



# Estudi de paràmetres que determinen la qualitat dels vins escumosos i la seva relació amb l'enfosquiment

Arnau Serra i Cayuela



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

Testi  
doctoral

Estudi de paràmetres que determinen la qualitat dels vins escumosos i la seva relació amb l'enfosquiment

Arnau  
Serra  
Cayuela  
2014

GRPeaftaric  
*p*-coumaric  
gallic tyrosol  
phenolics  
cis-coutaric  
fertaric  
caffeic  
catechin  
trans-coutaric  
time  
correlations  
markers

HPLC-DAD-FLD-MS

kinetics  
zero-order  
Arrhenius

temperature  
cava charmat  
storage  
over-evolved  
sparkling wines  
5-HMF  
wineries  
NMR A420  
browning<sub>asc</sub>  
Shelf life  
biological aging

prediction models



# Estudi de paràmetres que determinen la qualitat dels vins escumosos i la seva relació amb l'enfosquiment

Arnau Serra i Cayuela  
2014





UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT FARMÀCIA  
DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

**ESTUDI DE PARÀMETRES QUE  
DETERMINEN LA QUALITAT DELS  
VINS ESCUMOSOS I LA SEVA  
RELACIÓ AMB L'ENFOSQUIMENT**

Arnau Serra i Cayuela  
2014



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA  
DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORAT  
ALIMENTACIÓ I NUTRICIÓ

2009– 2014

**ESTUDI DE PARÀMETRES QUE  
DETERMINEN LA QUALITAT DELS  
VINS ESCUMOSOS I LA SEVA  
RELACIÓ AMB L'ENFOSQUIMENT**

Memòria presentada per l'Arnau Serra i Cayuela per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona, dirigida per:

Dra. Elvira López Tamames

Dra. Montserrat Riu Aumatell

Arnau Serra i Cayuela  
2014



Aquest treball ha estat finançat per:



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

- AGL2008-03392
- AGL2011-23872



La **Generalitat de Catalunya** mitjançant ACCIÓ i l'Ajut per Grups de Recerca Consolidats:

- EVALXARTA2010 (EX12)
- 2009 SGR 606



La **Universitat de Barcelona** mitjançant la beca pre-doctoral d'Ajut de Personal Investigador en Formació (APIF) pel període Setembre 2008 – Setembre 2012, així com la beca d'estància del mateix programa.



Les bodegues del **Grup Freixenet S.A** mitjançant l'aportació de mostres.





## **Agraïments**

Moltes sou les persones que m'heu ajudat, motivat i fet el camí més fàcil durant tot aquest temps. Primer de tot voldria donar les gràcies a l'Elvira per haver-me donat l'oportunitat de pertànyer al grup. Han estat diversos anys de discussions científiques, en les quals quasi bé mai estàvem d'acord, i que m'han fet créixer com a investigador. Sempre recordaré la teva facilitat en canviar de punts de vista, els quals sovint acabaven amb els temibles “vamos a darle la vuelta”. A la Montse per haver co-dirigit la tesi. A Susana, pues aunque no parezcas como directora de tesis, has hecho méritos más que suficientes por aparecer, aportando ideas y discusión, así como poniendo orden y haciendo que los trabajos avanzaran. Voldria també donar les gràcies al Massimo, ja que sense els seus coneixements els resultats d'aquesta tesi no haguessin estat, ni de bon tros, els mateixos.

Arriba el moment dels companys del grup. En primer lloc, com no podria ser d'una altra manera, tinc en ment en Gallardo; Amb ell va començar tot, en aquell viatge per Carboneras i rodalies, recollint i analitzant aigües. Sempre va bé tenir al costat una persona activa, boig per la ciència i per idiomes no habituals per aquests indrets. A Rebeca, esa madre trabajadora que en su tiempo libre hace la tesis, gracias por dar un toque de sensatez y hacer ver las cosas más claras. A la Paula, una tivenysana que sempre té un somriure per tothom i que reparteix alegria allà on va. A M<sup>a</sup> Ángeles por seguir hablándome aun incluso después de ser el blanco de muchas de mis bromas. Creo que a mi “no me calaste mal”. A la Stefania, una gran científica que estic segur que el seu esforç es veurà compensat en

breu. No em puc deixar d'esmentar a altres amics que han pertanyut al grup: la Pinar, Nara, Ana María, Andrea i l'Oscar.

D'altra gent del mateix laboratori o del departament també m'enduc grans records. Començant pel Leandro, un gran amic de la carrera que vam coincidir en el laboratori. La Maria Rotchés, la *pueblerina* balsarenyenca amb qui vaig iniciar aquest camí, compartint gestions per demanar beques, i segurament va ser la primera a qui li vaig ensenyar l'ús adequat de les tetines. María Boto, una leonesa muy simpatica, con quien entre cerveza y cerveza hemos intentado encontrar la manera de solventar nuestro futuro. La Rosa, una graciència que un dia va aparèixer pel laboratori, amb un positivisme inigualable i que sempre està proposant fer noves activitats. Durant aquest temps hem fet molts viatges i espero fer-ne molts més junts. En un d'ells, vam anar a Calabria on viu la Franesca, una italiana “practicamente” impossible d'oblidar pel seu caràcter extravertit i la seva hiperactivitat. El Rafa, o com dirien els Celtas cortos: un murciano muy entrañable, per les seves discussions de futbol, política, ciència o qualsevol tema. La Mercedes una pamplonica amb un gran sentit de l'humor i molt amigable. A Ana, una gran persona que siempre que entrabas al laboratorio venías a hablar conmigo, sobretudo para comentar el *tiki-taka* y los títulos ganados por el mejor Barça de todos los tiempos.

Tindria paraules per molta més gent, però l'espai és limitat així que amb el vostre permís, i amb l'esperança de no deixar-me a ningú, us nombraré a continuació per agrair-vos que m'hagueu aguantat tots aquests anys: Montse, Mar, Sara Tulipani, Mireia, Giuseppe, Raul, Palmira, “La” Miriam, Naiara, Anna Vallverdú, Anna Tresserra, Paola, Alex, Sonia, Sara, Jonathan, Núria, Alba, Ricard, Carol,

Núria, Marina Diana, Joan, Mari Luz, y la última pero no para ello la menos valorada: Natalia.

De l'estada a Bordeaux m'emporto molts bons records, tant dels excel·lents vins i els meravellosos *Chateaux*, la gastronomia, com de la gent que he conegut. Tout d'abord je tiens à remercier à Teissedre pour me permettre de participer à son groupe scientifique. À Michael pour sa volonté à m'aider avec tout ce qui concerne le laboratoire. Estic segur però, que l'estada no hauria estat tant plaent si no hagués tingut la gran sort de conèixer a la Nerea. Gracias por tu hospitalidad y forma de ser, sin duda alguna es el mejor recuerdo que me llevo de esa magnífica ciudad. Eskerrik asko denagatik! D'allà també em quedarà sempre un bon sabor de boca per haver compartit bons moments amb la Dilan, María José, Reyes, Ana, Nacho, Almudena, Isa, Kleo, Natka, Davide, Julien, Caroline i la Marion. Merci becaup a tous!!

Així mateix, també vull donar les gràcies a l'Ana Isabel per haver-me ajudat amb els cromatògrafs. A la Margarida Castell per haver fet una revisió exhaustiva del present treball, la qual ha permès que millorés en escriure. A la Malu per haver-se preocupat en realitzar totes les gestions necessàries per presentar-ho i a la Lúdia per haver-me ajudat amb el disseny de la portada.

Hi ha un munt d'amics que no han intervingut directament en el treball però que segur que hi ha una part vostre reflectida. Aquest és el cas del Vila ja sigui per la seva forma relaxada d'entendre la vida o per les festes que hem viscut, juntament amb la *família de L'H*. En Javi, recent pare, pel seu humor i per estar present en els moments difícils. El Pepe pel seu companyerisme i perquè junts hem viscut

moltes victòries. A Natalia, esa getafense tan agradable y risueña con quien compartí grandes momentos. I com no, a tota la *família* de *tusamigossomisamigos*, aquest grup tant heterogeni però que al mateix temps ha permès viure experiències inoblidables.

També voldria agrair a totes les persones que col·laboren en la creació i difusió d'eines lliures que faciliten l'accés a tothom a la ciència i que fan que cada dia aquesta sigui més lliure. En aquest sentit, sempre que ha estat possible, s'han emprat programes de codi lliure com és el cas del Linux (sistema operatiu), Zotero (gestor bibliogràfic), Libreoffice (paquet ofimàtic), R (entorn estadístic), Gimp (edició d'imatges), inkscape (gràfics vectorials) i la Viquipèdia entre moltes altres.

Finalment voldria donar les gràcies als meus pares, i la resta de la família, per haver-me ajudat durant totes les etapes de la meva vida i en especial durant la tesi. Ja sigui moralment, econòmicament o simplement per aquells *tuppers de la Conxi* que eren l'enveja de molts.

Moltes gràcies a tots!!!

**als meus pares.**

“Essentially, all models are wrong, but some are useful.”

*G.E Pelham Box (Octubre 1919 – Març 2013)*



# ÍNDIX

<b>I. Interès i objectius</b>	1
<b>II. Antecedents bibliogràfics</b>	11
2.1 El vi escumós.....	13
2.1.1 Obtenció vi base.....	13
2.1.2 Segona fermentació.....	17
2.1.2.1 Mètode tradicional .....	17
2.1.2.1.1 El Cava.....	22
2.1.2.2 Mètode Charmat.....	24
2.2 Paràmetres de qualitat dels vins escumosos.....	28
2.2.1 Enfosquiment.....	29
2.2.1.1 Deshidratació de sucres.....	32
2.2.1.2 Reaccions de Maillard.....	33
2.2.1.3 Oxidació de fenols.....	34
2.2.1.4 Reaccions que impliquen aldehids.....	41
2.2.3 Estudis d'evolució i cinètics.....	43
<b>III. Disseny experimental i metodologia</b>	49
3.1 Elucidació d'un compost amb potencial com a marcador .....	54
3.2 Paper de les mares i aptitud dels fenols i del 5-HMF com a marcadors de qualitat.....	56
3.3 Cinètica de l'enfosquiment de vins escumosos conservats a diferents condicions d'emmagatzematge: Models per la predicció de la vida útil.....	58
3.4 Tasts.....	60
3.5 Metodologia analítica.....	62
3.5.1 Paràmetres enològics.....	62



3.5.1.1 UV 420nm (A420).....	63
3.5.1.2 Folin-Ciocalteu.....	63
3.5.1.3 Sulfits .....	64
3.5.2 Tècniques analítiques avançades.....	65
3.5.2.1 HPLC/UHPLC.....	66
3.5.2.2 NMR.....	67
<b>IV. Resultats</b>	<b>69</b>
4.1 Identificació del 5-hidroximetil-2-furfural (5-HMF) en el Cava mitjançant LC-DAD-MS/MS i RMN.....	71
4.2 Enfosquiment dels Cava durant la rima i en període comercial: ús del 5-HMF com a marcador de qualitat.....	81
4.3 Avaluació dels fenols i el 5-HMF com a paràmetres de qualitat relacionats amb l'enfosquiment dels vins escumosos comercials.....	90
4.4 Avaluació sensorial.....	101
<b>V. Discussió</b>	<b>103</b>
<b>VI. Conclusions</b>	<b>109</b>
<b>VII. Bibliografia</b>	<b>115</b>
<b>Annex</b>	<b>127</b>





## Abreviatures

<b>DAD</b> Detector de diodes en línia <i>Diode array detector</i>	<b>MS</b> Detector d'espectrometria de masses <i>Mass spectrometry detector</i>
<b>ESI</b> Ionització per electrospai <i>Electrospray ionization</i>	<b>MS/MS</b> Espectrometria de masses en tàndem <i>Tandem mass spectrometry</i>
<b>FLD</b> Detector de fluorimetria <i>Fluorometry detector</i>	<b>NMR</b> Ressonància magnètica nuclear <i>Nuclear magnetic resonance</i>
<b>GAE</b> Equivalents d'àcid gàl·lic <i>Gallic acid equivalent</i>	<b>PDA</b> Detector de fotodiodes (=DAD) <i>Photodiode array detector</i>
<b>HPLC</b> Cromatografia de líquids d'alta resolució <i>High performance liquid chromatography</i>	<b>UHPLC</b> Cromatografia de líquids d'ultra resolució <i>Ultra High performance liquid chromatography</i>
<b>LOD</b> Límit de detecció <i>Limit of detection</i>	<b>UV-Vis</b> Espectroscòpia ultraviolat-visible <i>Ultraviolet-visible spectroscopy</i>
<b>LOQ</b> Límit de quantificació <i>Limit of quantification</i>	<b>PCA</b> Anàlisi de components principals <i>Principal component analysis</i>
<b>m/z</b> Relació massa-càrrega d'un ió <i>Mass-to-charge ratio</i>	<b>GRP</b> "Producte de reacció del raïm" <i>Grape reaction product</i>



# *Interès i objectius*



## **I. Interès i objectius**

Els vins escumosos són vins que han sofert una segona fermentació, la qual proporciona unes característiques diferenciades de la resta del vins. Entre els més famosos trobem el Champagne, Cava, Chardonnay, Sekt, Prosecco, Asti i Spumante. Segons estimació del Consell Regulador de l'any 2012, només de Cava - vi escumós de qualitat produït en una regió determinada (v.e.q.p.r.d) – es van vendre més de 243 milions d'ampolles. El 66% de les vendes van ser destinades al mercat exterior i entre els països més importadors trobem Alemanya, Regne Unit, Bèlgica, Estats Units, Japó i França. En aquest mateix any, a Catalunya hi havia registrats 253 cellers elaboradors de Cava i 163 empreses elaboradores del vi base.

Les dades de producció i el nombre d'empreses implicades demostren la importància econòmica que generen els vins escumosos. Per tal de mantenir aquest índex de vendes, és important que aquests vins presentin sempre la màxima qualitat possible.

La indústria elaboradora de vins escumosos considera important tenir paràmetres objectius que permetin estandarditzar la qualitat dels seus productes. En el cas del Cava, tot i disposar d'una legislació pròpia (B.O.E. 189278:37587-93, 1991) i d'un Consell Regulador que determina els paràmetres de qualitat que s'han de superar per poder assolir la D.O. Cava, cadascuna de les bodegues ha de disposar d'uns paràmetres de control propis que aporten informació de les propietats organolèptiques concretes del seus productes.



La qualitat d'un aliment es defineix per la capacitat de satisfer les necessitats explícites o implícites del consumidor (ISO 8402:1994). Dins aquest conjunt de necessitats podem englobar les característiques sensorials, les propietats nutricionals, la composició química així com l'absència de possibles defectes. Tanmateix, el consumidor, en el moment d'efectuar l'elecció del producte, està condicionat principalment per les qualitats sensorials o organolèptiques d'aquest, entre les quals s'inclouen l'aparença, la textura, l'aroma i el gust.

L'aspecte visual és la primera característica que percebem i que pot delectar o generar rebuig, podent influir en la percepció de l'aroma i/o el gust. El color dels vins escumosos acostuma a atribuir-se als compostos fenòlics procedents del raïm. Aquests compostos s'oxiden amb facilitat alterant el color del producte. L'estabilitat del color d'aquests vins en el procés d'elaboració, així com durant la distribució i l'emmagatzematge, és un aspecte de gran interès per les bodegues elaboradores. L'origen de l'alteració del color varia en funció de l'etapa del procés d'elaboració. En els raïms i el most la principal via d'enfosquiment és d'origen enzimàtic, mentre que un cop s'ha obtingut el vi els fenòmens d'enfosquiment solen produir-se degut a reaccions químiques.

Durant la segona fermentació —criança en contacte amb els llevats— es produeixen una sèrie de canvis fisicoquímics i/o biològics a causa de l'activitat dels llevats i dels compostos presents

en el medi. Aquestes modificacions generen canvis organolèptics que són apreciats pels consumidors i justifiquen els llargs períodes que se sotmeten els Caves d'alta gama (Gran Reserva). Durant aquest procés les mares (llevats no viables) poden alliberar o adsorbir compostos que poden alterar la qualitat visual dels vins. Per tant, l'estudi del paper de les mares és important perquè afecta a la qualitat final del producte.

La rima, s'atura quan se separen les mares i s'addiciona el licor d'expedició, donant pas a la vida comercial dels vins escumosos. Empíricament, els enòlegs saben que el temps de vida comercial és un factor contrari a la qualitat organolèptica del producte. Durant la distribució i/o emmagatzematge, les propietats organolèptiques es poden veure alterades segons les condicions de conservació. La temperatura és un factor que pot ser controlat, o conegut, amb facilitat i que pot afectar a les propietats organolèptiques dels vins escumosos. Per tant, l'estudi cinètic dels compostos relacionats amb l'enfosquiment pot ajudar a les bodegues a conèixer quina és la condició òptima per l'emmagatzematge i així poder predir el temps de vida útil del producte abans de que perdi les seves qualitats organolèptiques i sigui rebutjat pel consumidor. En aquest sentit, en estudis anteriors del grup s'ha observat que hi ha un compost, fins al moment desconegut, que augmenta amb el temps i que podria servir com a marcador de qualitat.

Les **hipòtesi** de partida és que les mares dels vins escumosos tenen un efecte protector en front l'enfosquiment, i que es poden crear models matemàtics per predir el temps de màxima qualitat dels vins escumosos a partir dels compostos relacionats amb l'enfosquiment.

Així doncs, l'**objectiu** que formula aquesta tesi doctoral és:

Avaluar el paper de les mares i trobar marcadors químics relacionats amb l'enfosquiment per crear models matemàtics que permetin predir el període òptim de consum dels vins escumosos.

En aquest sentit, els objectius concrets d'aquest treball són:

- Elucidar l'estructura d'un compost que augmenta amb el temps d'envelliment i que pot ser un potencial marcador de qualitat.
- Avaluar el paper de les mares en els compostos relacionats amb l'enfosquiment.
- Trobar marcadors de qualitat relacionats amb l'enfosquiment.
- Establir models matemàtics que permetin predir la vida útil dels vins escumosos així com les millors condicions d'emmagatzematge.

## **I. Interest and objectives**

Sparkling wines, are wines that have undergone a second fermentation, which provides differentiated characteristics from the rest of the wines. Among the most famous we found the Champagne, Cava, Charmat, Sekt, Prosecco, Asti and Spumante. According to estimates of the Regulatinf Council (Consell Regulador) in 2012, just Cava - a quality sparkling wine produced in a specified region (vecprd) - sold over 243 million bottles. The 66% of the sales were destined to foreign markets and between the most importers countries there are Germany, UK, Belgium, USA, Japan and France. In the same year, in Catalonia there were 253 wineries registered and 163 sparkling base wine producer companies.

Production data and the number of companies involved demonstrate the economic importance that sparkling wines generate. To maintain this rate of sales, it is important that these wines always present the highest quality.

The sparkling wine elaboration industry considers important to have objective parameters that allow standardize the quality of its products. In the case of Cava, despite having its own legislation (BOE 189278:37587-93, 1991) and a Regulating Council which determines the quality parameters that must be overcome to achieve

the DO Cava, each winery must have its own control parameters that provide information about specific organoleptic properties of the products.

The quality of food is defined by the ability to meet the explicit or implicit needs of consumers (ISO 8402:1994). Within this set of requirements it is included sensory characteristics, nutritional properties, chemical composition as well as the absence of potential defects. However, the consumer, when choosing the product, is influenced by the sensory or organoleptic qualities of it, including appearance, texture, aroma and taste.

The visual appearance is the first feature perceived and can delight or generate rejection, influencing the perception of smell and/or taste. The colour of sparkling wines is usually attributed to phenolic compounds from grapes. These compounds are easily oxidized, altering the colour of the product. The colour's stability of these wines in the process as well as during distribution and storage, is of huge interest for wineries. The origin of the colour's alteration varies depending on the stage of the elaboration process. In the case of the grapes and the must the main route of browning is enzymatic, whereas once the wine has been obtained the browning phenomena usually comes from chemical reactions.

During the second fermentation —ageing in contact with yeast— there are produced a number of physicochemical and/or biological

changes due to the yeast's activity and the compounds present in the environment. These modifications generate sensory changes that are appreciated by the consumers, which justify the long periods that highest quality Cava (Gran Reserva) undergo. During that process the lees can release or adsorb compounds that can alter visual quality of wines. Therefore, the study of the role of lees is important because it affects the quality of the product.

The biological ageing is stopped when the lees are separated and the dosage liquor is added, giving way to the commercial life of sparkling wines. Empirically, winemakers know that the length of shelf life is a negative factor for the organoleptic quality of the product. During the distribution and/or storage, the organoleptic properties can be altered depending on the storage conditions. Temperature is a factor that can be controlled or known, and it can easily affect the organoleptic properties of sparkling wines. Therefore, the kinetic study of compounds related to the browning and the search for a marker can help wineries to know the optimum condition of storage, in order to predict the shelf life time of product before it loses its organoleptic qualities and thus rejected by the consumer. In this regard, in previous studies of the investigation group, there have been observed that there is an unknown compound which increases with time.

The **hypothesis** is that the lees of sparkling wines have a protective effect against browning, and that mathematical models to predict the time of highest quality sparkling wines can be created from compounds related to the browning.

Thus, the **aim** of this thesis is:

Evaluate the role of lees with the browning process and find chemical markers related to browning to create mathematical models for predicting the optimum period of consumption of sparkling wines.

In this regard, the objectives of this work are:

- Elucidate the structure of a compound that increases with time, which may be a potential marker of quality.
- Evaluate the role of the lees over compounds related with the browning.
- Find quality markers related with the browning.
- Establish mathematical models to predict the shelf life of sparkling wines as well as the best storage conditions.

# *Antecedents bibliogràfics*





## II. Antecedents bibliogràfics

### 2.1 El vi escumós

Els vins escumosos són vins que han sofert una segona fermentació i contenen diòxid de carboni a una pressió entre 3 i 5 atmosferes a una temperatura de 20°C. La presència del gas carbònic fa que es formi escuma en el moment de servir seguida d'un despreniment de bombolles persistents (Liger-Belair, 2005).

La producció total de vins escumosos arreu del món durant l'any 2011 va ser de 2.079 milions d'ampolles (Buxaderas and López-Tamames, 2012).

El procés d'elaboració dels vins escumosos consta de dues etapes clarament diferenciades: l'elaboració del vi base, i la segona fermentació i envelliment.

#### 2.1.1 Obtenció vi base

A la Figura II-1 es mostra l'esquema del procés per l'obtenció del vi base. Allà estan enumerats els principals passos i són descrits a continuació:

**Verema.** Consisteix en recol·lectar el raïm un cop aquest ha arribat a la seva maduresa tecnològica. A Catalunya aquest procés s'acostuma a realitzar en els mesos d'Agost o Setembre, tenint

present els paràmetres següents:

- Grau alcohòlic volumètric natural mínim: de 8,5 – 9% vol.
- Acidesa total: de 8 a 12 g/L en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Percentatge d'àcid màlic: del 50 al 65 % de l'acidesa total
- Relació de sucres/acidesa: al voltant de 15/20 unitats
- Contingut en sucres: 20,5 a 22,5 °Brix
- Manteniment de condicions sanitàries adequades de la verema.

