques estadísticament iguals.

7.7. Paràmetres enològics del vi

Grau alcohòlic adquirit

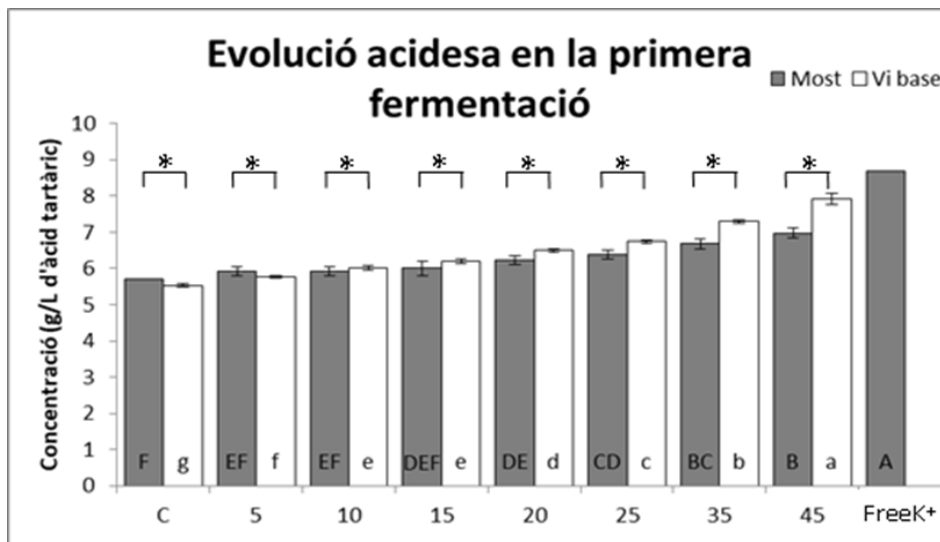
Els resultats mostren que els grups amb més percentatge de most FreeK⁺ han generat menys grau alcohòlic després de la primera fermentació (*Taula 4*). En concret, els grups 35 i 45 tenen significativament menys grau alcohòlic que la resta (a excepció del grup 25). Aquestes diferències es poden atribuir a que les condicions més desfavorables en que es trobava el llevat provoquen un endarreriment en la fermentació, tal i com mostra el *Gràfic 1*. D'aquesta manera, en el mateix punt de tall en que es van agafar totes les mostres no s'haurà assolit el mateix punt de consum de sucres i a conseqüència el grau alcohòlic serà menor.

Taula 4: Grau alcohòlic del vi base dels diferents grups experimentals i la categories estadístiques a les que pertanyen. Les lletres indiquen els grups de most que tenen característiques estadísticament iguals.

Mostra	Grau alcohòlic del vi base			
C	10,85	±	0,045	A
5	10,83	±	0,065	A
10	10,84	±	0,012	A
15	10,80	±	0,065	A
20	10,79	±	0,026	A
25	10,74	±	0,051	AB
35	10,66	±	0,021	B
45	10,66	±	0,021	B

Acidesa total i acidesa volàtil

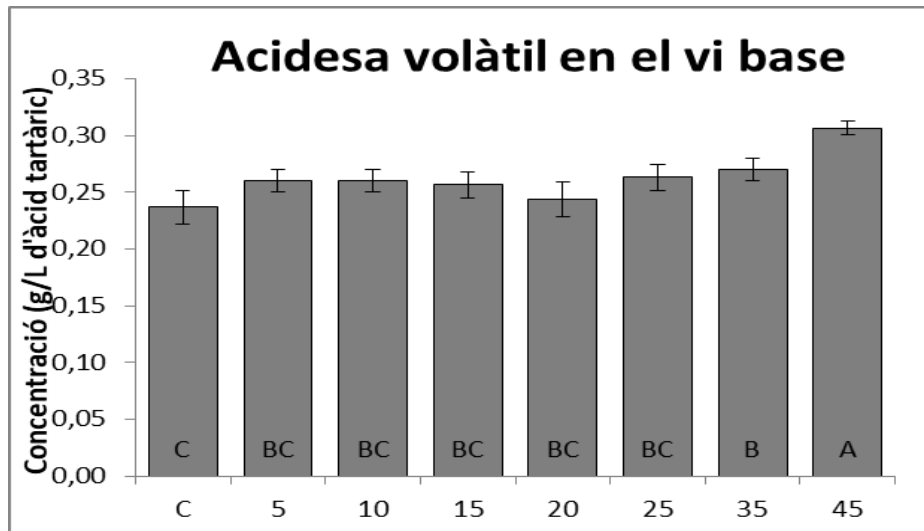
Pel que fa l'acidesa, es comporta de forma inversa al pH. El principal àcid del most i el vi base és l'àcid tartàric, que al precipitar en forma de sals de potassi fa disminuir l'acidesa. Aquest fenomen és més evident en els grups en que hi havia més potassi (K⁺). Durant la fermentació, els llevats han produït altres àcids com el succínic, el cítric o el làctic que han ajudat a augmentar l'acidesa. En els grups amb menys potassi, l'acidesa ha augmentat respecte el most ja que s'han generat nous àcids en la fermentació i no s'han format sals insolubles de potassi derivades de l'àcid tartàric (*Gràfic 7*). En els grups amb més potassi la producció d'àcids durant la fermentació no ha igualat la disminució d'acidesa produïda per la precipitació de l'àcid tartàric.