El raïm tant pot ser de les varietats blanques (blanc de blancs) o negres (blanc de negres). Per les primeres trobem les varietats de Xarel·lo, Macabeu, Parellada, Chardonnay i Malvasia, mentre que entre les varietats negres existeix la Garnatxa negra, Monestrell, Pinot Noir i el Trepat. Aquesta última varietat és exclusiva per elaborar Cava rosats, el qual es produeix pel mètode de sangrat de vi negre. S'ha d'indicar però, que les varietats més emprades per l'elaboració del Cava són Xarel·lo, Macabeu i Parellada.

La collita pot ser efectuada de forma manual o mecanitzada. Tot i que aquest no seria un factor influent en la qualitat del vi (Noble et al., 1975; Wagener, 1980), es recomana que el raïm sigui dipositat en caixes perforades amb una capacitat limitada per evitar pressions, així com premsar-lo el més aviat possible. Així es minimitzen els processos d'enfosquiment i fermentació incontrolada del most.

**Obtenció most.** Un cop el raïm és transportat a la bodega, es premsa de forma fraccionada (premsat *champenoise*). Primer s'apliquen pressions suaus on s'obté el most flor o *cuvée*, i després

s'obtenen les fraccions primeres o *taille*.

**Sulfitaçió.** A la sortida de les premses, i per evitar l'oxidació del most, el most se sulfita amb 50 – 60 mg/l d'àcid sulfurós.

**Desfangat.** S'aconsegueix la reducció dels sòlids en suspensió, passant d'un 1-2% en el most *cuvée* a valors inferiors al 0,5%. Pot ser estàtic, per decantació, o bé dinàmic per filtració o centrifugació (Cavazzani and Suárez Suárez, 1989).

**Correccions.** Tot seguit, es corregeix l'acidesa amb àcid tartàric i s'addicionen bentonites per facilitar la precipitació de proteïnes i l'eliminació parcial de polifenols. Així mateix, en el cas dels mostos procedents de raïms poc madurats (climes freds), on hi ha una baixa concentració de sucres, s'addiciona most concentrat.

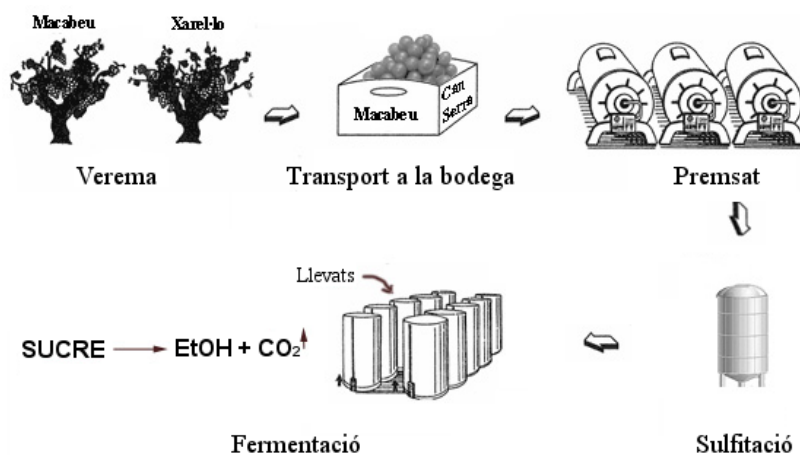
**Primera fermentació.** S'addiciona el peu de cuba, el qual consisteix en un most que se li ha afegit llevats seleccionats per la bodega (*Saccharomyces cerevisiae*). Llavors, els llevats metabolitzen els sucres presents en el most, generant etanol i diòxid de carboni. La fermentació es duu a terme en dipòsits d'acer inoxidable tot i que en alguns Cava i en els Champagne es fan servir botes de roure, a una temperatura controlada entre 16–18°C.

**Estabilització post-fermentativa.** La clarificació del vi base és, en general, poc intensa ja que no convé eliminar totes les macromolècules per tal d'evitar posteriors problemes en l'escuma del Cava i també degut a que durant el tiratge el cupatge adquireix novament terbolesa degut als llevats de la segona fermentació i als additius de tiratge. Tot seguit se sotmeten a l'estabilització tartàrica, amb l'objectiu d'evitar la formació i posterior precipitació de

cristalls durant l'envelliment.

Els vins base destinats a la producció de Cava han de complir les característiques analítiques que es descriuen a la legislació (*Reglamento de la Denominación «Cava» y de su Consejo Regulador*, 1991):

- Graduació alcohòlica adquirida: 9,5 – 11,5 % v/v
- Acidesa total mínima (en acid tartàric): 5,5 g/l
- Extracte sec no reductor: 13 – 22 g/l
- Acidesa volàtil real (en àcid acètic): inferior a 0,60 g/l
- Anhídrid sulfurós (màxim): 140 mg/l
- Cendres: 0,70 – 2 g/l
- pH: 2,8 – 3,3



**Figura II-1.** Esquema de vinificació en blanc per a l'elaboració d'un vi base.

## **2.1.2 Segona fermentació**

Un cop s'obtenen els vins base comença la segona etapa característica dels vins escumosos: la segona fermentació. Existeixen diversos mètodes per obtenir vins escumosos; tradicional, Charmat, transfer, Dioise (Asti), Continu (Rus) i gasificació (carbonatació), etc. Tot i això, els més emprats i amb major reputació són els elaborats mitjançant el mètode tradicional, i en segon lloc els del mètode Charmat.

### **2.1.2.1 Mètode tradicional**

El mètode tradicional és conegut també amb el nom francès de *méthode Champenoise*. Aquesta última denominació però, només pot ser emprada per algunes bodegues de la regió de la Champagne (nord-est de França) al tractar-se d'una denominació d'origen protegida.

El *Blanquette* de Limoux és considerat el primer vi escumós degut a que existeixen escrits sobre la producció i distribució que daten de 1531. Aquestes anotacions van ser realitzades per monjos Benedictins de l'abadia de Saint-Hilaire (sud de França). Un segle més tard, als voltants de 1670, el monjo Benedictí Dom Pierre Pérignon, hauria fet una estada a la mencionada abadia. D'allà obtindria la idea, de tornada a l'abadia de Saint Pierre d'Hautvillers (regió de Champagne), que posteriorment refinaria afegint certes millores durant l'elaboració i establint els fonaments enològics

d'aquest tipus de vins. Entre les millores podríem trobar l'ús d'ampolles de vidre més gruixudes i els taps cònics subjectats amb un filferro metàl·lic. Tot i això, el fenomen que produïa les bombolles en els vins no era encara conegut. Aquest misteri fou resolt per Luis Pasteur l'any 1861 quan va estudiar la fermentació alcohòlica, i va concloure que durant aquest procés els sucres es transformaven en etanol i CO<sub>2</sub>. Essent aquest últim el gas responsable de les bombolles dels vins escumosos. És a dir, els primers vins escumosos s'haurien elaborat per casualitat degut a que s'embotellaven abans de que la fermentació finalitzés, ja que es pensava que el procés fermentatiu ja havia acabat, però degut a les baixes temperatures hivernals els llevats només haurien passat a un estat de latència estacional. Aquests coneixements, van permetre controlar el procés d'elaboració i augmentar la rendibilitat. Des d'aleshores s'ha millorat la tècnica i les condicions d'elaboració que són emprades avui dia. La característica diferencial amb l'elaboració d'altres vins és que aquest mètode consisteix en dur a terme la segona fermentació, *prise de mousse*, en botella. A la Figura II-2 trobem esquematitzat el procés d'elaboració mitjançant el mètode tradicional. Aquest consisteix en diverses etapes descrites a continuació:

**Cupatge.** Normalment els vins escumosos estan elaborats a partir d'una mescla de vins base mono-varietals. És probablement l'etapa més crítica i empírica de tot el procés, ja que afectarà a les notes aromàtiques i el color que es vulgui obtenir en el producte final. Així mateix, per tal de complir amb els requeriments de la

denominació d'origen, s'escollirà una o altra varietat.

**Tiratge.** Consisteix en l'addició del peu de cuba a la mescla de vins base (cupatge). El peu de cuba, també anomenat licor de tiratge, està format per: una biomassa de llevats seleccionats, sucres i coadjuvants de tiratge (clarificants, nutrients pels llevats, etc). Els vins es mesclen amb els llevats i els sucres per tal de formar una suspensió homogènia que permeti una segona fermentació completa, dins de l'ampolla, on a mesura que es consumeixin els sucres es forma etanol i s'allibera el diòxid de carboni responsable de la pressió de l'ampolla. Finalment les ampolles, que seran les mateixes que rebrà el consumidor, són tapades amb un obturador i un tap corona.

**Rima o criaça.** Les ampolles, que estan tancades hermèticament, es disposen de forma horitzontal i són conservades a una temperatura controlada entre 8 i 16 °C, en un ambient amb baixa humitat i protegides de la llum (sobretot dels raigs ultraviolats). Durant els 3 primers mesos té lloc la fermentació, i després els llevats deixen de ser viables però continuen tenint un pes important en aquest procés. Quan els llevats deixen de ser viables són anomenats “mares”, i aquestes mantenen una sèrie d'intercanvis químics i bioquímics amb el vi, aportant-li personalitat.

**Remogut.** Aquesta etapa consisteix en acumular al coll de l'ampolla els llevats morts de la segona fermentació per ser eliminats posteriorment. Per aconseguir-ho és necessari realitzar una sèrie de moviments rotatius successius i un aixecament de les



ampolles per tal d'anar desplaçant els sòlids. D'aquesta manera les mares queden acumulades al coll de l'ampolla quan aquestes queden disposades en punta (cap per avall) .

El remogut pot efectuar-se de forma manual o automatitzada. El remogut automatitzat permet assegurar una majora homogeneïtzació de tota la producció.

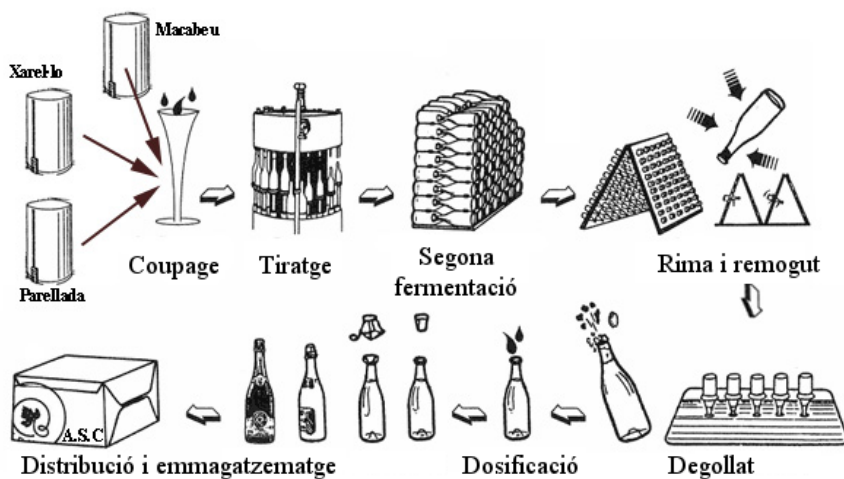
**Degollat.** Consisteix en eliminar el sediment desplaçat al coll de l'ampolla, dosificar el licor d'expedició i tancar l'ampolla amb el tap de suro definitiu. Tot i que també es pot fer manualment, normalment, són una sèrie d'operacions mecanitzades que permeten tractar de 1.200 a 12.000 ampolles per hora.

Per tal d'eliminar els sediments que s'han desplaçat al coll de les ampolles es procedeix a congelar el coll d'aquestes. Posteriorment s'elimina el tap corona i l'obturador de plàstic, de manera que la pressió interna del Cava expulsa el coll amb els sediments congelats juntament amb una part de Cava. El volum de Cava perdut és reomplert amb el licor d'expedició, la composició del qual sol ser un gran secret de cada bodega. Tot i que, de manera general, està formada per vi, SO<sub>2</sub> i sucres (excepte per la qualitat brut nature). Amb aquesta addició de licor d'expedició es pot ajustar el contingut de sucres dels caves d'acord amb la legislació vigent. Un cop s'ha addicionat el licor d'expedició es procedeix a tancar l'ampolla amb el tap de suro definitiu.

**Distribució i emmagatzematge.** Es procedeix a l'etiquetat i a l'emmagatzematge de les ampolles fins a la seva comercialització. Durant l'emmagatzematge i posterior distribució del producte

acabat factors que poden afectar a la qualitat dels vins escumosos són la temperatura i la llum. Per aquest motiu se solen utilitzar ampolles de vidre verd que protegeixen el Cava de la llum.

Aquests vins escumosos es diferencien per tenir una marca en forma d'estrella de quatre puntes a la base del tap de suro.



**Figura II-2.** Esquema del procés d'elaboració del Cava mitjançant el mètode tradicional.

### **2.1.2.1.1 El Cava**

L'origen del Cava es troba associat a l'esplendor de la viticultura catalana de mitjans del s. XIX. En aquell moment, diverses famílies de Sant Sadurní d'Anoia comencen a fer recerca sobre aquesta tècnica d'elaboració i l'apliquen amb les varietats autòctones de raïm blanc. Al 1872, Josep Raventós i Fatjó, de la històrica casa Codorniu, elabora les primeres 3.000 ampolles de Cava seguint el mètode tradicional de segona fermentació en l'ampolla. Tanmateix, és el seu fill i hereu, en Manuel Raventós i Domènech, qui inicia l'expansió i la consolidació de la casa. Poc després, a començaments del s. XX va nàixer Freixenet, una empresa familiar creada per Pere Ferrer i Dolors Sala (Gallardo Chacón, 2010). Codorniu, Freixenet i altres productors de la vila fan de Sant Sadurní d'Anoia la capital neuràlgica del Cava. Durant la primera meitat del segle XX, el Cava es consolida al mercat espanyol, on té un gran creixement entre els anys 60-70 i s'estén al mercat internacional en els 80. Avui, és un dels sectors més dinàmics i pròspers de la viticultura, bàsicament, amb una producció que ha superat els 200 milions d'ampolles l'any, que arriben als consumidors de tot el món. S'ha de destacar que tot i la tessitura de crisi actual de l'estat espanyol i el boicot realitzat per part de la població espanyola, el sector continua obtenint beneficis degut a l'expansió internacional realitzada sobretot en els últims anys. Així, mentre que en l'any 2000 hi havia una paritat entre el mercat interior i exterior, la tendència exportadora ha anat en augment, arribant-se

al 2012 amb un 66% de les vendes a mercats exteriors (Consell Regulador del Cava, 2013).

El Cava és un VEQPRD, és a dir un vi escumós de qualitat produït en regió determinada, el que significa que està protegit legalment per un reglament, el de la Denominació Cava (*Reglamento de la Denominación «Cava» y de su Consejo Regulador*, 1991). Aquesta legislació obliga a les bodegues a complir amb uns paràmetres de qualitat concrets. Allà també s'especifica les varietats de raïm i cupatges permesos, tot i que normalment consisteix en una mescla de vins base elaborats a partir de les varietats de Macabeu, Xarel·lo i Parellada. De forma resumida, al finalitzar el procés d'elaboració del Cava aquest ha de complir amb les característiques determinades que s'indiquen a continuació:

- Graduació alcohòlica adquirida: Mínima: 10,8 % (v/v) - Màxima: 11,8 % (v/v)
- Acidesa total mínima (en àcid tartàric): 5,5 g/L
- Extracte sec no reductor: Mínim: 13g/L - Màxim: 22 g/L
- Acidesa volàtil real (en àcid acètic): Inferior a 0,65 g/L
- Anhídrid sulfurós total: Inferior a 160 mg/L
- Cendres: Mínim 0,70 g/L - Màxim: 2 g/L
- pH: Mínim 2,8 – Màxim 3,3
- Sobrepressió mínima: 3,5 bar a 20°C

Així mateix, segons els seu contingut en sucres, trobarem diverses denominacions:

<b>Denominació</b>	<b>Contingut en sucres (g/L)</b>
Brut Nature *	< 3
Extra brut	< 6
Brut	<12
Extra-sec	12-20
Sec	17-35
Semi-sec	33-50
Dolç	> 50

\* sense addició de sucres després de la segona fermentació

Una altra indicació que pot presentar el producte és el temps que a transcorregut des del tiratge fins al degollament. Per la denominació Cava, com a mínim ha hagut de tenir un període de rime no inferior a 9 mesos. En el cas dels Cava Reserva, aquest no pot ser inferior a 15 mesos. Finalment, la denominació de Cava Gran Reserva està restringida als Cava del tipus Brut Nature, Extra Brut i Brut, amb una rima no inferior a 30 mesos i que s'hagi realitzat en el mateix celler.

### **2.1.2.2 Mètode Charmat**

El mètode Charmat, també conegut com *cuvée close*, granvàs o mètode italià, consisteix en dur a terme la segona fermentació en un gran dipòsit en comptes de fer-ho en l'ampolla.

El seu origen data a meitats del segle XIX, quan el francès

Edme-Jules Maumène, hauria emprat grans recipients amb l'objectiu d'accelerar el procés de la fermentació. Més tard l'italià, Federico Martinotti, amb la idea d'industrialitzar el procés, empraria dipòsits de fusta (Martinotti, 1985). Finalment, fou l'enginyer francès Jean-Eugène Charmat (Université de Montpellier) qui en el 1907 va optar per emprar dipòsits d'acer inoxidable (autoclau), fent viable la seva producció a gran escala (Calò et al., 1999).

L'avantatge sobre el mètode tradicional és que es poden produir grans volums, el temps de rima és inferior i, per tant, és un mètode més econòmic. Tot i això, aquests vins acostumen a estar organolèpticament menys valorats que els del mètode tradicional.

A la Figura II-3 es mostra l'esquema del procés amb els principals passos per la seva elaboració.

**Cupatge.** De la mateixa forma que en el cas del mètode tradicional, consisteix en la mescla de vins base elaborats, normalment, a partir de les varietats de Macabeu, Xarel·lo i Parellada. Segons les notes aromàtiques i el color que es vulgui obtenir en el producte final, s'escollirà una o altra varietat.

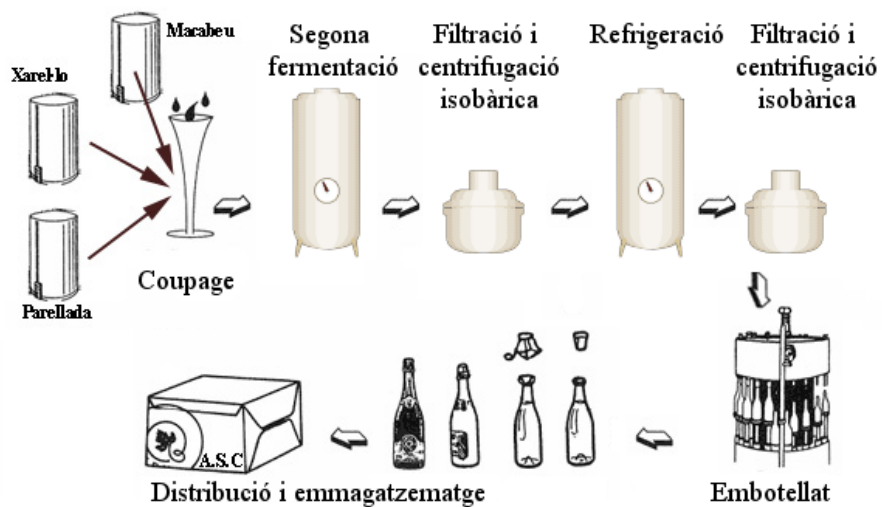
**Tiratge.** Consisteix en l'addició del peu de cuba a la mescla de vins base (cupatge) en un tanc d'acer inoxidable o bé un tanc metàl·lic recobert d'esmalt vítric. Els vins s'hauran de mesclar amb els llevats i els sucres per tal de formar una suspensió homogènia que permeti una segona fermentació completa, dins d'un recipient tancat, on a mesura que es consumeixin els sucres es forma etanol i s'alliberarà el diòxid de carboni.

**Rima o criaça.** Els tancs o recipients, es mantenen a una temperatura controlada entre 8 – 16 °C, pressió controlada i amb agitació. A diferència del mètode tradicional, aquest normalment no acostuma a ser superior als 6 mesos.

**Estabilització i clarificació.** Per tal d'aturar el procés de rima i separar el vi de les mares es procedeix a traslladar el vi a un altre tanc on es refreda, i així aconseguir l'estabilització d'aquests mitjançant la precipitació dels tartrats. Tot seguit, es procedeix amb una o successives etapes de centrifugació i filtratge, mantenint sempre la pressió per evitar la pèrdua de CO<sub>2</sub>.

**Embotellat.** Els vins escumosos són transvasats dels tancs a ampolles de vidre gruixut, tapades normalment amb taps de suro, polímers o una mesclat d'ambdós.

**Distribució i emmagatzematge.** Es procedeix a l'etiquetat i a l'emmagatzematge de les ampolles fins a la seva comercialització. Aquests vins escumosos poden ser distingits per tenir una circumferència a la base del tap de suro.



**Figura II-3.** Esquema del procés d'elaboració de vins escumosos mitjançant el mètode Charmat.



## **2.2 Paràmetres de qualitat dels vins escumosos**

El vi és una beguda que evoluciona amb el temps, i això implica que pot afectar a les seves propietats organolèptiques. Durant el procés d'elaboració dels vins escumosos hi ha diferents etapes on es poden produir modificacions de les seves propietats: durant l'obtenció del most, en la primera fermentació, a la rima, en la distribució o durant l'emmagatzematge. L'alteració en el most o en el vi base es pot detectar i corregir amb certa facilitat, mentre que durant la fase de rima, sobretot en botella, és complicat de detectar i rectificar. L'envelliment, ja sigui en període de rima o comercial, implica nombrosos canvis i, per tant, possiblement hi hagi nombrosos fenòmens implicats (Boulton et al., 1996).

La cerca de marcadors de qualitat ha estat objecte d'investigació per part de les bodegues i laboratoris de control de qualitat. S'entén per marcador de qualitat qualsevol paràmetre fisicoquímic que ens permeti avaluar la qualitat d'un aliment. Entre d'altres propietats, es busquen marcadors que siguin fàcilment detectables i/o quantificables, econòmics, difícilment emmascarables o alterables, etc. Una altra característica important és que han de ser objectius; Amb això ens referim que no ha de dependre de la persona que el mesura com podria passar amb els tasts, ja que aquesta mesura depèn de l'entrenament, dels records, estat anímic i estat de salut (refredats, etc...) del tastador, i per tant és una mesura subjectiva.

Existeixen diversos tipus de marcadors de qualitat, ja sigui per

validar la regió de producció, la varietat de raïm o l'anyada (Jaitz et al., 2010). Així mateix, també s'han buscat marcadors per determinar el grau d'oxidació dels vins (Bosch-Fusté et al., 2009), que normalment es fa a partir d'estudis cinètics (Kallithraka et al., 2009).

Una de les característiques sensorials més apreciades per part dels consumidors en els vins escumosos és el color, el qual pot condicionar l'elecció del producte. En aquest sentit, l'enfosquiment és un fenomen que pot alterar la qualitat dels vins. Existeixen diverses vies de formació de compostos que generen enfosquiment, i que s'expliquen en el següent apartat (2.1.1). Per altre banda, les mares del Cava també podrien afectar a la cinètica de l'enfosquiment, ja que aquestes són capaces d'adsorbir compostos presents en el vi (Del Barrio-Galán et al., 2011; Mazauric and Salmon, 2005), i per tant compostos precursors de l'enfosquiment (Razmkhab et al., 2002).