Gràfic 7: Gràfic en el que es mostra l'evolució de l'acidesa total de cada grup abans de la fermentació (most) i després (vi base). Els asteriscs (*) indiquen diferències entre el most i el vi base del mateix grup. Les lletres indiquen els grups de most o vi base que tenen característiques estadísticament iguals.

Durant la fermentació alcohòlica també es produeix la fermentació glicerolpirúvica que origina entre d'altres productes àcid acètic (Royo, 2015). L'àcid acètic es caracteritza per ser un àcid volàtil fàcil de detectar olfactivament. Aquest es produeix en major mesura si els llevats es troben en situació d'estrès. L'àcid acètic en concentracions elevades pot acabar provocant una disminució de la qualitat del vi base ja que es percep com un caràcter negatiu.

Estadísticament el grup 45 tenia més acidesa volàtil respecte la resta de grups (Gràfic 8). Aquest fet podria ser atribuïble a que el pH era més àcid i com a conseqüència el llevat d'aquest grup estava en una situació d'estrès més elevada que la resta. A més, si el llevat té dificultats per acabar la fermentació, pot facilitar que alguns bacteris acètics presents en el most puguin créixer i sintetitzar àcid acètic.

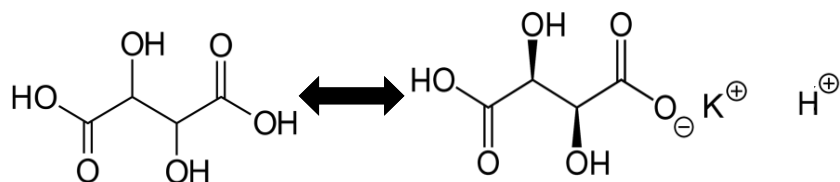


Gràfic 8: presència d'acidesa volàtil (àcid acètic) en el vi base per cada grup. Les lletres indiquen els grups de vi base que tenen característiques estadísticament iguals.

pH

Pel que fa el pH, s'han reduït les diferències entre el most menys àcid (C) i el més àcid (45), sense tenir en compte el FreeK^+ que no s'ha fet fermentar (Taula 5). Això és degut al propi procés biològic que ha realitzat el llevat durant la primera fermentació.

En els resultats es veu com la disminució de pH és cada cop més petita fins que la tendència es reverteix com en el cas del grup 45. El fet de que el pH hagi baixat es pot atribuir al contingut de FreeK^+ . D'aquesta manera, com més potassi hi ha en la mostra, més precipitació de sals. Per tant hi ha menys diferència de pH entre el most i el vi base ja que no s'alliberen tants protons H^+ (Il·lustració 8:) (Boulton, 1980).



Il·lustració 8: Equilibri entre àcid tartàric i bitartrat de potassi que es produeix en el vi.

Per altra banda l'augment de pH del grup 45 es pot explicar a partir de la baixa concentració de l'ió potassi en el most. A menys concentració de K^+ , és més difícil que es formi el bitartrat de potassi i per tant no s'alliberen els protons. Aquest fenomen juntament amb l'alcoholització del medi ha fet que el pH augmenti.