### **2.2.1 Enfosquiment**

Un dels principals problemes que pateixen els vins blancs és l'enfosquiment, o *browning* en terminologia anglosaxona. Consisteix en l'aparició d'una tonalitat marronosa que pot ser detectada per l'ull humà i/o mitjançant mètodes instrumentals com l'absorbància en l'espectre visible. Són molts els possibles compostos implicats en aquest fenomen, i també existeixen diverses vies de formació. L'enfosquiment es pot produir mitjançant

mecanismes enzimàtics i/o no-enzimàtics. (Buxaderas and López-Tamames, 2010; Li et al., 2008; Oliveira et al., 2011). En el primer cas, també anomenat enfosquiment biològic, és degut a l'acció d'enzims específics en presència d'oxigen molecular (polifenoloxidasas: PPO) o en presència de peròxid d'hidrogen (peroxidases: POD). Aquests catalitzen la hidroxilació dels monofenols a *orto*-difenols i l'oxidació d'aquests últims a *orto*-quinones. La via enzimàtica normalment és més ràpida que la via no-enzimàtica. Tot i que ambdós processos es poden produir al mateix temps, encara que el procés enzimàtic predomina en el most, on hi ha una intensa activitat polifenoloxidàsica, mentre que les reaccions no-enzimàtiques són majoritàries durant l'envelliment i conservació dels vins, és a dir quan els enzims ja no són actius. Els enzims són desactivats per l'elevat grau d'alcohol i pel SO<sub>2</sub> addicionat després de la fermentació. L'oxidació no-enzimàtica, o també coneguda com oxidació química, es pot produir en els aliments per diverses vies segons els compostos presents o les condicions del medi (pH, activitat d'aigua), de processat (temperatura) i temps d'emmagatzematge: caramel·lització, reaccions de Maillard, deshidratació de sucres, oxidació de fenols, reaccions amb aldehids, etc. En aquest sentit, en els vins escumosos podríem descartar la caramel·lització ja que tot i que tenen una elevada concentració de sucres, la temperatura sempre es manté molt allunyada de la necessària per que es dugui a terme aquest procés. Les altres vies esmentades, aplicables als vins, estan resumides a la Taula II-1 i s'expliquen en els següents apartats.

Procés	Reactius	Productes	En els vins
> <b>Deshidratació carbohidrats</b>	Sucres reductors (medi àcid)	Furfurals	Està afavorida pel pH del medi i pel contingut en alcohol.
> <b>Reaccions de Maillard</b>	Sucre reductor + amino àcid	Furfurals	Està desafavorida pel pH i la temperatura, però es pot generar, en el temps, degut a la presència de sucres i aminoàcids.
> <b>Oxidació de fenols</b>	fenols + oxigen	<i>O</i> -quinones i polímers	Són les reaccions més estudiades i les que la majoria d'autors proposen com responsables del color i l'enfosquiment en vins.
> <b>Reaccions que impliquen aldehids</b>	Àcid ascòrbic/ àcid glioxílic/ furfurals + flavonoide	Polimerització o sals de <i>xanthylum</i>	Són reaccions que necessiten pH àcid com els del vins, i són catalitzats per la presència d'ions metàl·lics.

**Taula II-1.** Resum dels processos que poden produir enfosquiment.

### 2.2.1.1 Deshidratació de sucres

En medi àcid els disacàrids i polisacàrids són hidrolitzats a monosacàrids. Posteriorment, les pentoses i hexoses s'enolitzen lentament i tot seguit pateixen l'eliminació de tres molècules d'aigua (Figura II-4). La deshidratació genera compostos de baix pes molecular com compostos furànics (furfural, HMF). Aquests finalment, poden polimeritzar per donar compostos amb coloració.

La reacció es veu afavorida al pH dels vins (3-3,5), pel contingut en etanol, i es catalitza amb la temperatura (Moreno-Arribas and Polo, 2009; Pereira et al., 2011).

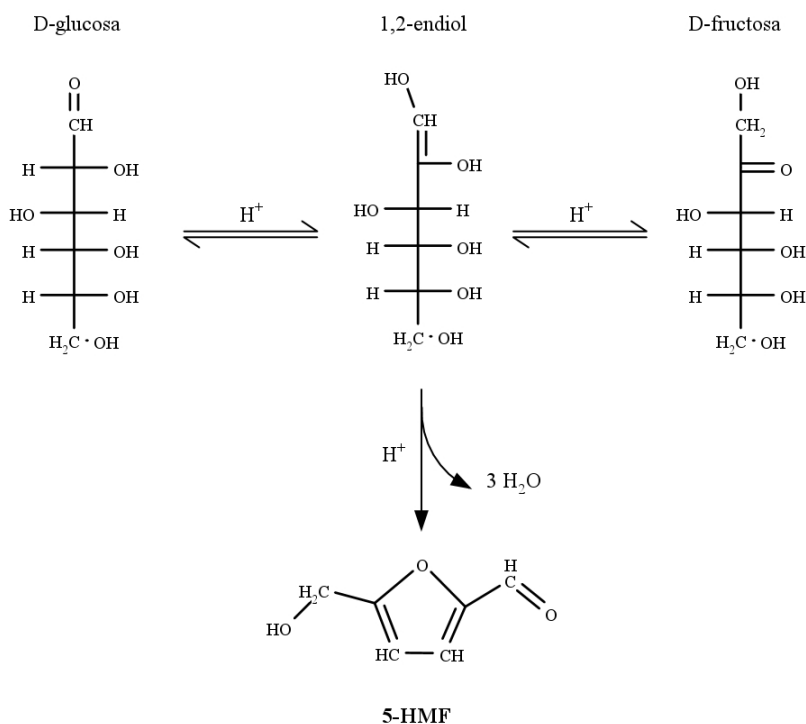


Figura II-4. Deshidratació de carbohidrats.

### **2.2.1.2 Reaccions de Maillard**

La denominació d'aquestes reaccions prové del seu descobridor Luis-Camille Maillard (1912), i engloba tot un seguit de reaccions complexes que generen compostos que produeixen enfosquiment. Per tal de que es produeixin les mencionades reaccions, en el medi hi ha d'estar present tant sucres reductors (en els vins normalment glucosa i fructosa) com amines (aminoàcids, pèptids i proteïnes). L'amina actua de catalitzador de la inducció de la deshidratació dels sucres reductors, a partir de diverses etapes (Jackson, 2008). El producte final són substàncies ciclades com furfuraldehids. La condensació posterior o polimerització amb altres compostos nucleòfils condueix a la formació de pigments marrons. Diversos subproductes de les reaccions de Maillard són idèntics o similars als produïts per les reaccions de deshidratació catalitzades pel medi àcid (apartat 2.2.1.1).

L'aportació tèrmica no és necessària, però catalitza les reaccions. El mateix ocorre amb l'activitat d'aigua, on a menor percentatge d'aquesta major és la velocitat de reacció. El pH del medi és un factor important que pot limitar la velocitat, essent pH superiors a 7 quan el ràtio de formació és superior. En al cas dels vins escumosos, tot i que el pH és generalment al voltant de 3, la presència d'etanol pot catalitzar la reacció (Shen and Wu, 2004), i amb el temps poden fer viables aquest tipus de reaccions.

### **2.2.1.3 Oxidació de fenols**

La majoria d'autors consideren que els compostos fenòlics tenen un paper destacat en el procés de l'enfosquiment en els vins (du Toit et al., 2006; Li et al., 2008; Macheix et al., 1991; Singleton, 1987).

Els fenols són metabòlits secundaris sintetitzats per les plantes per protegir-se de les situacions d'estrès, com la falta d'aigua, atacs de fongs, la radiació ultra-violeta o els canvis de temperatura (Deloire et al., 1998; Garrido and Borges, 2011). Molts compostos fenòlics que es troben a la pell del raïm són els principals responsables del color. A part del color, aquests compostos també poden afectar altres propietats dels vins, tals com el sabor, l'astringència o l'aroma.

Els compostos fenòlics es caracteritzen per tenir com a mínim un anell aromàtic amb un o més grups hidroxils (Taula II-2). Podem classificar-los en dos grans grups: no-flavonoides i flavonoides. Els primers estan distribuïts tant en la pell com en la polpa del raïm, estant formats per un anell aromàtic (àcids cinàmics i àcids benzoics) o dos anells units per una cadena insaturada (estilbens). En canvi, els flavonoides es troben majoritàriament a la pell del raïm i a la rapa, essent la seva estructura normalment dos anells benzílics units per un heterocicle d'oxigen (esquelet C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). Depenent de l'estructura de l'heterocicle, els podem classificar com: flavonols, antocianines, catequines i prociannidines (Buxaderas and López-Tamames, 2010; Garrido and Borges, 2011). Els flavonoides

posseïxen 3 anells: un benzè (A) fusionat amb una pirona (C) i aquest amb un grup fenil (B).

La composició fenòlica dels vins ha estat extensament estudiada, però la majoria de treballs es concentren en vins negres (García-Falcón et al., 2007; Monagas et al., 2005, 2003; Porgalı and Büyüktuncel, 2012), diversos en vins blancs (Darias-Martín et al., 2007; Hernanz et al., 2009; Proestos et al., 2005; Recamales et al., 2006), i molt pocs en vins escumosos (Bosch-Fusté et al., 2009; Chamkha et al., 2003; Ibern-Gómez et al., 2000; Pozo-Bayón et al., 2003). A la Taula II-2 es mostren els compostos fenòlics sovint trobats en Cava.

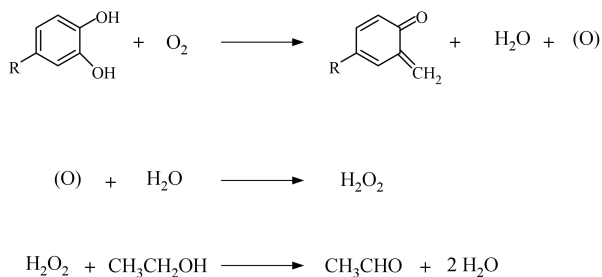
El contingut total en fenols en els vins blancs oscil·la entre 50 i 350 mg/L equivalents d'àcid gàl·lic (GAE), essent un valor molt inferior comparat amb els dels vins negres que acostumen a tenir valors entre 800 i 4.000 mg/L GAE (Cheynier et al., 1998). En els vins blancs el contingut en flavonoides és d'un 2% mentre que els àcids hidroxicinàmics (lliures o esterificats) representen un 20-40% (Chamkha et al., 2003). Els fenols més abundants en els vins escumosos són els àcids hidroxicinàmics, especialment l'àcid cafèric i el tirosol (Buxaderas and López-Tamames, 2010). Són diversos els factors que poden influir en el tipus i la concentració dels compostos fenòlics, com ara la varietat de raïm, el clima, les pràctiques enològiques, el mètode d'elaboració (Jackson and Lombard, 1993; Romero-Pérez et al., 1996; Singleton and Trousdale, 1983). Alguns autors indiquen que segons el contingut fenòlic els vins seran més susceptibles a l'enfosquiment (Fernandez-



Zurbano et al., 1995; Simpson, 1982), però altres ho descarten (Baron et al., 2000; Singleton, 1987).

L'oxidació de compostos fenòlics es pot produir principalment per dues vies: oxidació i subseqüent condensació, o per polimerització entre fenols o amb altres compostos presents en el medi (Li et al., 2008; Oliveira et al., 2011).

La primera via consisteix en l'oxidació d'*o*-difenols a *o*-quinones, a partir de la formació de radicals lliures semi-quinona, reduint-se l'oxigen a aigua oxigenada (Figura II-6).



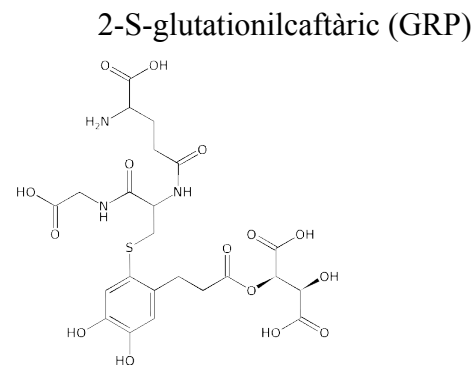
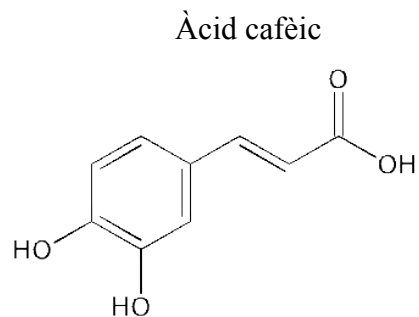
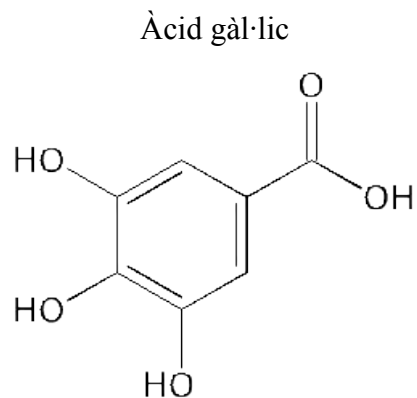
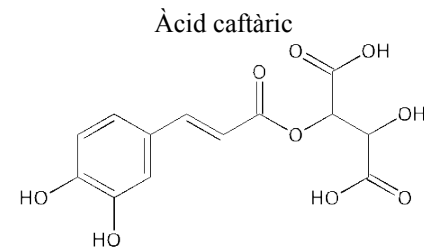
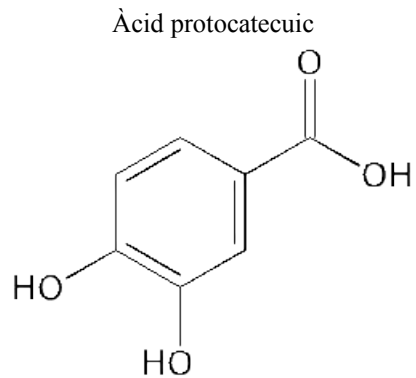
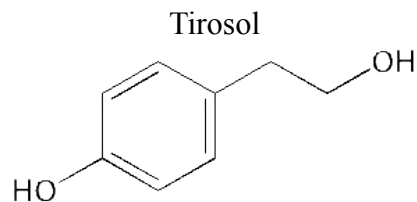
**Figura II-6.** Oxidació dels compostos fenòlics

Les quinones formades són inestables i experimenten subseqüents reaccions de condensació que generen pigments (Robards et al., 1999; Singleton, 1987). Les quinones poden combinar-se amb compostos nucleòfils (determinats fenols, compostos sulfhidril i amines) degut a la seva afinitat pels electrons, produint-se dímers o polímers. Aquest tipus d'oxidació ocorre ràpidament en medi alcalí, però en el medi àcid dels vins escumosos a les temperatures i pressions habituals també ocorre tot i que de

forma lenta, essent catalitzada per ions metàl·lics tals com ferro i coure (Boulton et al., 1996; Oszmianski et al., 1996). S'ha observat que l'oxigen no reacciona directament amb els compostos fenòlics sense la presència d'ions de metalls de transició (Danilewicz, 2003; Waterhouse and Laurie, 2006). Els *o*-difenois, majoritàriament incloent l'acid cafèic i els seus èsters, catequina, epicatequina, i àcid gàl·lic, són considerats com els compostos més susceptibles a patir una oxidació no enzimàtica en el procés d'enfosquiment, essent els nivells de flavan-3-ols els majors correlacionats amb el grau d'enfosquiment en els vins blancs (Buxaderas and López-Tamames, 2010; Fernandez-Zurbano et al., 1995; Fernández-Zurbano et al., 1998; Saucier and Waterhouse, 1999)

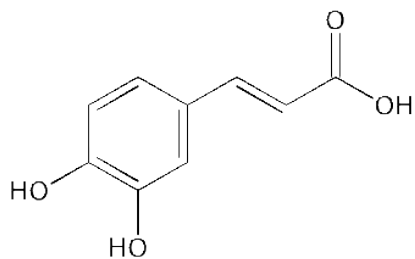
Per altra banda, es pensa que les parets de les mares poden adsorbir compostos fenòlics (Mazauric and Salmon, 2005), i un cop la paret és trencada, degut al procés d'autòlisi de les mares, els compostos fenòlics són retornats al medi (Cheynier et al., 1990; Mazauric and Salmon, 2006; Somers et al., 1987). Es creu que les mares de segona fermentació dels vins escumosos estableixen el color ja que els compostos fenòlics es combinen amb els polisacàrids excretats durant la segona fermentació (Escot et al., 2001) i amb les mannoproteïnes presents (Fornairon-Bonnefond et al., 2002; Vidal et al., 2003). L'adsorció dels compostos fenòlics en les parets dels llevats o la seva combinació amb les macromolècules previndria l'oxidació i estabilitzaria el color del vi.

Així mateix, els fenols flavan-3-ols poden polimeritzar en presència de compostos com l'acetaldehid, l'àcid glyoxílic o furfurals (Es-Safi et al., 2000, 1999; Fulcrand et al., 1997; Saucier et al., 1997; Timberlake and Bridle, 1976), produint pigments *xanthylum* i augmentant, per tant, l'enfosquiment, ja que aquests compostos absorbeixen a la regió 400-500 nm del visible (Hernanz et al., 2009).

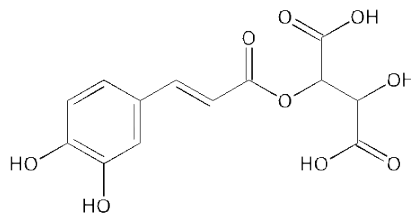


**Taula II-2.** Compostos fenòlics identificats en el Cava.

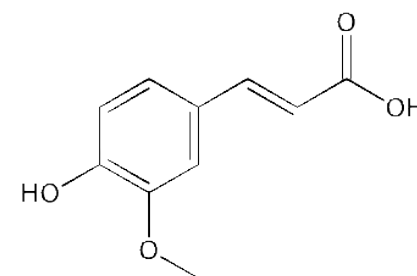
Àcid *p*-Cumàric



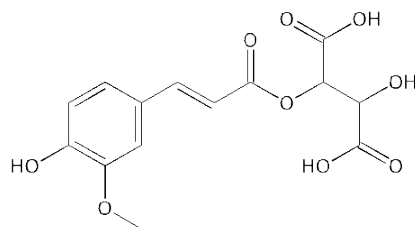
Àcid *cis/trans*-cutàric



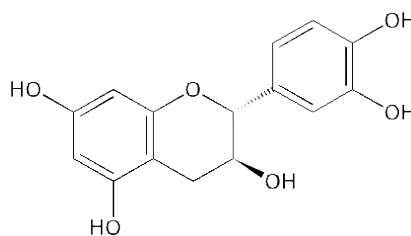
Àcid ferúlic



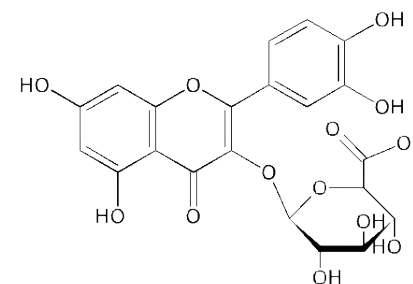
Àcid fertàric



Catequina



Quercetina-3-glucurònid



**Taula II-2 (continuació).** Compostos fenòlics identificats en el Cava.

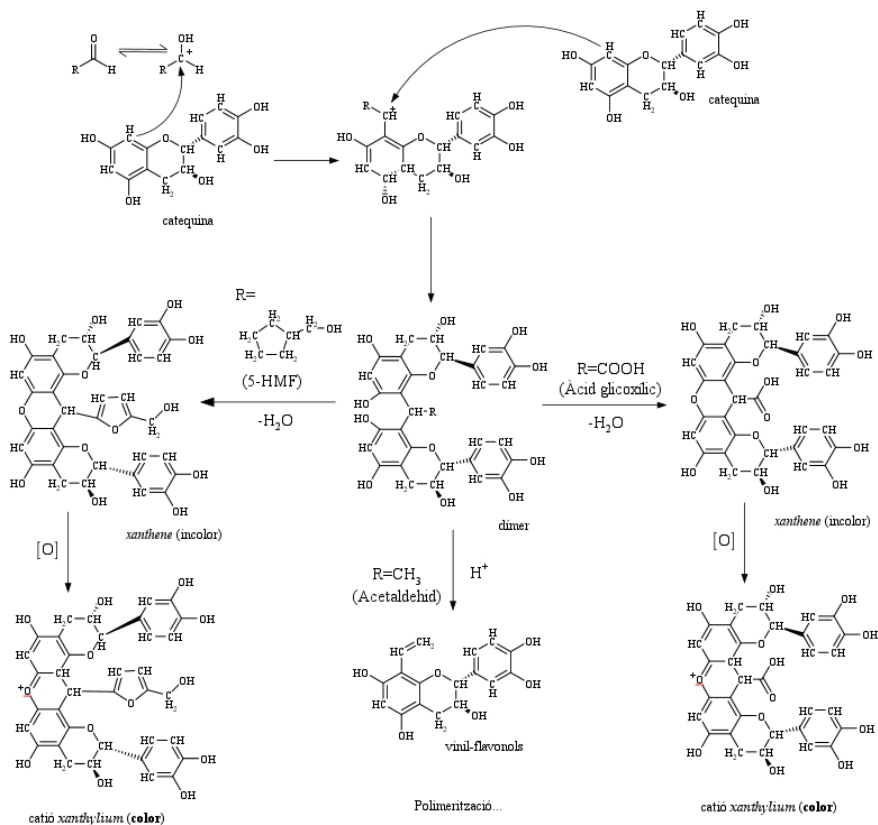
#### **2.2.1.4 Reaccions que impliquen aldehids**

En els vins es troben diversos aldehids que poden reaccionar amb altres compostos presents en el medi, i en especial amb els compostos fenòlics i més concretament els flavonoides (Li et al., 2008; Moreno-Arribas and Polo, 2009). El més abundant és l'acetaldehid el qual pot provenir del metabolisme del llevat o de l'oxidació de l'etanol, i la seva concentració es pot veure augmentada quan el vi s'exposa a l'oxigen o a llargs períodes d'envelliment. L'àcid glioxílic prové de l'oxidació de l'àcid tartàric, i la seva formació està catalitzada per ions metàl·lics (Fe, Cu) o per l'àcid ascòrbic presents en el medi. Altres aldehids que també poden reaccionar amb els flavonoides són el furfural i el 5-hidroximetilfurfural (Es-Safi et al., 2000).

El mecanisme de reacció comença amb la protonació de l'aldehid, generant-se un carbocatió intermedi el qual sofreix un addició nucleòfila per part de l'anell-A del flavonoide (Figura II-7) (Fulcrand et al., 2006, 1996; Li et al., 2008; Timberlake and Bridle, 1976). L'adducte resultant, mitjançant protonació i deshidratació, dona lloc a un altre carbocatió que reacciona amb un segon flavonoide. Com que les posicions C<sub>6</sub> i C<sub>8</sub> dels flavonoides són reactives, la reacció continua donant lloc a la polimerització. Quan diversos nucleòfils són presents, aquests es combinen de forma aleatòria donant lloc a una gran varietat d'oligòmers i polímers (Es-Safi et al., 1999), que poden influir en la coloració. Un procés

similar s'ha observat en el cas de l'àcid glioxílic. Tot i això, aquest reacciona generant sals de *xanthylum* en comptes de polímers (Es-Safi et al., 1999). Ara bé, aquestes reaccions no han estat observades en vins sinó només en solucions models. Això pot ser degut a que el ràtio de formació des de l'àcid tartàric és un factor limitant. El mateix resultat es troba quan l'aldehid és furfural o 5-hidroximetilfurfural (Es-Safi et al., 2000).

El ràtio de formació depèn de la concentració dels compostos precursors, i especialment en el contingut de l'aldehid i el nivell de desprotonació d'aquest, el qual depèn del pH del vi. El contingut en ions metàl·lics també pot afectar el ràtio de formació (Clark et al., 2003; Clark and Scollary, 2002; Oszmianski et al., 1996).



**Figura II-7.** Reaccions aldehyd-flavonoides per formar sals de *xanthylum*.

### 2.2.3 Estudis d'evolució i cinètics

Per tal de trobar marcadors de qualitat relacionats amb l'enfosquiment s'han realitzat diversos estudis d'evolució d'aquest compostos en vins blancs i en vins escumosos. A la Taula II-3 es troben resumits els treballs més destacats. La majoria fan estudis d'evolució, mentre que són pocs (cap en vins escumosos) que donen



models cinètics (Pérez-Zúñiga et al., 2000; Sioumis et al., 2006). La majoria d'estudis però, són realitzats en condicions accelerades, mantenint el vi a temperatures molt elevades durant un període curt de temps (dies o pocs mesos), emprant la metodologia o modificacions de la proposada per Singleton & Kramlinga (1976). La manca de fiabilitat de les prediccions fetes per aquest mètode ha estat demostrat, així com la manca de similitud entre els vins enfosquits d'aquesta manera i aquells enfosquits per acció natural (Barroso et al., 1989; Palma and Barroso, 2002)

Pel que fa a les mares, en els vins de Xerès (Sherry wines), s'ha observat que poden protegir el vins en front l'enfosquiment (Lopez-Toledano et al., 2006), i poden actuar com agent clarificant, fent disminuir l'enfosquiment (Razmkhab et al., 2002). Bosch-Fusté et al. (2009) van realitzar un estudi accelerat amb Cava conservat a 37 °C durant 13 setmanes. Tant durant la rima com en període comercial, es van conservar en dos espais de cap diferents: O<sub>2</sub> (medi oxidant) i CO<sub>2</sub> (medi no oxidant). En tots els casos es va observar un augment de l'enfosquiment, mesurat com l'absorbància a 420nm, tot i que l'augment va ser major en el cas del medi oxidant. Allà també s'indica que les mares podrien tenir un paper important en la inhibició de l'enfosquiment ja que durant la rima el ràtio de formació és similar en ambdues condicions oxidatives. Per altre banda, van detectar l'augment en el temps d'un compost, amb màxim d'absorbància a 284 nm, que podria ser el mateix compost que van observar Mayen et al., (1997), i que indiquen com un

potencial marcador de qualitat. La formació d'aquest compost era major en condicions menys oxidatives.

Per estudiar les cinètiques de formació es fa ús de metodologies ben establertes, obtenint-se la constant de velocitat, a una temperatura determinada, segons quin sigui el seu ordre de reacció. Per altra banda, per tal de conèixer l'energia d'activació i així poder predir la constant de formació a qualsevol temperatura, es fa ús de l'equació d'Arrhenius (Aguilar et al., 2006; Atkins and de Paula, 2010).

Mostres	Període	Metodologia	Conclusions	Referència
Cava	Comercial i rima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test accelerat (37 °C)</li> <li>• 13 setmanes</li> <li>• 2 Cava diferent qualitat</li> <li>• Macabeu, Xarel·lo i Parellada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'enfosquiment (<math>A_{420}</math>), mostra correlació amb el temps.</li> <li>• Els àcids hidroxycinàmics caftaric, cafèic, cutàric i GRP disminueixen amb el temps.</li> <li>• La presència de <math>CO_2</math> podria protegir contra l'enfosquiment en els Cava comercial.</li> <li>• Les mares podrien tenir un paper protector en front l'enfosquiment.</li> <li>• El paràmetre <math>A_{280}</math> augmenta, en gran part per un compost desconegut.</li> <li>• Observen la formació d'un compost amb potencial com a marcador.</li> </ul>	(Bosch-Fusté et al., 2009)
Cava	Rima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evolució natural</li> <li>• 8 vins escumosos</li> <li>• 9 mesos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Els compostos fenòlics no varien significativament durant la rima.</li> <li>• La composició fenòlica depèn de la varietat de raïm del cupatge i de la tècnica emprada per l'elaboració del Cava.</li> </ul>	(Pozo-Bayón et al., 2003)
Cava	Rima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evolució natural</li> <li>• 6 vins escumosos</li> <li>• 36 mesos</li> <li>• Macabeu, Xarel·lo, Parellada i Chardonnay</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S'observa una augment de l'enfosquiment (<math>A_{420}</math>), especialment a partir del 15è mes, el qual s'atribueix als fenols presents.</li> <li>• Els àcids hidroxycinnàmics són els fenols més susceptibles en front l'oxidació, sobretot l'acid cis/trans-caftaric i el GRP.</li> <li>• Durant el període d'autòlisi, les mares cedeixen compostos fenòlics al vi, així com enzims citoplasmàtics i isomerases.</li> <li>• El vi escumós elaborat a partir de la varietat Chardonnay és el més susceptible en front l'oxidació.</li> </ul>	(Ibern-Gómez et al., 2000)
Vi blanc	Comercial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conservats a l'aire lliure amb màxima exposició solar, i altres en fosc</li> <li>• Suplementats amb flavonols</li> <li>• 71 dies</li> <li>• Sauvignon blanc</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es va necessitar l'addició de gran quantitat de compostos com la catequina per observar un augment en l'enfosquiment (<math>A_{440}</math>)</li> <li>• Hi ha major enfosquiment quan s'utilitzen ampelles més fosques (amb menys transmitància de llum ultra-violeta)</li> </ul>	(Maury et al., 2010)

**Taula II-3.** Resum d'articles de vins blancs i escumosos relacionats en l'evolució i estudis cinètics de l'enfosquiment i compostos relacionats.

Vi blanc	Comercial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 temperatures: Ambient (variable), 15-20°C i 4°C.</li> <li>• 2 vins blancs</li> <li>• 12 mesos</li> <li>• Colombard i Zalema</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 18 fenols identificats.</li> <li>• Evolució color (CIELAB) i fenols va ser similar per les dues varietats de raïm.</li> <li>• Els fenols catequina, caftaric, àcid gàl·lic disminueixen, mentre que els àcids cafèic, <i>p</i>-cumàric i el ferúlic augmenten.</li> <li>• La posició de l'ampolla no afecta l'evolució.</li> </ul>	(Hernanz et al., 2009)
Vi blanc	Comercial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evolució natural i posterior test accelerat (55°C)</li> <li>• 9 mesos, 12 dies (accelerat)</li> <li>• 11 vins blancs experimentals</li> <li>• Varietats hel·lèniques, Chardonnay i Malvasia bianca</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'àcid cafèic, ferúlic i <i>p</i>-cumàric augmenten durant l'emmagatzematge.</li> <li>• No es va observar variació en fenols totals, però sí una disminució d'aquest en el test accelerat.</li> <li>• Elevada correlació entre fenols totals i el contingut en flavonols.</li> </ul>	(Kallithraka et al., 2009)
Vi blanc	Comercial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudi cinètic</li> <li>• Test accelerat 55°C</li> <li>• 10 dies</li> <li>• 7 vins blancs experimentals</li> <li>• Varietats Hel·lèniques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'augment lineal obeeix una cinètica d'ordre zero</li> <li>• L'epicatequina és el principal agent que influeix en l'enfosquiment</li> </ul>	(Sioumis et al., 2006)
Vi blanc	Comercial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudi cinètic</li> <li>• Test accelerat 45-50°C</li> <li>• 30 dies</li> <li>• Diferents tractaments post-fermentació</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Descriuen cinètiques d'ordre zero i primer ordre</li> <li>• El ràtio de formació depen de la varietat i de la temperatura</li> </ul>	(Pérez-Zúñiga et al., 2000)
Xerès	Comercial i rima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evolució natural (19°C) i test accelerat (35°C)</li> <li>• Vins comercials amb espai de cap i afegint llevats en alguns.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les mares retarden l'enfosquiment (<math>A_{420}</math>), el qual augmenta linealment amb el temps.</li> <li>• A major concentració de mares, major és la inhibició.</li> </ul>	(Lopez-Toledano et al., 2006)

**Taula II-3 (continuació)** Resum d'articles de vins blancs i escumosos relacionats en l'evolució i estudis cinètics de l'enfosquiment i compostos relacionats.



*Disseny  
experimental i  
metodologia*



### **III. Disseny experimental i metodologia**

Amb l'objectiu d'aprofundir en el coneixement del comportament de l'enfosquiment dels vins escumosos, s'ha procedit a una col·laboració amb l'empresa elaboradora de vins escumosos Freixenet S.A. Fruit d'aquesta cooperació s'ha dispostat de mostres de vins escumosos durant els períodes de rima i comercial.

De les diverses propietats organolèptiques, ens hem centrat en l'estudi visual dels vins escumosos, en ser el primer aspecte observat pels consumidors, i de gran preocupació i interès per les bodegues. Tant mateix, l'estudi plantejat està dissenyat de tal forma que aborda factors i compostos que també poden influir en altres aspectes organolèptics.

La presència de les mares de segona fermentació (llevats no viables post-fermentació) pot influir en el fenomen de l'enfosquiment. Així doncs, per tal de conèixer el seu possible efecte es va dissenyar un mostreig en paral·lel dels períodes de rima i comercial.

Per altra banda, amb l'objectiu de construir models matemàtics que permetin establir el període òptim de qualitat dels vins escumosos comercials es va plantejar un mostreig amb vins conservats a diverses temperatures. Sovint, es plantegen test accelerats, és a dir, els vins són conservats en condicions diferents a les normals (condicions extremes) o bé s'utilitzen vins



experimentals (solucions models). Aquests estudis poden proporcionar una bona aproximació que permet obtenir resultats de forma ràpida. Nogensmenys, per tal de descriure i modelitzar el fenòmens de l'enfosquiment es va optar per dissenyar un mostreig amb vins obtinguts de la producció de la bodega i posteriorment conservar-los en condicions reals. D'aquesta forma, es poden obtenir models predictius més acurats, així com marcadors, evitant possibles compostos no naturals (artefactes). Per avaluar les qualitats organolèptiques i la seva estabilitat o vida útil, així com detectar possibles marcadors, cal disposar de metodologies analítiques que permetin obtenir resultats fiables. Aquestes tècniques, per tal de poder ser adoptades per efectuar mesures rutinàries de control de qualitat, han de complir certes característiques: ser econòmiques, ràpides, senzilles d'aplicar i el màxim de respectuoses amb el medi ambient.

La metodologia emprada s'ha dividit en funció dels objectius plantejats. En aquest sentit, el primer bloc (3.1) fa referència a l'elucidació d'un compost amb potencial com a marcador de qualitat. En el següent (3.2), s'avalua l'efecte que poden tenir les mares sobre l'enfosquiment o compostos relacionats a partir de la comparació dels períodes de rima i comercial. En el tercer apartat (3.3), s'explica el disseny amb vins escumosos comercials conservats a diferents temperatures, per tal d'observar les possibles diferències que poden existir segons les condicions en que es conservin, així com la formulació de models predictius. A la secció

3.4 s'analitzen els resultats dels tast de les mostres per tal d'obtenir l'avaluació sensorial de les mostres de vins escumosos estudiades. Finalment, en l'últim apartat (3.5), es resumeixen les característiques i la idoneïtat de les tècniques analítiques emprades en tots els estudis.

### **3.1 Elucidació d'un compost amb potencial com a marcador**

Es tracta d'un compost amb potencial com a marcador de qualitat que ha estat detectat en anteriors treballs del grup de *Vins, aromes i factors de qualitat d'aliments i begudes* (Girbau-Solà, 2003). Aquest compost no ha pogut ser identificat però s'han descrit algunes de les seves propietats fisico-químiques. Té el màxim d'absorbància a 284 nm (en la matriu de Cava, és a dir, amb un contingut en etanol de 10,5 a 12,5% v/v), i la seva massa exacta és de 177.0398 m/z (Bosch-Fusté et al., 2009).

Anteriorment, altres grups d'investigació (Mayen et al., 1997) també havien observat, en vins blancs, un compost amb unes característiques fisico-químiques similars (“peak 3”), i van hipotetitzar que es tractava d'un compost resultat de l'oxidació d'un fenol degut a la seva correlació amb l'enfosquiment. Així mateix, aquest compost també podria ser el descrit com a “peak 3” en un estudi amb vins de Xerès (Baron et al., 2000). Allà indicaven que es pot tractar d'un compost intermedi previ a la formació de polímers, que participen en l'enfosquiment, a partir de l'oxidació dels flavonoides. Tot i això, els estudis realitzats per Bosch-Fusté et al. (2009) s'indica que una de les vies de formació d'aquest compost és a partir de la degradació de sucres. El seu possible potencial com a marcador prové de l'elevada linealitat que presenta amb el temps (Bosch-Fusté et al., 2009), així com també el seu poder discriminant (Mayen et al., 1997). Ambdós van descriure que aquest compost es

genera també en condicions anaeròbiques, essent el ràtio de formació major que en medis oxidants.

Per elucidar l'estructura d'aquest compost (M-1), es va optar per emprar Cava envellit de forma natural i accelerada per tal d'aconseguir la màxima concentració i senyal analític del compost en qüestió.

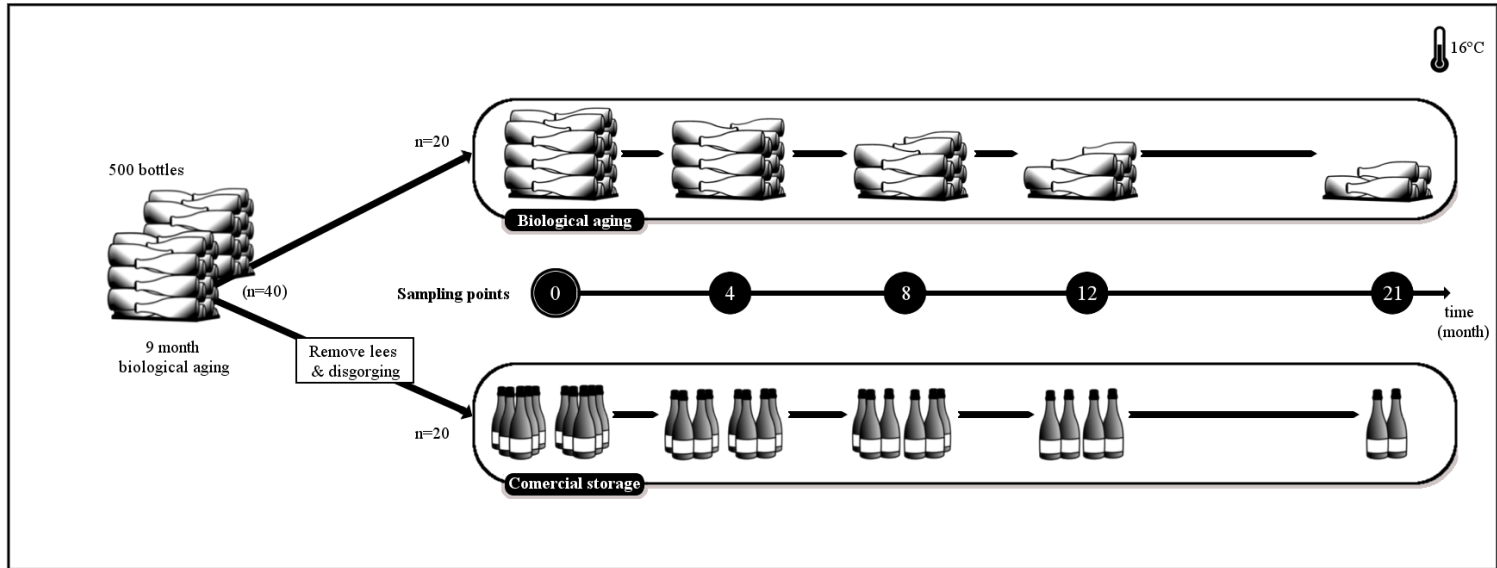
La complexitat de la matriu del Cava, provoca que hi hagi molts compostos que interfereixin en l'elucidació del compost que es vol identificar. Es per aquest motiu que s'ha pensat emprar diverses tècniques analítiques; es va optar per emprar la cromatografia líquida acoblada a dos detectors en sèrie: diode array (DAD) i masses (MS/MS). A més, es va pensar en utilitzar la tècnica per excel·lència en elucidació estructural: la ressonància magnètica nuclear (NMR). En el cas que existís un patró comercial es compararia per comprovar que coincidís amb el temps de retenció i amb les dades espectroscòpiques.

Així mateix, amb la finalitat de determinar el rang de concentració en que es troba aquest compost en aquest tipus de vins, es va considerar adquirir vins escumosos comercials (n=80).

### **3.2 Paper de les mares i aptitud dels fenols i del 5-HMF com a marcadors de qualitat**

Per tal de conèixer si les mares de la segona fermentació, presents durant la rima, influeixen en l'enfosquiment es va dur a terme un estudi comparant l'evolució d'aquest fenomen durant la rima i en el període comercial. Es tracta d'un estudi en paral·lel amb dues series de Cava de diferent qualitat (A i B) en fase de rima i en període comercial (Figura III-1). És a dir, després de 9 mesos de rima, la meitat de les ampolles van continuar l'envelliment amb les mares, i l'altre meitat es va procedir al degollament, remogut de les mares i l'addició del licor d'expedició per obtenir el Cava comercial. Totes les ampolles van ser conservades a temperatura de celler (16 °C), i durant els aproximadament dos anys de l'estudi es van agafar dues ampolles de cada Cava (A i B) i període (rima i comercial) en cinc punts de mostreig (inicial, 4, 8, 12 i 21 mesos), tal i com es mostra a la figura III-1.

Així mateix, aquest mostreig també es va pensar per avaluar l'efecte de les mares sobre l'evolució dels compostos potencialment relacionats amb l'enfosquiment: fenols i 5-HMF. En aquest sentit, el que es volia és veure la viabilitat d'aquests compostos com a marcadors de qualitat. La identificació i quantificació dels compostos es duria a terme mitjançant UHPLC-DAD-FLD.

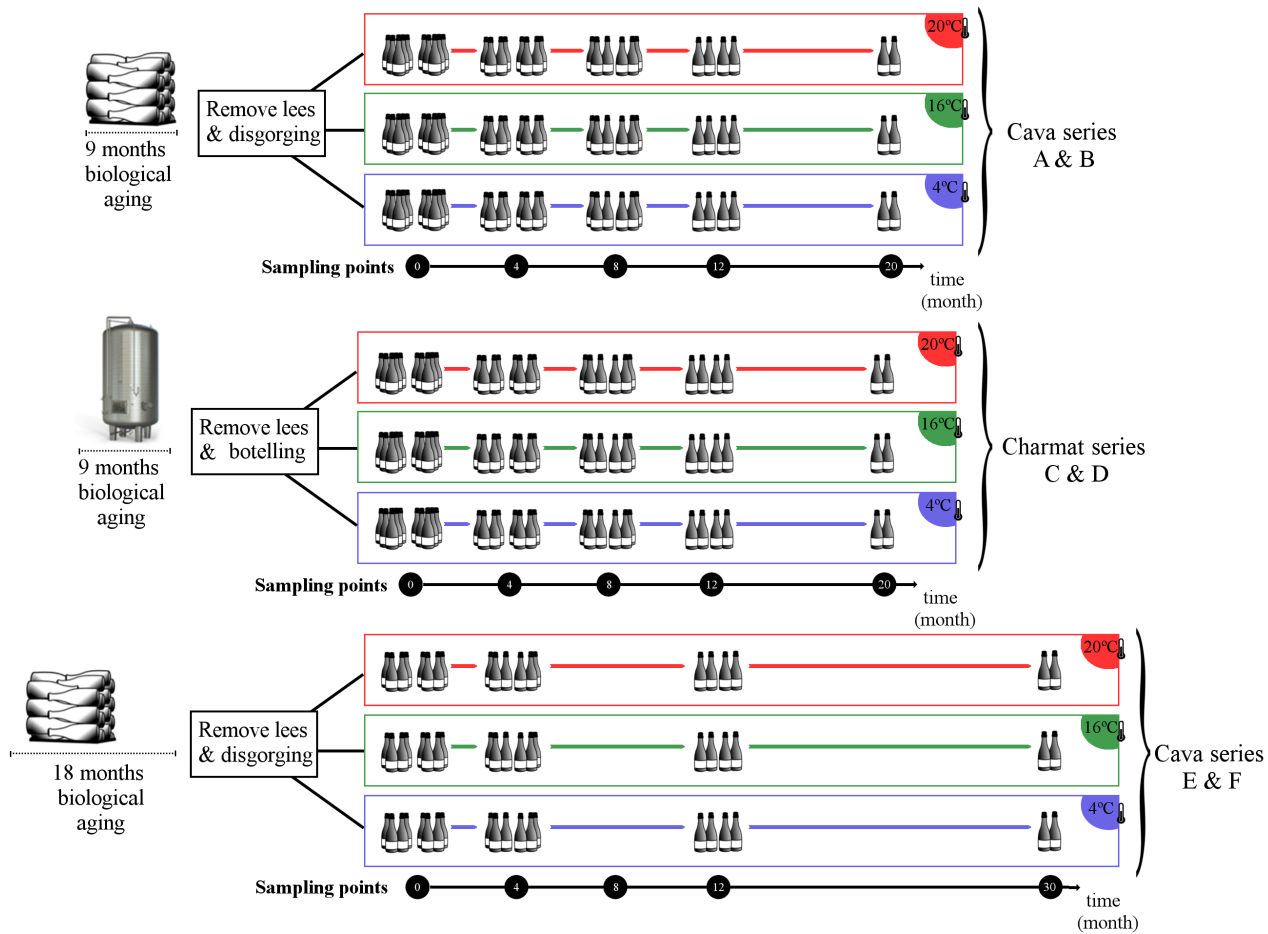


**Figura III-1.** Esquema del mostreig per conèixer l'efecte de les mares del Cava, comparant els períodes de rima i comercial.

### **3.3 Cinètica de l'enfosquiment de vins escumosos conservats a diferents condicions d'emmagatzematge: Models per la predicció de la vida útil**

Per conèixer la cinètica de l'enfosquiment i dels compostos relacionats (fenols i 5-HMF), i així poder construir models predictius per establir el temps òptim de qualitat, es va dissenyar un mostreig amb vins escumosos comercials conservats a tres temperatures diferents: Nevera (4 °C), Celler (16 °C) i Ambient (20 °C). Es van deixar sis series de vins escumosos durant més de dos anys a les temperatures esmentades, agafant dos ampolles de cada un en diversos punts durant l'emmagatzematge (Figura III-2). Dels sis vins escumosos, dos van ser elaborats pel mètode Charmat (C i D) i els altres pel mètode tradicional. Així mateix, dues de les sèries (E i F) eren de la categoria reserva (>15 mesos de rima). Els vins escumosos estaven elaborats a partir de dos vins base de diferent qualitat. Amb aquesta diversitat de vins escumosos el que es pretenia era que els models fossin el més universals possible.