Finalment, el baix pH dels últims grups sumat a l'ambient hostil pel llevat fa que la fermentació sigui més difícil i s'obtingui un producte amb més sucres residuals i més acidesa volàtil.

Taula 5: Evolució del pH del most al transformar-se en vi base en tots els grups experimentals i les diferents categories estadístiques. El grup FreeK⁺, només amb una rèplica, no s'ha fet fermentar. Els asteriscs () indiquen diferències entre el most i el vi base del mateix grup. Les lletres indiquen els grups de most o vi base que tenen característiques estadísticament iguals.*

Mostra	pH most				pH vi base			
C*	3,21	±	0,01	A	3,13	±	0,01	A
5*	3,15	±	0,01	A	3,06	±	0,06	B
10*	3,13	±	0,01	A	3,06	±	0,00	B
15	3,05	±	0,03	B	3,02	±	0,00	BC
20*	3,02	±	0,03	B	2,97	±	0,01	CD
25*	2,98	±	0,02	B	2,94	±	0,01	D
35*	2,90	±	0,06	C	2,87	±	0,01	E
45*	2,77	±	0,01	D	2,81	±	0,02	F
FreeK⁺	1,90	±	0,00	E				

Sucres residuals

Els sucres residuals presents en el vi base són molt importants ja que es considera que la fermentació ha acabat quan són inferiors a 1g/L de vi base. A partir dels resultats es pot veure que els grups control fins a 25 han completat la fermentació (*Taula 6*). Per altra banda, els grups 35 i 45 tenen un contingut important de sucres residuals, aquest fenomen es pot relacionar amb el fet de que aquests dos grups tenien menys grau alcohòlic. Les condicions hostils de desenvolupament pels llevats que oferien aquests dos medis han dificultat que la fermentació pugui acabar dins dels períodes establerts. Com a conseqüència s'ha consumit menys sucre i per tant s'ha generat menys grau alcohòlic.

Taula 6: Concentració de sucres (monosacàrids) un cop la primera fermentació ha acabat en els diferents grups experimentals. Les lletres indiquen els grups de vi base que tenen característiques estadísticament iguals.

Mostra	Sucres residuals (g/L)		
C	0,881	±	0,403 C
5	0,782	±	0,289 C
10	0,974	±	0,091 BC
15	0,990	±	0,246 BC
20	0,902	±	0,135 C
25	1,135	±	0,418 BC
35	1,441	±	0,350 AB
45	1,783	±	0,321 A

7.8. Escumabilitat

L'escumabilitat relativa es divideix en dos paràmetres, el pic màxim (HM) i el volum d'escuma estable (HS). Els grups que han mostrat un major HM han estat els 10,15 i 20, seguits dels 25, 35 i 45. Pel que fa a HS, el control és el que ha mostrat una altura d'escuma més consistent. Els altres grups no tenen diferències significatives amb el control, però han mostrat una alçada menor, a excepció del grup 35 que sí que ha resultat amb una alçada significativament menor d'escuma estable (*Taula 7*).

Taula 7: Escumabilitat relativa de cada grup experimental en la que es mesuren l'alçada màxima que assolix la mostra (HM) i l'alçada en que es manté durant uns instants estable la mostra (HS). Les lletres indiquen els grups de vi base que tenen característiques estadísticament iguals.

Mostra	HM(màxima)			HS(estable)		
C	190,33	±	15,70 B	51,67	±	7,64 A
5	187,67	±	8,62 B	43,67	±	3,21 AB
10	236,67	±	10,41 A	45,33	±	0,58 AB
15	230,67	±	14,01 A	44,00	±	3,00 AB
20	235,00	±	10,00 A	46,33	±	2,08 AB
25	204,67	±	9,07 AB	44,00	±	2,65 AB
35	211,33	±	11,85 AB	38,33	±	2,31 B
45	206,00	±	11,53 AB	43,00	±	1,00 AB

La persistència de l'escuma en el vi base ve determinada per la seva composició de proteïnes i polisacàrids, majoritàriament. En els resultats de l'anàlisi de proteïnes (*Gràfic 4*), tot i no ser significatiu, el grup 35 era el que tenia menys proteïnes en el vi per tant tindria una relació amb el fet ja descrit que a menys proteïnes, menys escuma (HS) (Martínez-lapuenta et al., 2015).