Es va plantejar identificar i quantificar els compostos relacionats amb l'enfosquiment mitjançant HPLC-DAD-FLD-MS, així com també es va dur a terme la mesura clàssica d'enfosquiment en els vins: l'absorbància a 420 nm. Aquest últim paràmetre serviria de referència per poder comparar la seva idoneïtat amb els altres potencials marcadors, així com poder establir models predictius a partir del mateix  $A_{420}$ .



**Figura III-2.** Esquema del mostreig de les series de vins escumosos comercials conservades a tres temperatures 4 °C, 16 °C i 20 °C.



### **3.4 Tasts**

Tot i que el tasts no permeten una mesura tant objectiva com els paràmetres analítics, aquests també poden aportar informació valuosa per la caracterització de la qualitat dels vins escumosos. En aquest sentit, a mesura que s'obtenien les mostres durant la rima i en període comercial conservades a diferents temperatures, es realitzaven els pertinents tasts. Es va pensar en realitzar dos tipus de tasts diferents: un de triangular i l'altre descriptiu.

El primer, va ser realitzat per veure si els tastadors eren capaços d'observar diferències entre els vins escumosos amb un temps de rima determinat i un altre amb el mateix temps d'envelliment, però que una part del temps hagués estat en període comercial.

Per altre banda, es va pensar en realitzar tasts descriptius, per tal d'observar si hi havia diferències entre els vins escumosos durant l'envelliment en el període comercial, i també entre les diverses condicions de conservació. Per tal de dur a terme aquests tasts es va dissenyar una fitxa de tast (Figura III-3).

En tots els casos, el panell va ser format per experts tastadors i consumidors habituals de vins escumosos.

Dia ..... Tastador ..... Codi .....

**TEST 1:** (test triangular sobre l'efecte de les mares;  
comparativa entre temps en rima i període comercial)

Dels tres vins dos son els mateixos, escumosos escull quin  
és el diferent valorant la qualitat global (gust, aroma,  
escuma, bombolles), i finalment indica quin prefereixes:

Diferència

Preferència

-----  
Dia ..... Tastador ..... Codi .....

**TEST 2:** (test triangular sobre l'efecte de la temperatura  
d'emmagatzematge)

Dels tres vins dos son els mateixos, escumosos escull quin  
és el diferent valorant la qualitat global (gust, aroma,  
escuma, bombolles), i finalment indica quin prefereixes:

Diferència

Preferència

-----  
Dia ..... Tastador ..... Codi .....

**TEST 3:** (test descriptiu)

Puntua del 0 (dolent) al 10 (perfecte) els vins a partir dels  
descriptors següents:

Color (entès com a grau d'enfosquiment)

Global (gust, aroma, escuma, bombolles)

Figura III-3: Fitxa de tasts.

### **3.5 Metodologia analítica**

Per tal de dur a terme la caracterització dels vins així com la identificació i quantificació dels anàlits d'interès s'han emprat diverses tècniques analítiques. Això implica tant l'ús de tècniques clàssiques en enologia com tècniques analítiques avançades. En el següents apartats es resumeixen les característiques principals de cada tècnica així com la seva idoneïtat per obtenir resultats dels objectius marcats. Les característiques dels instruments i les metodologies emprades es troben descrites en els respectius articles que es poden trobar en el capítol 4 (Resultats).

#### **3.5.1 Paràmetres enològics**

Per tal de caracteritzar els vins es van dur a terme l'anàlisi de paràmetres fisico-químics clàssics en enologia: grau alcohòlic, pH, contingut en sucres, absorbància 420 nm, contingut en sulfits, fenols totals, sobrepressió de CO<sub>2</sub>. De forma més extensa s'expliquen a continuació els anàlisis que han tingut més pes en els treballs de la present obra.

### **3.5.1.1 UV 420nm ( $A_{420}$ )**

La mesura de l'absorbància a 420 nm ( $A_{420}$ ) és un paràmetre molt emprat en les bodegues per determinar el grau d'oxidació o enfosquiment que ha sofert un vi. Consisteix en la mesura, mitjançant un espectrofotòmetre, de l'absorbància a 420 nm, emprant una cubeta d'1 cm de camí òptic, en front d'un blanc. A diferència d'altres tècniques, és tracta d'una mesura ràpida, senzilla i econòmica. Alternativament, també s'empra l'espai de color CIELAB on es tenen en compte diverses absorbàncies i la lluminositat. Tot i això, per l'elaboració del Cava normalment s'empren cupatges de vins base de les varietats Macabeu, Xarel·lo i Parellada, donant una intensitat del senyal dels paràmetres del CIELAB baixa. Així doncs, la mesura de  $A_{420}$  dona una informació equivalent en aquests casos i, per tant, és l'emprada per aquest tipus de mostres, degut a que és una mesura més ràpida i menys feixuga (Buxaderas and López-Tamames, 2010).

### **3.5.1.2 Folin-Ciocalteu**

És el mètode per excel·lència per la determinació dels compostos antioxidants fenòlics i polifenòlics presents a les mostres de vins. El mètode fou creat per Otto Folin i Vintila Ciocalteu per la mesura de tirosina en proteïnes (Folin and Ciocalteu, 1927). Posteriorment es va observar que també reaccionava amb la majoria de compostos fenòlics. Tot i això, aquesta tècnica és poc selectiva i, per tant, no

només mesura els fenols totals, sinó totes les substàncies reductores presents en el medi, essent més un marcador de la capacitat reductora (Everette et al., 2010; Prior et al., 2005).

Es tracta de fer reaccionar els fenols presents en els vins amb una solució mescla de fosfomolibdat i fosfotungstè, en medi bàsic (carbonat de sodi). Un cop s'ha produït la reacció, s'observa la formació de color blavós, el qual és mesurat amb un espectrofotòmetre a 765 nm. Finalment, es realitza una corba de calibratge, normalment, amb àcid gàl·lic, i s'expressa com a equivalents d'aquest fenol (GAE).

### **3.5.1.3 Sulfit**

Els sulfit es poden generar durant la fermentació, però en els vins escumosos majoritàriament provenen de l'addició de metasulfit de potassi amb el licor d'expedició per tal d'evitar processos oxidatius indesitjables. A part de la seva acció antioxidant, també és un agent antimicrobià el qual a una concentració determinada inhibeix qualsevol procés fermentatiu.

En el vi els sulfit es poden trobar en la forma lliure (en diverses formes:  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  o  $\text{SO}_2$ , depenent del pH) o bé units a compostos carbonílics, insaturats i/o fenols i derivats (Barbe et al., 2000).

Existeixen diverses metodologies per determinar tant els sulfit totals com el lliure. Es va escollir un dels mètodes recomanat per la

OIV (“International Methods of Analysis of Wines and Musts,” 2012), el qual consisteix en una valoració amb iode. En el cas del sulfits lliures, la valoració es directe, mentre que per el sulfits totals es procedeix a una posterior valoració després de fer la hidròlisi en medi bàsic (hidròxid sòdic).

### **3.5.2 Tècniques analítiques avançades**

Per a dur terme la identificació i quantificació dels compostos d'interès, es van emprar diverses tècniques analítiques. Per l'elucidació del compost desconegut es va fer ús de la separació per cromatografia líquida (HPLC) acoblada a un detector de diode array (DAD o PDA) i a un detector de masses/masses (MS/MS) en sèrie, així com la ressonància magnètica nuclear (NMR).

Per la determinació dels compostos fenòlics també es va fer ús de la cromatografia líquida, tot i que en aquest cas també es va acoblar un detector fluorimètric (FLD) a la sortida del DAD ja que és més adequat per la determinació de flavonoides.

A continuació es presenten breument les característiques dels sistemes de separació i detecció, podent-se trobar major informació en llibres especialitzats en química analítica (Skoog et al., 2008).

### 3.5.2.1 HPLC/UHPLC

La cromatografia d'alta eficiència HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) o ultra eficiència (UHPLC) consisteix en la separació de compostos segons la seva afinitat a la fase mòbil (eluent) o a la fase estacionària (columna). La fase estacionària emprada en tots els anàlisi ha estat una C<sub>18</sub> (octadecil), és a dir, es van separar els compostos a partir de la seva polaritat.

Un cop separats els compostos, es duu a terme la detecció i quantificació d'aquests mitjançant l'ús de detectors. Hi ha de diversos tipus de detectors, i depenent de les característiques de l'anàlit s'empra un o altre. En aquest cas es va fer ús de diversos detectors acoblats en sèrie.

**Detector de foto-diode array (DAD o PDA).** Es tracta d'un dels detectors més emprats en anàlisi de rutina, per la seva facilitat d'ús i baix cost. L'espectroscòpia d'absorció molecular es basa en la mesura de la transmitància o de l'absorbància a una determinada longitud d'ona segons l'anàlit. Es tracta d'un detector no destructiu i, per tant, se li pot acoblar un altre detector a la sortida d'aquest. Pot ser útil per identificar compostos a partir de l'espectre d'absorció, o emprat per quantificar el contingut d'un anàlit a partir d'una recta de calibratge externa del patró.

**Detector fluorimètric (FLD).** Es tracta d'un detector més selectiu que el DAD, ja que hi ha relativament poc compostos que tinguin la propietat d'emetre energia, així com d'absorbir i emetre a

les mateixes longituds d'ona. A més, acostuma a ser un detector més sensible, podent quantificar compostos amb concentracions deu vegades inferiors al que pot arribar el DAD. És usat normalment per l'anàlisi de flavonols, essent també un detector no destructiu.

**Espectrometria de masses (MS i MS/MS).** La detecció per masses és una tècnica capaç de proporcionar gran informació sobre l'estructura de la molècula, la massa exacte i la concentració d'analit en matrius complexes. A més, acostuma a tenir límits de detecció inferiors a la majoria de detectors. Tot i això, l'elevat preu i el seu manteniment fa que normalment no estigui present en els laboratoris de bodegues o d'anàlisi rutinari. Bàsicament, consisteix en ionitzar i analitzar els nuclis atòmics en funció de la seva relació massa-càrrega ( $m/z$ ). Existeix una gran varietat de sistemes per generar els ions (fonts d'ionització), i en el nostre cas vam optar per emprar l'ionització per electronebulització (ESI), degut al pes molecular de les substàncies a analitzar i la suau fragmentació que produeix. Per a l'elucidació del compost desconegut és va emprar un analitzador triple quadrupol (TQD), mentre que per la identificació de compostos fenòlics es va emprar un quadrupol amb trampa d'ions.

### **3.5.2.2 NMR**

La Ressonància Magnètica Nuclear és la tècnica per excel·lència emprada per elucidar i confirmar l'estructura d'un compost. Aquesta tècnica es basa en la mesura de l'absorció de la radiació



electromagnètica, on estan implicats els nuclis dels àtoms. En el nostre cas vam analitzar els protons:  $H^1$ -NMR. En aquest sentit, interessa eliminar l'aigua del medi per tal que el protons d'aquest no emmascarin altres senyals. Per tant, es van evaporar les mostres a sequedat i es van re-dissoldre amb aigua deuterada. Després de transformar les dades obtingudes mitjançant la transformada de Fourier, s'obté un espectre de freqüències. Tot i això, normalment es treballa amb l'escala de desplaçaments químics (ppm), la qual s'aconsegueix dividint la freqüència (Hz) per la freqüència principal de l'instrument (MHz), tenint present la freqüència del compost de referència, que en el nostre cas va ser l'àcid 3-(Trimetilsilil)propionic-2,2,3,3- $d_4$  (TSP- $d_4$ ). A partir d'aquest espectre, i observant també els desdoblaments de spin, es pot elucidar l'estructura d'un compost. Per assegurar la identificació també es va fortificar una de les mostres amb el patró.

# *Resultats*



## IV Resultats i discussió

### 4.1 Identificació del 5-hidroximetil-2-furfural (5-HMF) en el Cava mitjançant LC-DAD-MS/MS i RMN.

A. Serra-Cayuela, M. Castellari, J. Bosch-Fusté, M. Riu-Aumatell, S. Buxaderas, E. López-Tamames. Identification of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) in Cava sparkling wines by LC-DAD-MS/MS and NMR spectrometry. *Food Chemistry* 2013 141(4) p.3373–3380 doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.158

#### Resum:

L'objectiu d'aquest estudi se centra en la identificació d'un compost amb potencial com a marcador de qualitat present en els vins escumosos. En anteriors treballs del grup es van determinar certs paràmetres per tal d'elucidar l'estructura, però no va ser possible la seva identificació.

Es van emprar mostres envellides, ja que *a priori* són les que contenen més concentració d'aquest compost. L'ús de tècniques analítiques avançades com HPLC-DAD-MS/MS va permetre elucidar l'estructura d'aquest compost, així com confirmar-la per NMR i a partir del seu patró comercial.

Aquest compost és el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), és a dir

un compost procedent dels sucres presents en els vins escumosos. Es va desenvolupar i validar un mètode per la determinació d'aquest compost en vins escumosos.

Per altra banda és va determinar l'interval de concentracions en que es troba aquest compost en mostres de vins escumosos comercials (n=80), el qual fou entre 0.25 i 12.81 mg/L.

Resultats concrets:

- Identificació del 5-hidroximetil-2-furfural (5-HMF) en Cava.
- Desenvolupament i validació d'un mètode ràpid de detecció i quantificació de 5-HMF
- Determinació de l'interval de concentració en vins escumosos comercials.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

Analytical Methods

## Identification of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) in Cava sparkling wines by LC-DAD-MS/MS and NMR spectrometry

A. Serra-Cayuela<sup>a</sup>, M. Castellari<sup>b</sup>, J. Bosch-Fusté<sup>a,\*</sup>, M. Riu-Aumatell<sup>a</sup>, S. Buxaderas<sup>a,\*</sup>, E. López-Tamames<sup>a</sup><sup>a</sup>Departament de Nutrició i Bromatologia, Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments (XaRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Campus de l'Alimentació de Torribera, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain<sup>b</sup>IRIA-Food Technology, Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Girona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 May 2011  
 Received in revised form 5 March 2013  
 Accepted 22 May 2013  
 Available online 11 June 2013

## Keywords:

5-HMF  
 Ageing  
 Sparkling wine  
 NMR  
 UHPLC-DAD-MS/MS

## ABSTRACT

The aim of this study was to elucidate the structure of a potential ageing marker for Cava sparkling wine. In order to clarify the structure of this compound, NMR spectroscopy and hyphenated UHPLC-DAD-MS/MS techniques were used. We identified the hitherto unknown compound as 5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde (5-HMF). This is the first time that this compound has been reported in sparkling wines. A survey, based on the analysis of 80 commercial sparkling wines, showed that 5-HMF is present between 0.25 and 12.81 mg/L, and is compared with those reported for other types of wine. Hypothetical origin of 5-HMF in Cava sparkling wine is discussed.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cava is a quality sparkling wine (Designation of Origin) produced by the traditional method, which consists of a second fermentation followed by biological ageing in contact with lees in anaerobic conditions for at least 9 months in bottle (Official Journal of the European Union, Commission Regulation (EC), 2009, sec. Regulations). Unlike most wines, these sparkling wines hold a reduced oxidative atmosphere as a result of the CO<sub>2</sub> generated during fermentation which is kept in the bottle. Thus the evolution of aroma and colour during ageing may follow pathways that differ from those in other types of wines.

During wine biological ageing, complex chemical changes occur, which are accompanied by alterations of the organoleptic properties (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006; Riu-Aumatell, Bosch-Fusté, López-Tamames, & Buxaderas, 2006; Torrens, Riu-Aumatell, Vichi, López-Tamames, & Buxaderas, 2010). Throughout its commercial life, wine can undergo long periods of storage, which affect its evolution and may decrease sensorial quality; therefore it would be pertinent to find an objective marker with the capacity to determine whether the quality of the wine has decreased. Such a marker would greatly facilitate quality control, to ensure that the sparkling wine has not suffered adverse conditions of storage, and to reject it in case the wine has been damaged.

While studying the phenolic compounds found in a sparkling wine in an accelerated test, Bosch-Fusté et al. (2009) described an unidentified compound that showed a maximum UV absorption at 284 nm. They proposed it as a potential ageing and quality marker for Cava sparkling wine. The study showed that higher amounts of the unidentified compound were generated under reduced oxidative conditions, such as in Cava sparkling wine, rather than in high oxidative conditions. It was proposed that the unidentified compound could be generated from carbohydrates; fructose being the sugar causing the highest yield.

Furans are a group of compounds formed mainly by non-enzymatic reactions that involve sugar degradation (Cámara, Alves, & Marques, 2006; Cámara, Marques, Alves, & Silva Ferreira, 2004). These compounds have been found in wines (Ho, Hogg, & Silva, 1999; Pereira, Cacho, Cámara, & Marques, 2010), and some authors have correlated their presence with the length of ageing (Cámara et al., 2004; Cámara et al., 2006; Lavigne, Pons, Darriet, & Dubourdiou, 2008). These compounds show high specific absorption coefficients at 280 nm and generally their concentration increases gradually over time during food and beverage storage. These previously observations led us to infer that the unidentified compound (Bosch-Fusté et al., 2009) may be a furanic compound.

Here we sought to elucidate the structure of this potential ageing marker of Cava sparkling wine. For this purpose, we used the hyphenated analytical technique UHPLC-DAD-MS/MS and also NMR. Once the ageing marker had been identified, we measured its presence in 80 commercial sparkling wine samples by UHPLC-DAD.

\* Corresponding author. Tel.: +34 (0) 934020918; fax: +34 (0) 934035931.  
 E-mail address: [susanabuxaderas@ub.edu](mailto:susanabuxaderas@ub.edu) (S. Buxaderas).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling

Cava sparkling wines, manufactured following the traditional method (*Champenoise* method), were used for the elucidation of the unknown ageing marker. A set of commercial sparkling wines ( $n = 80$ ) were purchased in local supermarkets, coming from several Cava ( $n = 73$ ) and Champagne ( $n = 7$ ) brands, to assess the content of the potential ageing marker in commercial products. Once opened, all samples were degassed, at darkness, by magnetic stirring for 5 min and centrifuged at 4000g for 5 min at 4 °C and stored at -20 °C until analysis.

### 2.2. Chemicals

5-Hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) 99%, deuterated water 99.990% atom D, 3-(trimethylsilyl)propionic acid- $d_4$  sodium salt (TSP- $d_4$ ) and formic acid >98% were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Acetonitrile (HPLC grade) and ethanol absolute was obtained from Scharlau (Sentmenat, Europe), and was passed through a GHP membrane filter (0.2  $\mu\text{m}$ ) from Waters (Waters, Milford, MA, USA).

### 2.3. HMF identification

#### 2.3.1. UHPLC-DAD-MS/MS

Prior to chromatographic analysis, 2 ml of the sparkling wine samples and the 5-HMF standard solution was passed through a Waters (Waters, Milford, MA, USA) 13-mm PP filter (0.22- $\mu\text{m}$  pore size). The UHPLC chromatographic system consisted of an Acquity UPLC® (Waters, Milford, MA, USA), equipped with a photodiode array detector (DAD), an electrospray (ESI) as a source of ionisation, and a triple quadrupole mass spectrometer (TQD). The system was controlled by MassLynx 4.1 software (Waters, Milford, MA, USA).

Chromatographic separation was carried out with a BEH  $C_{18}$  Shield column (150  $\times$  1.0 mm id) with a particle size of 1.7  $\mu\text{m}$  (Waters, Milford, MA, USA), kept at 35 °C. Isocratic elution was performed with ACN:water:formic acid (5:94.9:0.1, v/v/v) at a flow rate of 0.120 ml/min. Sample vials on the injector were maintained at 4 °C; the injected volume was 2  $\mu\text{L}$ . Electrospray was operated in (+)ESI and (-)ESI modes. The source temperature was fixed at 140 °C; the desolvation temperature was 300 °C and the cone gas (nitrogen) flow rate was 350 L/h. In the (+)ESI mode the capillary and cone voltages were set at 3.5 kV and 15 V, while in (-)ESI mode they were -2.5 kV and -25 V, respectively. MS/MS experiments ("Daughter Mode") were performed using argon at a flow rate of 0.1 ml/min as collision gas and a collision energy of 15 V. Full scan spectra were acquired in the range  $m/z$  90–400, while product ion scans ("Daughter Mode") were performed in the range  $m/z$  40–130 for the precursor  $[M+H]^+$   $m/z$  127 and in the range  $m/z$  40–180 for the precursor  $[M-H]^-$   $m/z$  177, respectively.

MS/MS parameters for HMF were optimised by standard infusion, using the AutoTune software tool for testing the optimal values of cone voltage and collision energy.

#### 2.3.2. NMR analysis

Ultra-frozen wine samples were lyophilised to dryness using a FreeZone® PLUS™ 4.5 L Cascade (Labconco, Kansas City, Missouri, USA) at -42 °C.

The one-dimensional  $^1\text{H}$  NMR spectra of wine samples and HMF standard were acquired on a Varian Inova 500 NMR spectrometer using  $\text{D}_2\text{O}$  as solvent. Data acquisition was performed at 499.96 MHz proton frequency, at 25 °C, with an acquisition time of 2.05 s, a relaxation delay of 2 s, a 32 K time domain, and 128 transients.

Chemical shifts are reported with respect to external reference 3-(Trimethylsilyl)propionic acid- $d_4$  (TSP- $d_4$ ). MestReNova 6.0.2 software was used to acquire and process the NMR spectra.

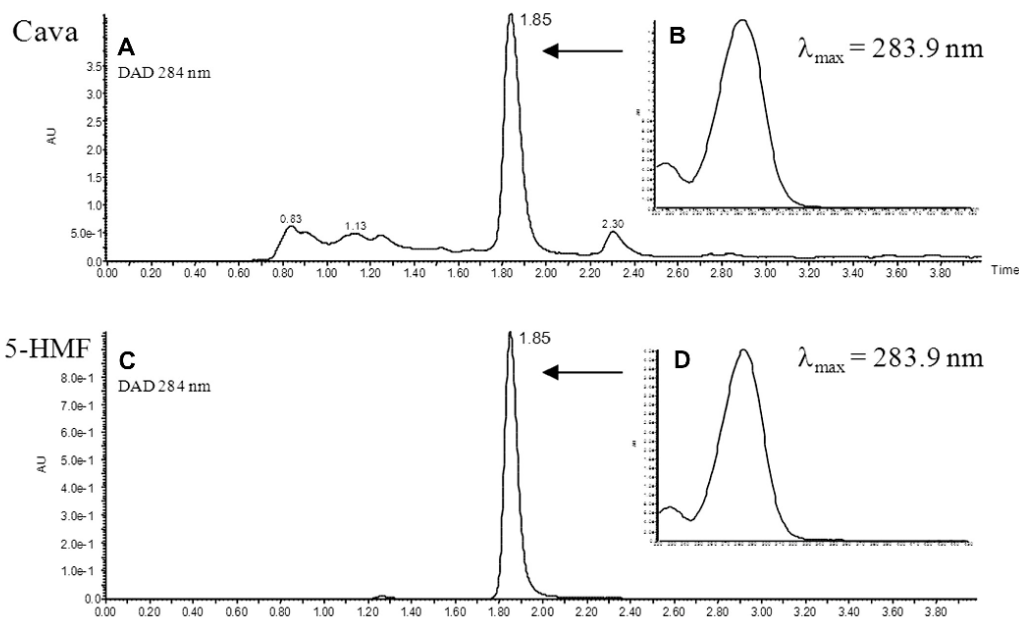


Fig. 1. UHPLC-DAD chromatogram (284 nm) and spectrum of Cava sparkling wine (A and B) and 5-HMF standard (C and D).

#### 2.4. HMF quantification

The UHPLC chromatographic system consisted of an Acquity UPLC<sup>®</sup> (Waters, Milford, MA, USA), with a binary pump and an auto-sampler, and equipped with a photodiode array detector (DAD, Waters 2996). The system was controlled by Empower Pro 2 (Waters, Milford, MA, USA). Chromatographic separation was carried out with a BEH C<sub>18</sub> column (50 × 1.0 mm id) with a particle size of 1.7 μm (Waters, Milford, MA), kept at 40 °C. Mobile phase consisted of eluent A as a solution of ACN:water:formic acid (2:97:1, v/v/v) and eluent B as a solution of ACN:water:formic acid (80:19:1, v/v/v). The mobile phase was passed through a 0.22-μm filter. Sample vials on the injector were maintained at 10 °C and the injected volume was 5 μL. Linear gradient conditions were as follows: 0'–0% B, 3'–20% B, 3.5'–100% B, 4'–0% B, 5'–0% B at a flow rate of 0.800 ml/min. Data were acquired with the Empower Pro 2 software. Chromatograms were monitored at 284 nm, while spectra were obtained by scanning from 220 to 370 nm with the resolution set at 2.4 and the sampling rate at 20 Hz. Two milliliters of the sparkling wine samples and the 5-HMF standard were passed through a Waters (Waters, Milford, MA, USA) 13-mm PP filter

(0.22 μm pore size). All samples were analysed in duplicate, and the calibration curve was made by diluting a stock solution (200 mg/L of 5-HMF) with the mobile phase solution and the appropriate ethanol to obtain a 12% of alcoholic solution. Quantification in the range between 0.2 and 15 mg/L was performed following an external calibration curve, at the concentrations of 0.2, 0.5, 1, 2, 8 and 15 mg/L (*n* = 3 each), using the least-squares method. Precision was obtained from the repeatability of six samples injected five times 1 day (intra-day-assay) and between 2 days (inter-day-assay). It is expressed as relative standard deviation (%RSD). Accuracy was evaluated by means of recovery assays. Three concentrations representing low, medium and high content (0.5, 1 and 2 mg/L) of 5-HMF were added to known amounts of sparkling wine. The percentage recoveries were evaluated by calculating the ratio of the amounts of 5-HMF detected to the amounts added. The sensitivity of the method was evaluated by determining the limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ). The standard stock solution was serially diluted with the initial mobile phase. The LOD and LOQ were determined by measuring the signal-to-noise ratio by injecting a series of solutions until the *S/N* ratio was 3 for LOD and 9 for LOQ. Linearity is

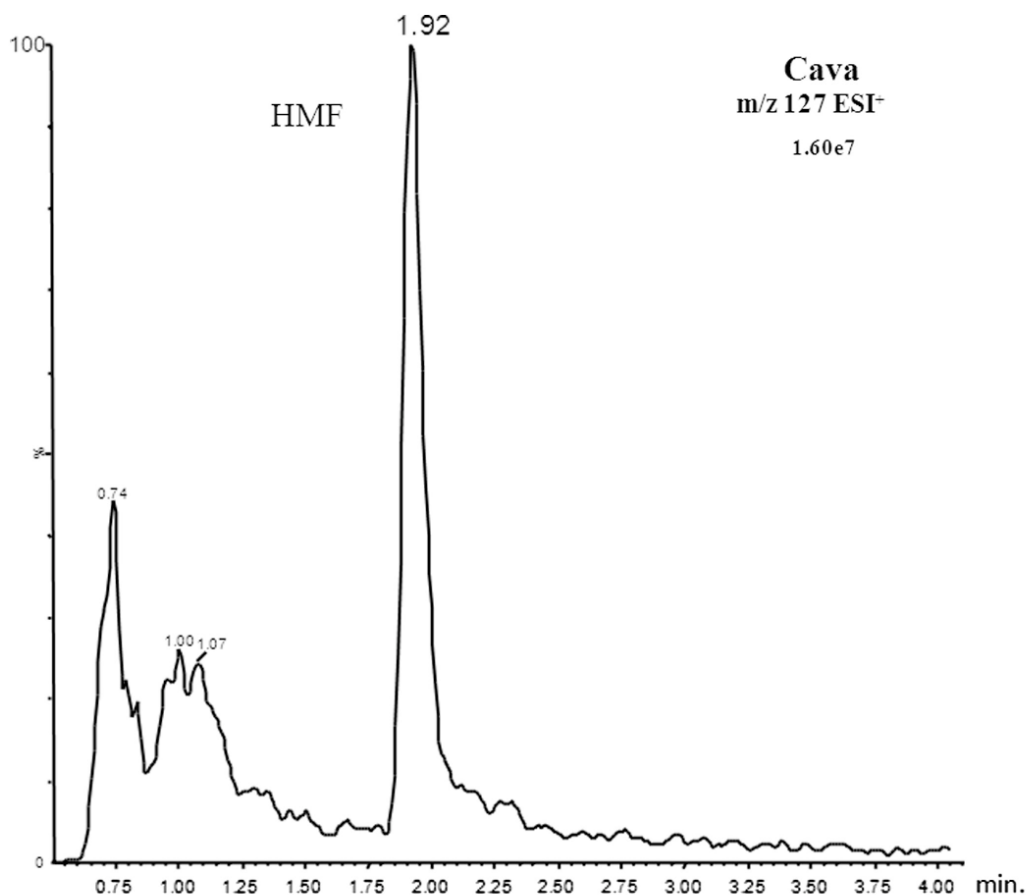


Fig. 2. UHPLC-MS(+)ESI (*m/z* 127) chromatogram of a sparkling wine sample. (Time delay of 0.07 min in the MS profile is due to the void space of the connection between DAD and MS detectors).



obtained from the determination coefficient of the calibration curve.

3. Results and discussion

3.1. UHPLC-DAD-MS/MS

Bosch-Fusté et al. (2009) reported a compound with a [M–H]<sup>–</sup> *m/z* 177, a maximum UV absorbance at 284 nm and an accurate molecular mass of 178.0398 Da as a potential ageing marker in Cava wines.

Under our conditions a considerable peak with a maximum of absorbance at 283.9 nm was detected at 1.85 min by UHPLC-DAD (Fig. 1A). The intensity and the UV–Vis spectrum of this peak (Fig. 1B) in Cava aged for different periods were consistent with the findings of Bosch-Fusté et al. (2009), suggesting that this peak was the same compound that they found. Notwithstanding, this compound did not show satisfactory ionisation with the (–)ESI mode while it produced a clear [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 127 when (+)ESI was performed (Fig. 2).

On the contrary, in Cava wines, a compound eluting at 1.55 mins ionised well in the (–)ESI mode, with a [M–H]<sup>–</sup> *m/z*

177, and daughter ions with *m/z* 59 (100%), *m/z* 73 (71%) and 159 (38%), but showed a maximum absorbance at 253 nm (data not shown). That UV–Vis spectral findings were not in agreement with those reported previously for the potential ageing marker or with the evolution of the absorbance at 284 nm observed in Cava samples during storage (Bosch-Fusté et al., 2009). So, we considered that the compound with a [M–H]<sup>–</sup> *m/z* 177 was not really the ageing marker, and its structure was no further investigated because it was considered out of the scopes of this study.

In an attempt to elucidate the molecular structure of the ageing marker that eluted at 1.85 min under our UHPLC-DAD-MS/MS chromatographic conditions, we checked various compounds with UV–Vis and molecular weights consistent with our observations. We observed that 5-HMF matched both the retention time and the UV–Vis spectra of the unidentified ageing marker (Fig. 1C and D). Furthermore, the (+)ESI full scan and MS/MS fragmentation spectra of the compound eluting at 1.85 min fitted those of the pure 5-HMF standard (Fig. 3A and B).

In our conditions, the MS/MS fragmentation patterns were in agreement with those previously reported for 5-HMF (Teixidó, Moyano, Santos, & Galceran, 2008), with main daughter ions at *m/z* 109, 80.9 and 52.9. The fragmentation (Fig. 3) could be ex-

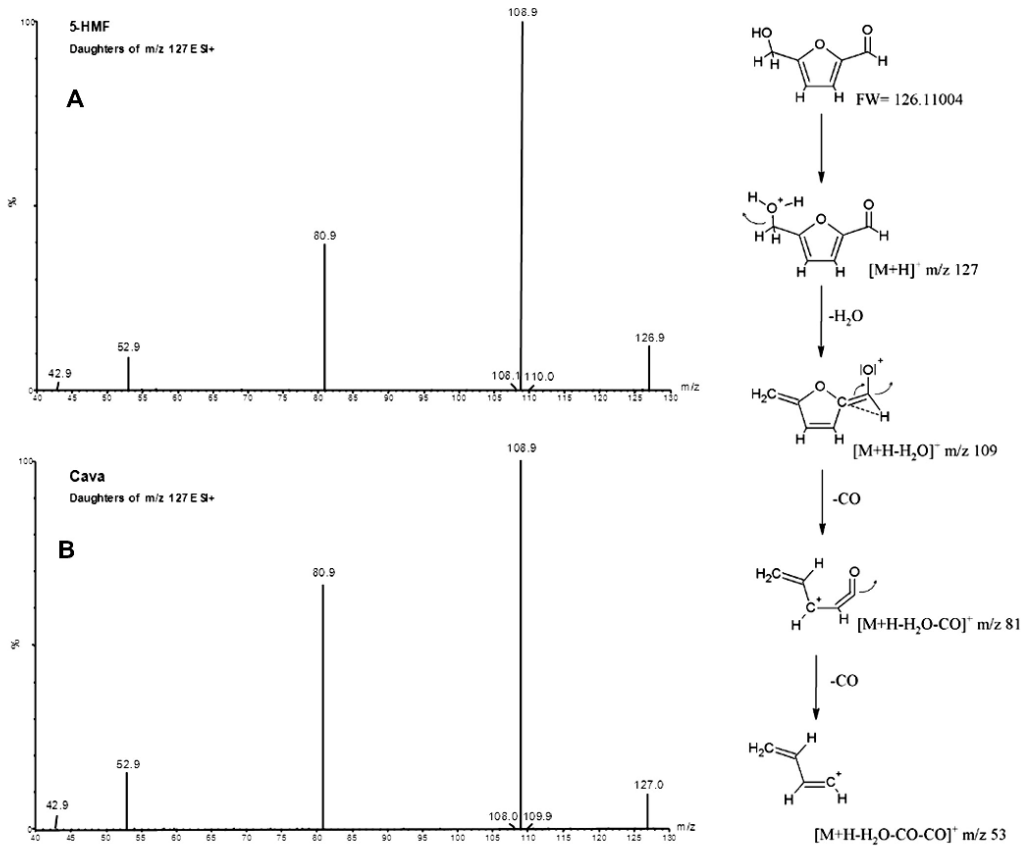


Fig. 3. MS/MS (+)ESI spectra of (A) 5-HMF standard, (B) target unidentified peak in a sparkling wine sample with *R*<sub>t</sub> = 1.85 minutes (DAD) and the potential MS/MS fragmentation of the compound.

plained by the loss of water  $[M+H-H_2O]^+$  ( $m/z$  109) and the successive losses of CO group  $[M+H-H_2O-CO]^+$  ( $m/z$  81) and  $[M+H-H_2O-CO-CO]^+$  ( $m/z$  53), being similar to the fragmentation described by Hu and Li (2011), for the furan 5-(diethoxymethyl)-2-furanmethanol.

### 3.2. NMR analysis

The NMR spectrum of the 5-HMF standard showed that this compound generates four peaks (Fig. 4). At 9.3 mg/L we observed a singlet from proton Ha, while the protons of the furanic ring ( $H_b$  and  $H_c$ ) provided two doublets at 7.4 and 6.55 mg/L respectively. Finally, there was another signal, which integrates two, at 4.58 mg/L as a result of the  $H_d$  protons.

Fig. 5 shows the NMR spectra of a sparkling wine sample overlaid on the spectrum of the same sample spiked with 5-HMF standard. The 5-HMF standard signals ( $H_a$ ,  $H_b$  and  $H_c$ ) matched the chemical shift and multiplicity of those in the Cava sample. Proton  $H_d$  signals are not suitable for identification purposes because they are masked due to the abundance of signals of other compounds in this region.

Thus, the NMR studies ratify the results found in the UHPLC-DAD-MS/MS analysis, thus confirming that the hitherto unidentified compound was 5-HMF.

### 3.3. UHPLC-DAD quantification

The response of the 5-HMF standard was linear within the concentration range tested (0.20 to 15 mg/L), with a correlation coefficient of  $r^2=0.9994$  and a peak-area ratio against the concentration curve of 42,100 (measured at 284 nm). The LOD and LOQ were 0.06 and 0.18 mg/L, respectively, while the mean recovery was between 96% and 98%. Good precision and accuracy was achieved as shown in Table 1.

### 3.4. Content of 5-HMF in wines

In the current study, 5-HMF was present between 0.25 and 12.81 mg/L in the 80 sparkling wines. This compound has also been reported in other types of wines, which are summarised in the Table 2 together with the results from our samples (expressed as minimum and maximum content founded). The concentration of 5-HMF varies greatly depending on the type of wine. The amount of 5-HMF found in our samples was lower than that found in other special wines, such as fortified wines, as reported in the bibliography (Table 2). No differences were observed between Cava and Champagne *brut* sparkling wines, while the two medium dry samples showed higher amounts.

There are several theories about the origin of 5-HMF in wines, but most authors believe that it comes from the dehydration of sugars, mainly fructose (Amerine, 1948; Clarke, Edey, & Eggleston, 1997; Villamiel, Del Castillo, & Corzo, 2006). Ketohexoses produce 5-HMF more efficiently and with greater selectivity than aldohexoses. This observation is attributed to the fact that the former enolizes to a much greater extent than the latter (Amarasekara, Williams, & Ebede, 2008; Shallenberger & Mattick, 1983). This finding is consistent with results from an accelerated test (Bosch-Fusté et al., 2009) using a set of various sugar solutions (fructose, glucose, mannose and sucrose). In that study was found that the largest amount of a compound, presumed to be 5-HMF, was obtained in the fructose solution.

Some authors attribute higher amounts of this furanic compound when sugar is abundant (Câmara et al., 2006; Shimizu & Watanabe, 1979), while others have not reported this correlation (Montilla Gómez, Olea Serrano, & García-Villanova, 1987a). In the case of Cava sparkling wines the sugar content may vary widely from *Brut Nature* (<3 g/L) to medium dry category (32–50 g/L). The pH of the alcoholic beverage could act as a catalyst, presenting upper yields of formation at lower pH, since dehydration is favoured (Es-Safi, Cheyner, & Moutounet, 2000; Montilla

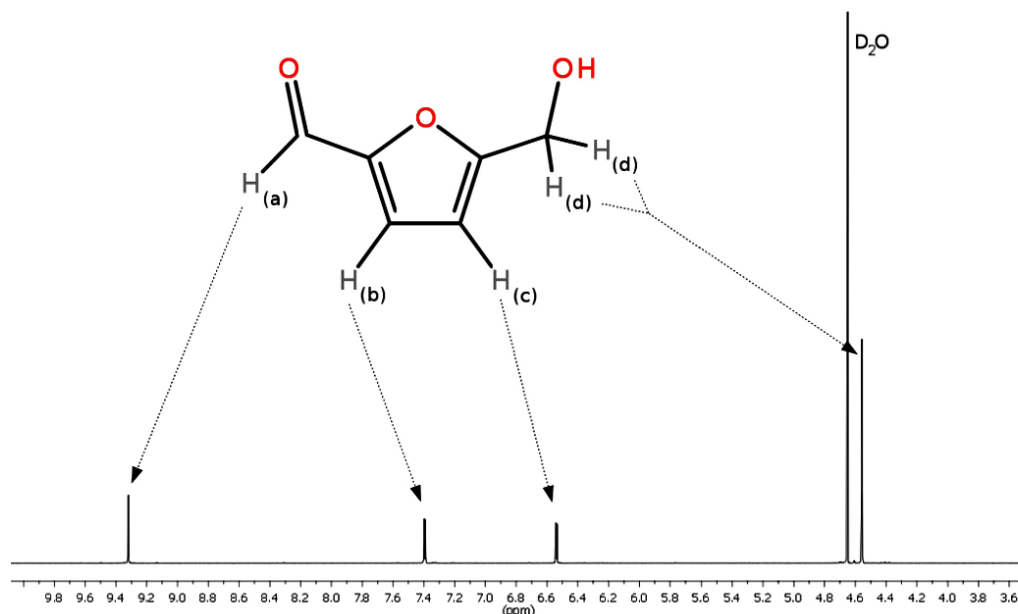


Fig. 4. NMR spectrum of 5-HMF standard.

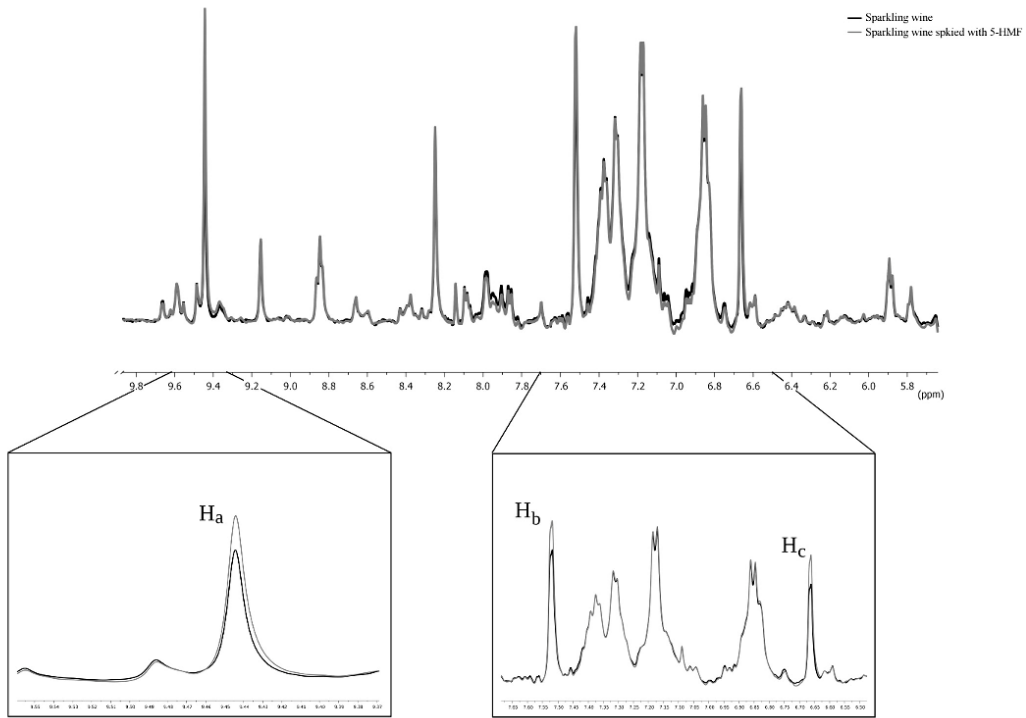


Fig. 5. Overlaid NMR spectra of the wine sample and the 5-HMF standard (reduced from 6 to 10 ppm region).

Table 1  
Precision (%RSD) and accuracy (%RE) of the method.

Wine	Within day (n = 5)				Between day (n = 10)			
	Mean (mg/L)	% RSD	Added (mg/L)	% RE	Mean (mg/L)	% RSD	Added (mg/L)	% RE
1	0.37	3.98	0.5	98	0.36	4.75	0.5	98
			1	94			1	94
			2	91			2	94
2	0.46	4.35	0.5	101	0.50	9.94	0.5	102
			1	101			1	102
			2	94			2	95
3	0.54	5.3	0.5	94	0.53	4.96	0.5	96
			1	90			1	94
			2	93			2	94
4	0.71	3.27	0.5	106	0.73	4.44	0.5	107
			1	94			1	96
			2	95			2	99
5	1.99	3.31	0.5	97	2.00	3.20	0.5	97
			1	98			1	98
			2	95			2	96
6	2.50	2.38	0.5	107	2.54	5.20	0.5	106
			1	106			1	105
			2	100			2	101

Gómez, Olea Serrano, & García-Villanova., 1987b; Shallenberger & Mattick, 1983; Villamiel et al., 2006). Time is another factor to be considered, as long as the formation would not be immediate, but with a determined kinetics (Chen, Huang, Liu, Peng, & Huang, 2010; Shimizu & Watanabe, 1979). Càmara et al. (2006) proposed

5-HMF as an ageing marker for Madeira wines and also indicated that wines with a higher alcohol content produce greater amounts of 5-HMF (Table 2). Given the differences between the manufacture and ageing of sparkling wines and other special wines, further studies are required to explain the mechanisms and factors

**Table 2**  
Comparison of 5-HMF concentration in various types of wines as reported in the literature.

Work	Type of wine	Sugar	No. samples	Concentration (mg/L)
A	Madeira	Sweet	26	2.9–74.3
	Madeira	Medium sweet	22	5.7–100.3
	Madeira	Dry	17	1.2–39.1
	Madeira	Medium dry	21	0.7–46.6
B	Sherry	Sweet	3	598–1245
	Sherry	Sweet	1	428
	Sherry	Sweet	2	174–184
	Sherry	Sweet	4	27.4–342
	Sherry	Medium	8	84–598
	Sherry	Dry	1	36
	Sherry	Dry	3	37–152
	Sherry	Dry	2	tr <sup>b</sup> –72
C	Port	–	4	tr <sup>b</sup> –168.7
	Sherry	–	1	86.8
	Madeira	–	1	361.0
	Tokay	–	2	19.5–42.9
	Banyuls	–	2	tr <sup>b</sup> < 162.4
This study	Cava	Brut	27	0.30–2.04
	Cava	Brut nature	43	0.26–57
	Cava	Medium dry	2	5.00–12.81
	Champagne	Brut	7	0.25–2.15
	Charmat	Brut nature	1	0.85

A: (Câmara et al., 2006); B: (Montilla Gómez et al., 1987a); C: (Ho et al., 1999).

Abbreviation trace: tr<sup>a</sup> < 1.5 mg/L; tr<sup>b</sup> < 0.005 mg/L.

responsible for 5-HMF formation and evolution during Cava sparkling wine production and storage.

#### 4. Conclusion

Our UHPLC-DAD-MS/MS and NMR analyses confirmed the presence of 5-HMF in sparkling wines. The use of several analytical techniques has allowed the identification of this compound on the basis of retention time (compared with the standard), UV-Vis spectrum, the MS/MS fragmentation and NMR spectroscopy. The ionisation of 5-HMF is greater using the (+)ESI mode, although for quantification purposes and quality control UV detection is suitable.