7.9. Color

El mètode CIELAB ens permet obtenir la representació del color de la mostra en una esfera. En aquest cas només s'ha fet el test de color per al vi base, ja que s'entén que no és un paràmetre important en el most.

Amb els valors obtinguts es veu com totes les mostres són cromàticament similars pel que fa tonalitat a excepció del grup control i el 45 en que estadísticament hi ha un canvi en la tonalitat de groc. Pel que fa la claredat els grups 5,10 i 15 han resultat ser significativament més clars que el 35. Àdhuc no s'observa cap tendència clara (*Taula 8*).

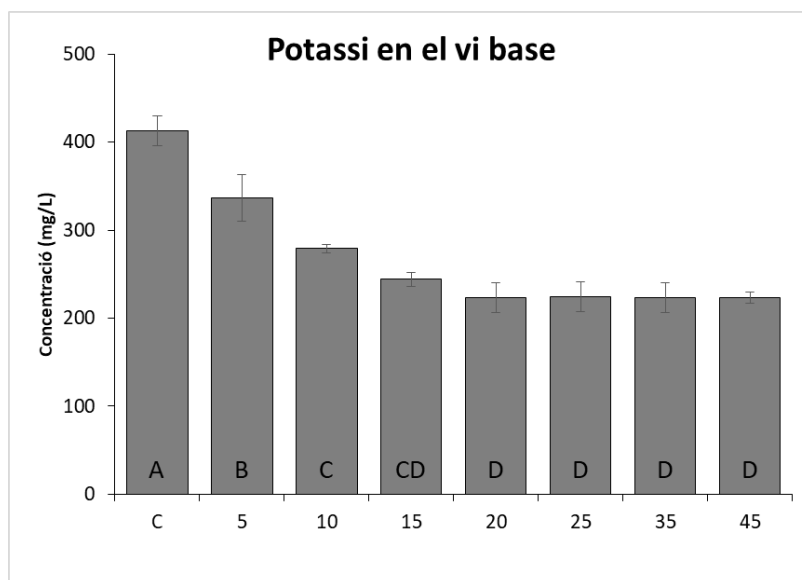
Taula 8: Tonalitat representada en els eixos CIELAB (L, a i b). Les lletres indiquen els grups de vi base que tenen característiques estadísticament iguals.

Mostra	L			a			b		
C	97,90	± 0,36	AB	-0,03	± 0,01	A	5,75	± 0,29	B
5	98,27	± 0,12	A	0,02	± 0,06	A	5,88	± 0,13	AB
10	98,27	± 0,06	A	-0,05	± 0,06	A	5,97	± 0,13	AB
15	98,10	± 0,20	A	-0,18	± 0,07	A	5,78	± 0,05	AB
20	97,77	± 0,25	AB	-0,17	± 0,12	A	6,01	± 0,18	AB
25	97,80	± 0,17	AB	-0,22	± 0,20	A	5,97	± 0,17	AB
35	97,30	± 0,36	B	-0,24	± 0,14	A	6,28	± 0,24	AB
45	97,55	± 0,35	AB	-0,14	± 0,06	A	6,50	± 0,56	A

7.10. Potassi

En el *Gràfic 9* s'observa que hi ha una disminució de la concentració de potassi degut a la precipitació de sals d'aquest durant la fermentació. La concentració de potassi disminueix de forma significativa des del grup control fins al grup 20. Això és degut a que com menys percentatge de most FreeK⁺ hi ha, més concentració de potassi hi ha en el vi base. Des del grup 20 fins al grup 45 no

s'observen diferències significatives això pot ser degut a que la concentració a la qual s'arriba és molt baixa i per tant és difícil que es formi el bitartrat de potassi. Es pot entendre que en tots els grups hi ha hagut precipitació de bitartrat de potassi, tanmateix, en els grups amb menys potassi s'ha assolit aquesta concentració baixa que fa que no es doni la formació de sals.



Gràfic 9: Concentració de contingut de l'ió potassi (K^+) en els grups. Les lletres indiquen els grups de vi base que tenen característiques estadísticament iguals.