To the best of our knowledge, this is the first time that the presence of 5-HMF has been reported in sparkling wine. The concentration of this compound in our samples ranged between 0.25 and 12.81 mg/L. Further research on the role of sugar content, time and temperature of storage is required in order to consider the usefulness of 5-HMF as a marker during shelf-life.

#### Acknowledgements

This study was made possible thanks to financial assistance from the *Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología* (CICYT) (Spain) AGL2008-03392 and AGL2011-23872, from the *Generalitat de Catalunya*, Project 2009SGR-606 and *EvalXarta* 2010 (No. 12). The Ph.D. student Arnau Serra was awarded a grant from the *Universitat de Barcelona* (UB-APIF).

#### References

- Alexandre, H., & Guillouix-Benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine – A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 119–127. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x>.
- Amarasekara, A. S., Williams, L. D., & Ebade, C. C. (2008). Mechanism of the dehydration of d-fructose to 5-hydroxymethylfurfural in dimethyl sulfoxide at 150 °C: An NMR study. *Carbohydrate Research*, 343(18), 3021–3024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2008.09.008>.

- Amerine, M. A. (1948). Hydroxymethylfurfural in California wines. *Journal of Food Science*, 13(3), 264–269. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1948.tb16621.x>.
- Bosch-Fusté, J., Sartini, E., Flores-Rubio, C., Caixach, J., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2009). Viability of total phenol index value as quality marker of sparkling wines, «cavas». *Food Chemistry*, 114(3), 782–790. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.013>.
- Câmara, J. S., Alves, M. A., & Marques, J. C. (2006). Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2), 188–197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.031>.
- Câmara, J. S., Marques, J. C., Alves, M. A., & Silva Ferreira, A. C. (2004). 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone levels in fortified Madeira wines: Relationship to sugar content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6765–6769. <http://dx.doi.org/10.1021/jf049547d>.
- Chen, L., Huang, H., Liu, W., Peng, N., & Huang, X. (2010). Kinetics of the 5-hydroxymethylfurfural formation reaction in Chinese rice wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3507–3511. <http://dx.doi.org/10.1021/jf904094q>.
- Clarke, M. A., Edye, L. A., & Eggleston, G. (1997). Sucrose decomposition in aqueous solution, and losses in sugar manufacture and refining. In D. Horton (Ed.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Vol. 52, pp. 441–470). Academic Press.
- Es-Safi, N. E., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). Study of the reactions between (+)-catechin and furfural derivatives in the presence or absence of anthocyanins and their implication in food color change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 5946–5954. <http://dx.doi.org/10.1021/jf000394d>.
- Ho, P., Hogg, T. A., & Silva, M. C. M. (1999). Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. *Food Chemistry*, 64(1), 115–122. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00115-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00115-0).
- Hu, X., & Li, C.-Z. (2011). Levulinic esters from the acid-catalysed reactions of sugars and alcohols as part of a bio-refinery. *Green Chemistry*, 13(7), 1676–1679. <http://dx.doi.org/10.1039/c1gc15272f>.
- Lavigne, V., Pons, A., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2008). Changes in the sotolon content of dry white wines during barrel and bottle aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2688–2693. <http://dx.doi.org/10.1021/jf072336z>.
- Montilla Gómez, J., Olea Serrano, F., & García-Villanova (1987a). Determinación espectrofotométrica de furfural y 5-hidroximetilfurfural en vinos de Jerez, previa formación de la correspondiente tiosemicarbazona. *Anales de Bromatología*, 39(2), 211–218.
- Montilla Gómez, J., Olea Serrano, F., & García-Villanova (1987b). Determinación espectrofotométrica de furfural y 5-hidroximetilfurfural en vinos de Huelva, previa formación de la correspondiente tiosemicarbazona. *Anales de Bromatología*, 39(2), 263–269.
- Official Journal of the European Union, Commission Regulation (EC). (2009). 52 L193 § Regulations.
- Pereira, V., Cacho, J., Câmara, J. S., & Marques, J. C. (2010). HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. *Journal of Separation Science*, 33(9), 1204–1215. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200900784>.

- Riu-Aumatell, M., Bosch-Fusté, J., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2006). Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. *Food Chemistry*, *95*(2), 237–242.
- Shallenberger, R. S., & Mattick, L. R. (1983). Relative stability of glucose and fructose at different acid pH. *Food Chemistry*, *12*(3), 159–165. [http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(83\)90002-X](http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(83)90002-X).
- Shimizu, J., & Watanabe, M. (1979). Gas chromatographic analysis of furfural and hydroxymethyl-furfural in wine. *Agricultural and Biological Chemistry*, *43*(6), 1365–1366.
- Teixidó, E., Moyano, E., Santos, F. J., & Galceran, M. T. (2008). Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. *Journal of Chromatography A*, *1185*(1), 102–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.057>.
- Torrens, J., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2010). Assessment of volatile and sensory profiles between base and sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(4), 2455–2461. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9035518>.
- Villamiel, M., Del Castillo, M. D., & Corzo, N. (2006). Browning reactions. In Y. H. Hui, W.-K. Nip, L. M. L. Nollet, G. Paliyath, & B. K. Simpson (Eds.), *Food biochemistry and food processing*. Wiley-Blackwell.

## **4.2 Enfosquiment dels Cava durant la rima i en període comercial: ús del 5-HMF com a marcador de qualitat.**

A. Serra-Cayuela, M. Riu-Aumatell, S. Buxaderas, E. López-Tamames. Browning during biological aging and commercial storage of Cava sparkling wine and the use of 5-HMF as a quality marker. *Food Research International* 2013 53(1) p.226-231 doi:10.1016/j.foodres.2013.04.010

### **Resum:**

Aquest estudi es va realitzar amb un doble objectiu: conèixer l'evolució de l'enfosquiment i dels compostos relacionats durant la rima i durant el període comercial per tal de veure si la presència de les mares de segona fermentació influïa en aquest procés, i en segon terme avaluar el 5-HMF com a marcador de qualitat.

Per dur-ho a terme, es va dissenyar un mostreig amb dues series de Cava dels dos períodes (rima i comercial) en paral·lel, durant quasi bé dos anys. Totes els vins van ser conservats en les mateixes condicions, és a dir, en un celler a 16 °C.

Per tal de mesurar l'enfosquiment es va emprar la mesura de l'absorbància a 420 nm ( $A_{420}$ ), ja que és el clàssic paràmetre

enològic que utilitzen les bodegues. En ambdós períodes es va observar un augment lineal amb el temps (1 mUA/mes). Tot i això, en el cas dels vins comercials, existia una disminució de l'enfosquiment en els primers mesos, fet que va ser atribuït a l'addició del SO<sub>2</sub> amb el licor d'expedició. Aquest efecte blanquejant provocaria una disminució ràpida de l'enfosquiment, però no tindria un efecte important en la cinètica de formació durant el següents mesos d'emmagatzematge. No es van trobar diferències significatives entre ambdós períodes pel que fa a l'enfosquiment fet que ens va fer concloure que les mares no tenen un paper destacat en aquest procés, i seria el temps el factor clau.

Per altra banda, i tenint en comptes que molts autors associen el fenomen de l'enfosquiment a l'oxidació dels compostos fenòlics, aquests també van ser estudiats. Es va observar que en global (mesurat a partir del mètode espectromètric de Folin-Cicolteu) no variava ni durant la rima ni en període comercial. En el cas dels compostos fenòlics individuals es va veure com hi havia una evolució i correlació amb l'enfosquiment diferent segons el període. En el cas de la rima, l'àcid protocatecuic i el tirosol, l'àcid *trans*-cutàric i l'àcid *p*-cumàric, van ser els compostos que van tenir un augment significatiu durant l'envelliment. Pel que fa al període comercial aquests van ser l'àcid caftaric, GRP, *trans*-cutàric, *p*-cumàric i *cis*-cutàric, essent aquest últim l'únic que disminuïa en el temps. Així mateix es va observar que existien reaccions d'isomerització entre el *cis*-cutàric i *trans*-cutàric així com hidròlisi a compostos no esterificats com el *p*-cumàric.

En la segona part de l'estudi, es va avaluar la relació del 5-HMF amb l'enfosquiment i el seu potencial com a marcador de qualitat. Es va observar com aquest compost incrementava amb el temps de forma lineal amb un percentatge d'augment i coeficient de correlació superior a qualsevol compost fenòlic. Tant és així, que el model amb els fenols i el 5-HMF per predir l'enfosquiment, només aquest últim va ser significatiu. La mesura de 5-HMF té menor variabilitat que el paràmetre  $A_{420}$ , i també va mostrar major capacitat discriminant entre categories (períodes de rima: Cava, Reserva i Gran Reserva) que el paràmetre  $A_{420}$ . Així doncs, es proposa el 5-HMF com a marcador de qualitat.

Resultats concrets:

- Tant durant la rima com en període comercial els vins evolucionen i, per tant, augmenta l'enfosquiment. L'augment és lineal, sent el seu ràtio de 1 mUA/mes
- El temps és el factor amb major importància per l'evolució de l'enfosquiment, mentre que el paper de les mares no es va provar que fos significatiu.
- L'àcid *trans*-cutàric o l'àcid *p*-cumàric són els únics que van correlacionar significativament, en ambdós períodes amb el temps (rima o comercial) i l'enfosquiment.
- El 5-HMF és un compost amb unes característiques adequades per ser emprat com a marcador de qualitat.



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Food Research International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)

## Browning during biological aging and commercial storage of Cava sparkling wine and the use of 5-HMF as a quality marker



A. Serra-Cayuela, M.A. Aguilera-Curiel, M. Riu-Aumatell\*, S. Buxaderas, E. López-Tamames

Departament de Nutrició i Bromatologia, Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments (XaRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Campus de l'alimentació de Torribera, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 November 2012

Accepted 19 April 2013

Available online 26 April 2013

#### Keywords:

Browning

Aging

Sparkling wine

5-Hydroxymethylfurfural

Storage

Lees

### ABSTRACT

The quality of sparkling wines can deteriorate due to browning, which is mainly attributed to the oxidation of phenols. The aim of this study was to assess the browning (measured as the absorbance at 420 nm) of two real series of Cava sparkling wines (A and B) during aging *sur lie* (biological aging, with lees) and commercial storage (without lees) under real conditions, over almost two years, since lees may reduce the effect by adsorbing the precursors and the browning compounds. The role of phenolics and 5-HMF (5-hydroxymethylfurfural) was also assessed. A significant linear increment in browning was observed in all four Cava series in both kinds of aging. No differences in browning were observed between the two types of aging (biological vs. commercial storage). In contrast, the 5-HMF content increased linearly with time although its rate of formation was dependent on the type of aging (biological or storage). The phenolic compounds *trans*-coutaric and *p*-coumaric increased significantly with time and were significantly correlated with browning. The most aged sparkling wines (*Gran Reserva*) had highest  $A_{420}$  and 5-HMF values. 5-HMF was correlated with browning and can be used as a quality marker.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cava is a high-quality sparkling wine produced using a traditional method whereby a base wine is re-fermented in a sealed bottle. Wines must be in contact with lees under anaerobic conditions for at least 9 months in the bottle for them to achieve Cava status (Official Journal of the European Union, Commission Regulation (EC), 2009, sec. Regulations).

The term *Reserva* applies to wines that have been kept in contact with the lees for at least 15 months, while *Gran Reserva* refers to wines that have been kept in contact with the lees for at least 30 months, both involving the second fermentation process. Wine is a dynamic product in terms of its physicochemical and sensory properties and undergoes many transformations that begin just after grape crushing, and continue during the winemaking process, fermentations and throughout aging and storage. Together with aroma, color is a significant characteristic of white wines and its deterioration is recognized by consumers. Once the bottle has been sealed, browning can no longer be corrected. Thus, it is important for wineries to optimize the aging of the wines and understand how the wine develops during both the aging process and its subsequent commercial storage (shelf-life). The oxidation of phenolic compounds

is believed to be the main contributing factor in the browning process (Cheynier, Masson, Rigaud, & Moutounet, 1993; Li, Guo, & Wang, 2008; Singleton, 1987) and it is widely accepted that there are two main mechanisms: enzymatic and non-enzymatic (Li et al., 2008; Oliveira, Ferreira, De Freitas, & Silva, 2011). The former occurs mostly when grape must is obtained and is associated with polyphenol oxidase (PPO), the activity of which increases in the presence of O<sub>2</sub> and inhibited in the presence of SO<sub>2</sub> and ethanol (Ribéreau-Gayon, Dubourdie, Donèche, & Lonvaud, 2006). In contrast, non-enzymatic browning in wine may arise from the chemical oxidation of phenols and the subsequent polymerization of the oxidized products (Li et al., 2008; Oliveira et al., 2011; Waterhouse & Laurie, 2006). However, it has also been reported that in a white model wine and in white wine supplemented with catechin and epicatechin, xanthylum salts (yellow-orange) are formed over time due to the reaction of flavanols and aldehydes such as glyoxylic acid (Es-Safi, Le Guernevé, Cheynier, & Moutounet, 2000; Maury, Clark, & Scollary, 2010) or furfurals (Nonier, Vivas, Vivas de Gaulejac, Pianet, & Fouquet, 2007). Although most authors attribute browning to the presence of phenols (Oliveira et al., 2011; Waterhouse & Laurie, 2006), it is difficult to clarify which compounds are involved in this phenomenon due to the large quantity of different substances present in wine, such as proteins, amino acids and reducing sugars, and the potential interactions between these substances (Li et al., 2008; Zoecklein, 1995).

Browning has already been studied in white and specialty wines as well as in accelerated tests (Bosch-Fusté et al., 2009;

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

Ibern-Gómez et al., 2000; Kallithraka, Salacha, & Tzourou, 2009; Lopez-Toledano, Mayen, Merida, & Medina, 2006). Sparkling wines have a lower oxygen content than white wines due to the overpressure produced by CO<sub>2</sub>, which inhibits the entrance of oxygen. In addition aging takes place while in contact with lees, which is not common in white wines. Ibern-Gómez et al. (2000) studied the development of browning during biological aging in Cava from different *coupages*, and the observed increase was thought to be associated with the oxidation of phenolic compounds such as caftaric acid. However, in studies of wines undergoing biological aging, other authors state that the wall of the yeast is capable of adsorbing compounds from the wine (Del Barrio-Galán, Pérez-Magariño, Ortega-Heras, Williams, & Doco, 2011; Mazauric & Salmon, 2005) and thus the precursors or the actual compounds that are responsible for the browning (Razmkhab et al., 2002). According to these authors, the lees should inhibit browning. However, an accelerated study of Cava sparkling wines showed an increase in browning over time (Bosch-Fusté et al., 2009), though real sparkling wine is not monitored during commercial storage. The difference between biological aging and aging during commercial storage is dependent on the fact that during biological aging the wine is in contact with the lees, while prior to commercial storage, the lees are removed – following the dosage step – and sugar and sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) are added. SO<sub>2</sub> is an antioxidant and an antimicrobial compound that is generated during the fermentation process by the *Saccharomyces cerevisiae* yeast present in the wine, though most of it is added with the *liqueur d'expédition* to regulate the growth of harmful yeast and bacteria (Oliveira et al., 2011). It has been reported that this substance interacts with compounds involved in the browning process (Danilewicz, Seccombe, & Whelan, 2008; Li et al., 2008).

Absorbance at a wavelength of 420 nm is a measure of the intensity of yellow coloring in white wine, and has previously been used as a parameter for measuring the browning of white wines (Singleton & Kramlinga, 1976; Zoeklein, 1995). However, Cava sparkling wines are mainly produced from a *coupage* of base wines of Macabeu, Xarel·lo and Parellada cultivars. These white grape varieties tend to give a pale and straw-yellow Cava (Buxaderas & López-Tamames, 2003), and thus absorbance and other parameters used to estimate browning are too low to be of use. Thus, an alternative quality marker would be useful for Cava producers. In their accelerated study, Bosch-Fusté et al. (2009) observed a linear increase in a particular substance with time. This compound has been identified as 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), which is a classic product of the Maillard reaction; however, in the case of sparkling wines it is probably formed from the multiple dehydration of hexoses and ketopentoses (Pereira, Albuquerque, Ferreira, Cacho, & Marques, 2011). HMF has previously been used as a browning marker and indicator of inadequate storage in various foodstuffs such as honey, jam, fruit juices and milk (Gaspar & Lucena, 2009; Rada-Mendoza, Sanz, Olano, & Villamiel, 2004; Teixidó, Moyano, Santos, & Galceran, 2008). In a wine medium, this aldehyde can polymerize with phenols to produce brown compounds (Nonier et al., 2007).

In this study, two different real Cava series were monitored during biological aging (*sur lie* A and B series) and during shelf-life storage (A and B series). The aim of this study was to assess browning by means of absorbance at a wavelength of 420 nm in real sparkling Cava wines over time and under constant cellar conditions at a temperature of 16 °C. The trends observed during biological aging and during commercial storage were compared, by means of browning and phenol content. To the best of our knowledge, no other study has compared the browning of real sparkling wine samples during biological aging and storage. Furthermore, the development of 5-HMF at both stages was studied to determine whether this furfural can be used as an aging marker and also to determine its involvement in the browning process.

## 2. Material and methods

### 2.1. Standards and reagents

5-Hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF, 99%), formic acid, gallic acid, protocatechuic acid, tyrosol, caftaric acid, caffeic acid, catechin, *p*-coumaric and potassium metabisulfite were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Scharlau (Sentmenat, Spain) and was passed through a GHP membrane filter (0.22 µm) from Waters (Milford, Milford, MA, USA). Folin-Ciocalteu reagent, sodium carbonate anhydrous, ethanol (PA) and sulfuric acid 1/3 (w/v), starch solution 2% and iodine (0.01 M) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

### 2.2. Samples

A parallel study was designed to compare biological aging and commercial storage (Fig. 1). For this purpose, 500 bottles of 750 mL of two different quality blends (A and B) of white wines from the Macabeu, Xarel·lo and Parellada white grape variety were bottled after adding the "*liqueur de tirage*". This liqueur was mixed with the base wines, giving around 1–2 × 10<sup>6</sup> yeast cells mL<sup>-1</sup> (yeast starter), 22–24 g of sucrose L<sup>-1</sup> and 0.04 g L<sup>-1</sup> per bottle of calcium bentonite (Bentosan, acquired from Gon-Cruz S.L., La Rioja, Spain). All processes were conducted on an industrial scale at the Freixenet S.A. winery employing the traditional method. The yeast employed was the F5 from the Freixenet S.A. wineries private selection. Yeast was conditioned following the steps employed for the industrial conditions of the winery, including several stages for acclimatization to the alcoholic medium. Following the second fermentation, and after 9 months in contact with the lees (minimum legal time required to be considered Cava), 40 bottles were sampled. Half of the bottles (n = 20) were disgorged in order to remove the lees, and afterwards the *liqueur d'expédition* (mainly SO<sub>2</sub> and sugars) was added to produce commercial sparkling wine. The dosage operation was performed using the triblock gravity filling and corking Perrier GCD 3112 system, to all bottles at the same time. The resulting liqueur contained wine, sucrose and the correct amount of sulfite to ensure adequate hygiene quality during storage; the initial contents are shown in Table 1. At this point (coded as zero), four bottles of the biologically aged wine (two of wine A and two of wine B) and the same number of commercially stored bottles were opened and frozen. The remaining bottles were stored under cellar conditions (16 °C) and at 4, 8, 12 and 21 months the same operation was performed. In summary (Fig. 1), there were thus four series with five sampling points (0, 4, 8, 12 and 21 months); two corresponding to the biological aging period (after 9 months) and two during commercial storage. During biological aging bottles were sealed with a plastic bidule and a crown cap, while after disgorging a commercial conglomerate stopper with two natural cork disks was employed. Within each aging type (biological and commercial), half of the bottles contained a blend of white wines, and the other half a different white base wine (series A and B respectively).

Table 1 shows the main physical and chemical characteristics of these sparkling wines. In order to remove the lees and to degas the product, the biologically aged wines were centrifuged at 4 °C for 15 min at 1410 g (Rotina 48CR, Tuttingen, Germany), and the supernatant was then placed in a 250 mL amber flask. Commercial sparkling wines were also degassed. All samples were stored at –20 °C until analysis.

### 2.3. Analytical procedures

#### 2.3.1. General parameters

Absorbance at 420 nm was measured using a 10 mm path length quartz cuvette and the total phenol (TP) content was determined using the Folin-Ciocalteu method. The free and the total SO<sub>2</sub> composition were measured using the Ripper test, as described in the Compendium

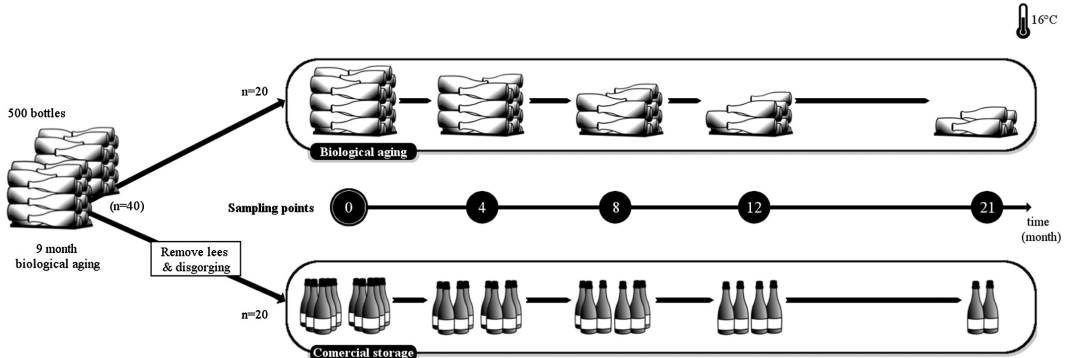


Fig. 1. Sampling scheme. A parallel study of the evolution of sparkling wines during biological aging and commercial storage. Sampling was performed at 0, 4, 8, 12 and 21 months, with two bottles of each wine (A and B) sampled at each point for each type of aging (biological and commercial).

of International Methods of Analysis (Organization International de la Vigne et du Vin, 2012). TP is expressed as mg of gallic acid equivalents per liter of wine ( $\text{mg L}^{-1}$  GAE). To determine the absorbance at 420 nm, wine samples were first filtered through cellulose filters and the values were multiplied 1000-fold. A Shimadzu® UV-3600 spectrophotometer (Duisburg, Germany) was used and all samples were analyzed in duplicate.

2.3.2. HMF and phenol quantification. UHPLC-DAD

Quantification of 5-HMF was performed as follows: 5  $\mu\text{L}$  of the sample was injected into a UHPLC system (Waters, Milford, MA) using a BEH C<sub>18</sub> column ( $50 \times 1.0 \text{ mm} \times 1.7 \mu\text{m}$ ), coupled to a DAD detector. Detection was achieved at the maximum absorption wavelength of each compound. The mobile phase consisted of eluent A as a solution of acetonitrile/water/formic acid (2:97:1, v/v/v) and eluent B as a solution of acetonitrile/water/formic acid (80:19:1, v/v/v). Linear gradient conditions were as follows: 0'–0% B, 3'–20% B, 3.5'–100% B, 4'–0% B, 5'–0% B at a flow rate of 0.800 ml/min. Quantification was carried out by using an external calibration curve for each standard, or standards of the same family when not available. All samples were analyzed in duplicate.