8. Conclusions

Aquest treball volia mostrar que la columna d'intercanvi catiónic era un sistema útil per revertir els efectes del canvi climàtic sobre la producció de Cava. Els resultats ens han mostrat que la intervenció no ha produït retards importants ni en la primera ni en la segona fermentació. Les primeres fermentacions han estat molt homogènies i sense diferències respecte el control, de manera que l'addició del most FreeK⁺ no les ha afectat. Alhora, s'ha aconseguit baixar el pH i augmentar l'acidesa com es volia. Això és degut a que com més FreeK⁺ s'afegeix al most menys potassi hi ha i més disminueix el pH degut a la precipitació de les sals de bitartrat de potassi.

També es pot confirmar que la columna d'intercanvi catiónic no genera variacions en els paràmetres enològics que ens marquen la qualitat del

producte tals com l'escumabilitat, la concentració de proteïnes, la concentració de polisacàrids o el color.

No obstant, en els mostos amb pH menor hi ha més àcid acètic i sucres residuals, ambdós deguts a l'estrès que el medi provoca en el llevat. Com a conseqüència, s'obté un grau alcohòlic lleugerament menor en el vi base final. A més, la columna presenta una certa inespecificitat amb els compostos de nitrogen carregats positivament que necessita ser estudiat amb profunditat per acabar de determinar el seu possible impacte.

Amb els resultats obtinguts, podem concloure que l'ús de most passat per columna d'intercanvi catiònic és un mètode eficaç per disminuir el pH. A més a més la majoria de paràmetres enològics no es veuen afectats i per tant la qualitat del vi final seria la correcta.

Finalment, els primers estudis de la segona fermentació han mostrat que aquesta s'ha desenvolupat seguint la mateixa tendència en tots els grups i no s'ha observat cap endarreriment important ni aturada de la fermentació en cap grup. Per això mateix i a falta de conèixer els resultats al final del procés d'envelliment, no podem assegurar quin dels grups amb els que s'ha treballat és l'òptim per aprofundir en futures investigacions.

9. Perspectives de futur

Un cop hagin passat els nou mesos de segona fermentació en ampolla es faran les analítiques que s'han fet al vi base i most per tal de fer el seguiment de l'evolució dels paràmetres analitzats en el treball. De la mateixa manera es farà als quinze mesos i als trenta mesos per tal de poder avaluar el potencial d'envelliment d'aquests Caves.

De moment, sembla que els paràmetres enològics del producte serien correctes. Tanmateix, queda per comprovar si degut a la inespecificitat de la columna hi ha aromes que queden retingudes i que per tant podrien influir en la qualitat del producte. Seria interessant poder fer un anàlisi d'aromes per

cromatografia de gasos així com un tast dels productes per valorar-los organolèpticament.

Un punt negatiu que hem observat és l'augment de l'acidesa volàtil i la dificultat que han experimentat els llevats per consumir tots els sucres en els mostos amb més FreeK⁺. Seria interessant estudiar si aquests defectes són deguts a la baixa acidesa o a altres factors que caldria conèixer per poder solucionar-los.

10. Autoavaluació

Aquestes pràctiques m'han servit per aplicar molts dels conceptes assolits durant el transcurs del grau a més d'aconseguir una major experiència de treball al laboratori i autonomia alhora d'organitzar la feina a fer.

Treballar en un laboratori m'ha servit també per ampliar els meus coneixements en tècniques d'anàlisi que no havia conegut durant la carrera, com són l'HPLC i l'espectrofotometria de flama.

Alhora de redactar el treball, també he après com escriure de forma científica i llegir bibliografia.

Personalment crec que tota la feina feta durant aquests mesos es veu reflectida en aquest treball.

11. Agraïments

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies al Dr. Fernando Zamora i al Dr. Joan Miquel Canals per acollir-me al seu laboratori i permetre'm realitzar les pràctiques del treball.

M'agradaria també donar les gràcies al Dr. Francesc Borrull pel temps invertit en ensenyar-me com funciona l'equip d'espectrofotometria de flama.

Gràcies al Pere i al Pol per ajudar-me a fer tot el treball i per la paciència. També gràcies a tothom del laboratori i als tècnics. També m'agradaria donar les gràcies a la Laia i a la Carme per l'ajuda.

12. Bibliografia

- Agrovin (2011). Estabilización tartárica de vinos sistema. Available at: www.agrovin.com.
- Ardilouze, C. (2006). Reductive vinification of white and rosé wines: The question of must extraction. *INTERNET J. Vitic. Enol.*, 1–9.
- Barrio-Galán, R. del, Medel-Marabolí, M., and Peña-Niera, Á. (2016). Effect of different ageing techniques on the polysaccharide and phenolic composition and sensorial characteristics of Chardonnay white wines fermented with different selected *Saccharomyces Cerevisiae* yeast strains. *Eur. Food Res. Technol.* 242, 1069–1085. doi:10.1007/s00217-015-2612-x.
- Boulton, R. (1980). The general relationship between potassium, sodium and pH in grape juice and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 31, 2–6.
- Comunitat Europea (2009). Reglamento(CE) No 606/2009 de la Comisión de 10 de julio de 2009. *D. Of. la Unión Eur.*, 1–59.
- Department of chemical Pathology, P. M. S. (1961). Flame Photometry. London.
- DO Cava (2019). Pliego de condiciones Denominación de Origen Protegida "Cava."
- Fernando Zamora (2004). *ELABORACION Y CRIANZA DEL VINO TINTO: ASPECTOS CIENTIFICOS Y TECN ICOS*. Madrid: EDITOR ANTONIO MADRID VICENTE.
- Gil-Cortiella, M. (2014). Influencia de la madurez de las uvas y de ciertas prácticas vitivinícolas sobre el color, los compuestos fenólicos y los polisacáridos del vino tinto.
- IOC (2014). Ficha técnica IOC 18-2007. 1–2.
- Jehandet, P. (2000). Study of the Contribution of the Major Organic Acids of Wine to the Buffering Capacity of Wine in Model Solutions Article. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 351–356.
- Kontoudakis, N. (2010). Grape phenolic maturity; Determination methods and consequences on wine phenolic composition.
- Lisanti, M. T., Blaiotta, G., Nioi, C., and Moio, L. (2019). Alternative Methods to SO₂ for Microbiological Stabilization of Wine. *Compr. Rev. food Sci. food*

Saf. 18, 455–479. doi:10.1111/1541-4337.12422.

Madalena, B. D. S., Maria, N. D. P., and Paulo, S. (2014). The role of polysaccharides on the grape must ultrafiltration performance. *Ciência e Técnica Vitivinícola* 29, 16–27.

Martínez-garcía, R., García-martínez, T., Puig-pujol, A., Carlos, J., and Moreno, J. (2017). Changes in sparkling wine aroma during the second fermentation under CO₂ pressure in sealed bottle. *Food Chem.* 237, 1030–1040.

Martínez-lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., and Pérez-magariño, S. (2015). Role of major wine constituents in the foam properties of white and rosé sparkling wines. *Food Chem.* 174, 330–338.

Masson-Delmotte, V., Pörtner, H.-O., Skea, J., Zhai, P., Roberts, D., and Shukla, P. R. (2018). Global warming of 1.5°C An. Switzerland.

Mato, I., Sua, S., and Huidobro, F. (2007). Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Food Chem.* 102, 104–112. doi:10.1016/j.foodchem.2006.05.002.

Miller, M. (2015). *Monitoring Acids and pH in Winemaking-Accuvin*.

Mira De Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.* 43, 1844–1855. doi:10.1016/j.foodres.2010.05.001.

Monteiro, E., Valéria, C., Aquino, G., Gomes, A., Sá, B. De, Elias, G., et al. (2018). Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *J. Food Compos. Anal.* 66, 160–167.

OIV (2000). Cation -exchange resins (Oeno 43/2000). *Int. OENOLOGICAL CODEX* 43/2000, 1–8.

OIV (2015). Compendium of international methods of analysis- OIV Volatile acidity.

Pláteník, D. J. Buffers and buffer capacity.

Pons Mercadé, P. (2015). Els llevats del vi. Available at: <http://blog.cavamiquelpons.com/els-llevats-del-vi/>.

Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., and Lonvaud, A. (2006a). *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications*.

Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., and Dubourdieu, D. (2006b). *Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. Chichester.

Royo, E. G. (2015). Aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas para compensar los efectos negativos del cambio climático sobre vinos

espumosos (Cava) y vinos tintos.

Sipag Bisalta La Bentonite. Available at: <https://bentonite.it/bentonite-applications.php>.