2.4. Statistical analysis

Pearson correlation was employed to determine the correlation between the variables  $A_{420}$ , 5-HMF, phenols and time. Significant relationships were determined by the Analysis of Covariance (ANCOVA) using the General Linear Model (GLM) to compare the

slopes of the two types of aging (*sur lie* or commercial storage) and to establish their kinetics according to base wine (A or B), while time was treated as a co-variable.

A Multiple Regression was performed to assess the ability of 5-HMF, and *trans*-coutaric, and *p*-coumaric acids to predict and evaluate the contribution to the browning ( $A_{420}$  values). The Akaike information criterion was used to select the significant predictors for the model.

In the case of biological aging (*sur lie*), Analysis of Variance (ANOVA) was employed to determine the 95% confidence region of 5-HMF and  $A_{420}$  according to the quality of the sparkling wines Cava (>9 months), *Reserva* (>15 months) and *Gran Reserva* (30 months).

Differences were considered significant when  $P < 0.05$ . Version 2.14 of the R package (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, Europe) was used for all statistical analyses and graphical issues.

Table 1 Physicochemical characteristics of the sparkling wines at initial point (9 months of aging).

	A aging	A storage	B aging	B storage
pH	3.02	3.02	3.02	3.03
Total sugar content ( $\text{g L}^{-1}$ )	0.21	9.8	0.71	10.2
Alcohol content (% vol)	11.62	11.59	11.72	11.68
Overpressure (bar)	7.1	6.2	7.1	6.2
Titratable acidity ( $\text{g L}^{-1}$ )	3.73	3.74	3.58	3.56
Citric acid ( $\text{g L}^{-1}$ )	0.21	0.20	0.19	0.20
Malic acid ( $\text{g L}^{-1}$ )	0.93	0.90	0.54	0.63
Lactic acid ( $\text{g L}^{-1}$ )	0.57	0.49	0.53	0.42
Free sulfite ( $\text{mg L}^{-1}$ )	<sup>a</sup>	9	<sup>a</sup>	8
Total sulfite ( $\text{mg L}^{-1}$ )	70	118	50	100

<sup>a</sup> Below the limit of quantification.

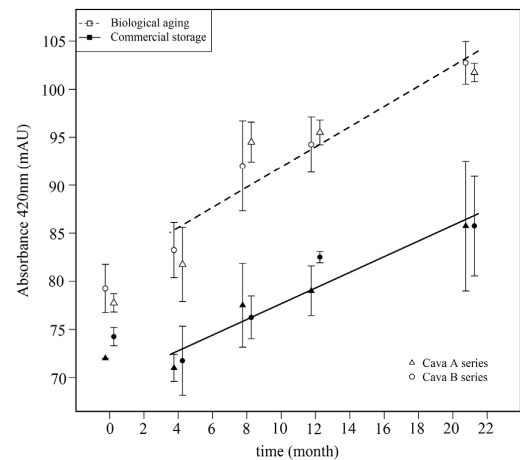


Fig. 2. Development of browning during biological aging and commercial storage, expressed as the mean and standard deviation ( $n = 4$ ) of the two Cava series A and B. The fitted linear regression lines for both Cava types (biological aging and commercial storage) are all presented.

**Table 2**

GLM results of the development of browning (without the dosage point coded as zero) *t*-coutaric acid, *p*-coumaric acid and HMF. Browning ( $A_{420}$ ), is expressed as mAU and time (*t*) in months. HMF and *p*-coumaric are expressed as  $\text{mg L}^{-1}$ , and *t*-coutaric in equivalents of *p*-coumaric.

Aging	Model	n	R <sup>2</sup>	P
Browning	Biological	32	0.786	<0.05
	Storage			
<i>t</i> -Coutaric	Biological	40	0.690	<0.05
	Storage			
<i>p</i> -Coumaric	Biological	40	0.418	<0.05
	Storage			
5-HMF	Biological	40	0.956	<0.05
	Storage			

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Browning development

The development of browning, expressed as the absorbance at 420 nm ( $A_{420}$ ), during the two types of aging (biological aging and commercial storage) was compared (Fig. 2). After 9 months of biological aging half of the bottles of Cava types A and B were opened, the lees were removed and the *liqueur d'expédition* was added (commercial storage). The others were allowed to continue the biological aging process. Thus, we compared the development of browning of the same sparkling wine (A and B) under two different processes i.e. aging with lees (biological aging) and commercial storage (Fig. 1). In both aging conditions a linear increase in browning was observed over time. No differences were found in the  $A_{420}$  formation ratio between the two Cava series (A and B) according to ANCOVA. Both series were therefore combined, however, as Fig. 2 shows, a decrease was observed during the first 4 months in the commercial wines (storage A and B). This decrease in browning during the first 4 months in the commercial storage samples (Fig. 2) may be associated with the addition of  $\text{SO}_2$  when the *liqueur d'expédition* was added (Table 1) as this would bleach any colored compounds (Jackson & Jackson, 2008; Nonier, Vivas, de Gaulejac, Absalon, & Vitry, 2010). The bleaching effect is estimated to produce a reduction of 8 mAU, which equates to approximately 11% of the initial value. Due to this bleaching effect, the initial point (coded as time zero) was omitted when performing the regression models

(Table 2) and statistical comparisons. There were not statistical differences ( $P < 0.05$ ) found between samples from the two aging types according to ANCOVA, so a pooled model was constructed for both types resulting in the rate of browning of 1 mAU/month. The point of interception in the model differed between processes ( $P < 0.05$ ), as shown by the different elevations of the regression slopes shown in Fig. 2. Thus, commercial wines had lower  $A_{420}$  values, probably due to the bleaching effect of  $\text{SO}_2$ . However, there was no further effect of  $\text{SO}_2$  on browning kinetics. In the case of biological aging, the free sulfite was always below the limit of quantification ( $< 6 \text{ mg L}^{-1}$ ), while in the commercial series it could only be quantified at the initial time point (Table 1), since by 4 months it was below the limit of quantification ( $< 6 \text{ mg L}^{-1}$ ).

This leads to the conclusion that time is the factor with the greatest impact on the development of browning rather than the lees. Despite their capacity to absorb browning compounds (Del Barrio-Galán et al., 2011; Mazauric & Salmon, 2005; Razmkhab et al., 2002) and their ability to inhibit browning in Sherry wines (Lopez-Toledano et al., 2006) lees do not seem to be critical in inhibiting browning in Cava.

In the case of biological aging the sparkling wines of higher quality (*Reserva* and *Gran Reserva*) had higher values of  $A_{420}$ . For both aging types the increase in  $A_{420}$  after 20 months was approximately 15 mAU, i.e. 19% of the initial value. Due to the aforementioned bleaching effect, the commercial sparkling wine samples had a lower  $A_{420}$  than the biologically aged samples, and did not return to the same values as before the addition of  $\text{SO}_2$  until approximately 8 months later.

#### 3.2. Phenol evolution

The initial (time zero) and final (after 21 months of aging) values of total phenol content (TP) and the phenols found in the samples are shown in Table 3 to illustrate the level at these points. TP did not vary during biological or commercial aging (Table 4), which is consistent with an accelerated white wine browning test carried out by Kallithraka et al. (2009). Table 4 shows the Pearson's coefficient of correlation (*r*) between time and browning for each individual phenol for each sparkling wine (A and B) and the two types of aging (biological and commercial). Gallic acid, catechin and particularly GRP increased with time during biological aging, but tended to decrease during the commercial storage. Tartaric esterified hydroxycinnamic acids (*cis*-coutaric acid, caffeic acid and ferulic acid) tended to decrease during both types of aging, except in the case of *trans*-coutaric which increased. This could be attributed to the *cis/trans* isomerization (Ibern-Gómez et al., 2000). The same patterns of behavior were observed

**Table 3**

Phenol content at the initial (zero point) and final (21 months of aging) of all series. Total phenol is reported as  $\text{mg L}^{-1}$  of gallic acid equivalents. Phenols are expressed as  $\text{mg L}^{-1}$  using the external calibration with the standard when available; Catearic acid and GRP are given as caffeic acid equivalents, *cis/trans*-coutaric acid as *p*-coumaric acid equivalents and ferulic acid as ferulic acid equivalent.

Compound	Commercial storage				Biological aging			
	Wine A		Wine B		Wine A		Wine B	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Total phenol	194.2	194.9	191.5	177.8	157.9	160.8	160.4	168.1
Gallic acid	0.89	0.85	1.06	0.89	11.41	14.80	4.90	5.45
Protocatechuic acid	4.54	5.61	1.51	1.31	16.28	17.71	16.00	18.81
Tyrosol	11.68	12.53	3.85	3.66	17.33	20.9	15.37	20.95
Catearic acid	4.98	4.37	4.73	3.85	5.86	5.30	5.21	4.59
GRP	1.96	1.74	13.60	6.65	1.37	1.52	1.31	1.58
<i>cis</i> -Coutaric acid	1.00	0.66	2.13	1.05	2.83	1.91	3.65	3.06
<i>trans</i> -Coutaric acid	1.31	1.88	1.12	1.76	1.47	2.50	1.31	2.33
Catechin	0.44	0.44	0.48	0.37	6.99	7.36	7.75	8.34
Caffeic acid	0.72	0.91	0.59	0.76	4.91	5.11	4.39	4.76
Ferulic acid	0.97	0.86	1.22	0.99	2.68	2.07	3.38	3.42
<i>p</i> -Coumaric acid	0.54	0.81	0.36	0.71	0.91	1.52	0.28	0.60

GRP: grape reaction product (2-S-glutathionylcatearic acid).

**Table 4**  
Pearson's correlation (n = 10) of phenols and total phenol with time and browning ( $A_{420}$ ) for each sparkling wine and type of aging.

Compound	Commercial storage				Biological aging			
	Wine A		Wine B		Wine A		Wine B	
	Time	$A_{420}$	Time	$A_{420}$	Time	$A_{420}$	Time	$A_{420}$
Total phenol	0.035	0.001	0.065	0.098	0.020	0.189	0.010	0.022
Galic acid	-0.439	-0.468	-0.563	-0.528	<b>0.659</b>	0.583	0.207	0.134
Protocatechuic acid	<b>0.792</b>	0.506	-0.196	-0.411	<b>0.767</b>	<b>0.776</b>	<b>0.902</b>	<b>0.841</b>
Tyrosol	0.329	-0.009	0.034	0.102	<b>0.759</b>	<b>0.715</b>	<b>0.954</b>	<b>0.857</b>
Caftaric acid	-0.621	-0.712	-0.624	-0.366	-0.486	-0.492	-0.465	-0.552
GRP	-0.514	-0.643	-0.749	-0.680	0.467	0.514	<b>0.895</b>	<b>0.869</b>
cis-Coutaric acid	-0.889	-0.847	-0.879	-0.746	-0.775	-0.798	-0.524	-0.517
trans-Coutaric acid	<b>0.872</b>	<b>0.686</b>	<b>0.868</b>	<b>0.776</b>	<b>0.865</b>	<b>0.845</b>	<b>0.813</b>	<b>0.856</b>
Catechin	-0.151	-0.115	-0.370	-0.303	0.603	0.579	0.454	0.401
Caffeic acid	<b>0.740</b>	0.476	0.611	<b>0.653</b>	0.345	0.345	0.582	<b>0.638</b>
Ferulic acid	-0.654	-0.659	-0.423	-0.561	-0.807	-0.774	-0.267	-0.173
p-Coumaric acid	<b>0.907</b>	<b>0.711</b>	<b>0.861</b>	<b>0.810</b>	<b>0.837</b>	<b>0.821</b>	<b>0.888</b>	<b>0.780</b>

In bold: significant regression model ( $P < 0.05$ ); GRP: grape reaction product (2-S-glutathionylcaftaric acid).

when the content of these phenols was related with browning. This could be due to the hydrolysis of these compounds to form their corresponding acids; *p*-coumaric, caffeic and ferulic acids (not detected) rather than the oxidation of these phenolics. Thus, *trans*-coutaric and *p*-coumaric increased significantly with time ( $P < 0.05$ ) in all cases, and aware a significantly correlated with browning. Table 2 shows the regression model of these phenols, with series A and B combined, in each aging period.

3.3. HMF evolution

There were no differences in 5-HMF between the two sparkling wine series (A and B). However, there was a significant difference in the rate of formation between the two aging types (Fig. 3). Thus, higher levels of this furfural were produced during commercial storage than during biological aging ( $P < 0.05$ ). The development of this furfural during the two aging processes is illustrated in Table 2. Contrary to *trans*-coutaric and *p*-coumaric, 5-HMF showed strong linearity with time, in all cases with a coefficient of determination ( $R^2$ ) greater than 0.9 (Table 2), which is consistent with the results reported by Câmara, Alves, and Marques (2006) for Madeira wines.

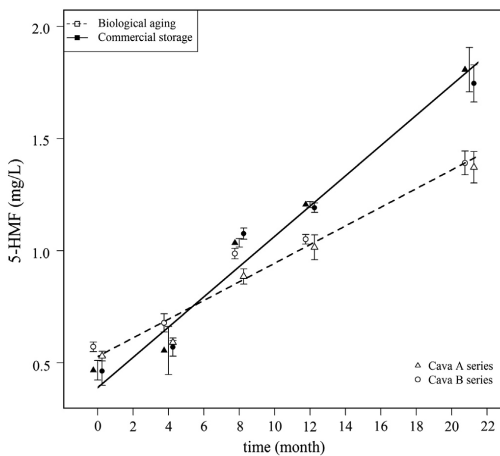


Fig. 3. Comparison of 5-HMF development during biological aging and commercial storage, expressed as the mean and standard deviation (n = 4) of the two Cava series A and B. The fitted linear regression lines for both aging types are also presented.

Unlike browning, 5-HMF was always formed and the percentage increase was much higher: 151% for biological aging and 282% for commercial storage. Furthermore, it showed much less variability (Figs. 2 and 3), meaning that the measurement of this parameter was more sensitive than that of  $A_{420}$ .

The addition of sugar to commercial wines during expedition could play a major role in furfural formation. Since 5-HMF is sugar dependent, furfural formation increases with sugar content (Câmara et al., 2006; Pereira et al., 2011). The sugar content in the wines aged biologically compared to those aged during commercial storage differed by more than tenfold (Table 1), which may explain the variation in the pattern of 5-HMF development.

3.4. Browning vs. 5-HMF and phenols

Multiple regression was employed to construct two models (biological and commercial aging) for predicting browning. 5-HMF, *p*-coumaric acid and *trans*-coutaric acid were selected as predictors, since these compounds evolved significantly in all the sparkling wines series (Tables 2 and 3). However, phenols were not statistically

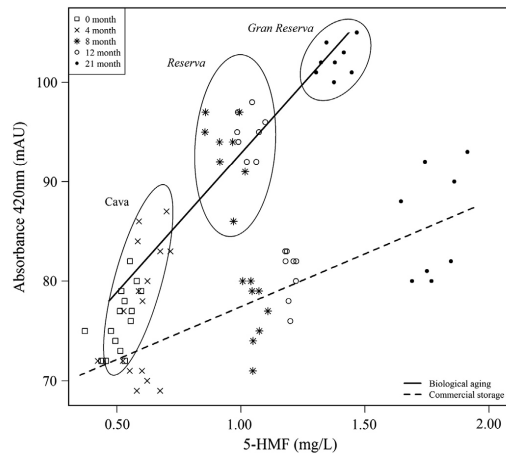


Fig. 4. Correlation between the absorbance at 420 nm and 5-HMF of the samples of Cava following biological aging and commercial storage. Sur lie samples are grouped by their quality categories (Cava, Reserva and Gran Reserva), displaying the 95% confidence region of both parameters.

significant (data not shown), and only 5-HMF was used to construct the models, which were as follows;  $A_{420} = 63 + 28[5\text{-HMF}]$  for biological aging and  $A_{420} = 67 + 11[5\text{-HMF}]$  for commercial storage. Fig. 4 shows the correlation between  $A_{420}$  and 5-HMF;  $r = 0.936$  ( $P < 0.05$ ) for biological aging and  $r = 0.831$  ( $P < 0.05$ ) for commercial storage. This relationship could stem from the correlation of both parameters with time (Table 2). Moreover, Fig. 4 shows that wines can be grouped by time, and in the case of biological aging, the samples can be grouped according to their quality categories. It is also apparent that 5-HMF can discriminate between quality categories better than the absorbance at 420 nm, as there is no overlap between the 95% confidence ellipses on 5-HMF axis, unlike on the  $A_{420}$  axis. Compared to  $A_{420}$ , 5-HMF content is thus a better time quality marker since it is more precise, and more sensitive than  $A_{420}$ . Furthermore it is not affected by the addition of  $\text{SO}_2$ , making it more useful than  $A_{420}$ , which is influenced by bleaching phenomena (Figs. 2 and 3). Although spectroscopic measurement is less expensive, the values of absorbance are very low and less specific, making it difficult to observe significant changes.

#### 4. Conclusions

An increase in browning, measured as  $A_{420}$ , was observed for both biological aging and commercial storage over time. No differences were found between the kinetics of the two aging types. No variation was observed in the TP content, and although some phenolic compounds decreased (*cis*-coumaric acid, caffeic acid and ferulic acid) and others increased (*trans*-coumaric acid and *p*-coumaric acid) with aging, their impact on the browning of Cava seems to be negligible. This could indicate that compounds other than phenols may also play a role in browning. There was a correlation between 5-HMF levels, time and browning ( $A_{420}$ ), making 5-HMF a viable quality marker. The measurement of 5-HMF allowed better discrimination, in the biological aging period, between quality categories, in comparison with measurement of  $A_{420}$ . 5-HMF was a more effective marker than  $A_{420}$ ; however, further studies are required to verify its potential as a marker since these types of compounds are usually dependent on temperature and sugar content.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to Freixenet S.A. wineries for providing the samples. This study was made possible thanks to the financial assistance provided by the *Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología* (CICYT) (Spain) AGL2011-23872, from the *Generalitat de Catalunya*, Project 2009SGR-606. The PhD student Arnau Serra-Cayuela was awarded a grant from the *Universitat de Barcelona* (UB-APIF) and the PhD student M. Àngeles Aguilera-Curiel with the grant BES-2009-027531.

#### References

Bosch-Fusté, J., Sartini, E., Flores-Rubio, C., Caixach, J., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2009). Viability of total phenol index value as quality marker of sparkling wines, "Cavas". *Food Chemistry*, 114(3), 782–790. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.013>.

Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2003). WINES|Production of sparkling wines. In En Benjamin Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 6203–6209) (2nd ed.). Oxford: Academic Press (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012227055X012979>).

Cámara, J. S., Alves, M. A., & Marques, J. C. (2006). Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2), 188–197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.031>.

Cheyrier, V., Masson, G., Rigaud, J., & Moutounet, M. (1993). Estimation of must oxidation during pressing in champagne. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(4), 393–399.

Danilewicz, J. C., Secombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(2), 128–136.

Del Barrio-Galán, R., Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Williams, P., & Doco, T. (2011). Effect of aging on lees and of three different dry yeast derivative products on Verdejo white wine composition and sensorial characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12433–12442.

Es-Safi, N.-E., Le Gueuvé, C., Cheyrier, V., & Moutounet, M. (2000). New phenolic compounds obtained by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic medium. *Tetrahedron Letters*, 41(12), 1917–1921. [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)00043-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00043-5).

Gaspar, E. M. S. M., & Lucena, A. F. F. (2009). Improved HPLC methodology for food control – Furfurals and patulin as markers of quality. *Food Chemistry*, 114(4), 1576–1582. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.097>.

Ibern-Gómez, M., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S., Singleton, V. L., & De la Torre-Boronat, M. C. (2000). Browning of Cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(1), 29–36.

Jackson, R., & Jackson, R. S. (2008). *Wine science, third edition: Principles and applications* (3rd ed.). Academic Press.

Kallithraka, S., Salacha, M. L., & Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry*, 113(2), 500–505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.083>.

Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108(1), 1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.065>.

Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (2006). Yeasts used to delay browning in white wines. *Food Chemistry*, 97(3), 498–504. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.030>.

Maury, C., Clark, A. C., & Scollary, G. R. (2010). Determination of the impact of bottle colour and phenolic concentration on pigment development in white wine stored under external conditions. *Analytica Chimica Acta*, 660(1–2), 81–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.048>.

Mazauric, J.-P., & Salmon, J.-M. (2005). Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: I. Analysis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5647–5653. <http://dx.doi.org/10.1021/jf050308t>.

Nonier, M. F., Vivas, N., de Gaulejac, N. V., Absalon, C., & Vitry, C. (2010). Study by LC/ESI/MSn and ESI/HR/MS of  $\text{SO}_2$  interactions in flavanols-aldehydes nucleophilic reactions. *Food Chemistry*, 122(3), 488–494. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.029>.

Nonier, M., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Pianet, I., & Fouquet, E. (2007). A kinetic study of the reactions of (+)-catechin with aldehydes derived from toasted oak. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(11), 2081–2091. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2968>.

Official Journal of the European Union, Commission Regulation (EC) (2009). *52 L193 § regulations*.

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.050>.

Organization International de la Vigne et du Vin (2012). *Compendium of international methods of wine and must analysis, Vol. I–II*. O.I.V.

Pereira, V., Albuquerque, F. M., Ferreira, A. C., Cacho, J., & Marques, J. C. (2011). Evolution of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (F) in fortified wines submitted to overheating conditions. *Food Research International*, 44(1), 71–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.011>.

Rada-Mendoza, M., Sanz, M. L., Olano, A., & Villamiel, M. (2004). Formation of hydroxymethylfurfural and furfural during the storage of jams and fruit-based infant foods. *Food Chemistry*, 85(4), 605–609. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.002>.

Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J. M., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (2002). Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7432–7437. <http://dx.doi.org/10.1021/jf025733c>.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdie, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *The microbiology of wine and vinifications* (2nd ed.). En *Handbook of enology*, Vol. 1, Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd.

Singleton, V. L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 69–77.

Singleton, V. L., & Kramling, T. E. (1976). Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27(4), 157–160.

Teixidó, E., Moyano, E., Santos, F. J., & Galceran, M. T. (2008). Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. *Journal of Chromatography A*, 1185(1), 102–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.057>.

Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 306–313.

Zoecklein, B. W. (1995). *Wine analysis and production*. Chapman & Hall.

### **4.3 Avaluació dels fenols i el 5-HMF com a paràmetres de qualitat relacionats amb l'enfosquiment dels vins escumosos comercials.**

A. Serra-Cayuela, M. Jourdes, M. Riu-Aumatell, S. Buxaderas, P-L. Teissedre, Pierre-Louis, E. Lopez-Tamames. Kinetics of browning, phenolics and 5-HMF in commercial sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014 62 p.1159-1166 doi:10.1021/jf403281y

#### **Resum:**

L'objectiu d'aquest estudi és construir models matemàtics que permetin predir el temps en el que els vins escumosos conserven la seva màxima qualitat segons les condicions d'emmagatzematge. Aquest models, s'obtidrien a partir de l'estudi cinètic del clàssic paràmetre  $A_{420}$  (absorbància a 420 nm) i dels compostos relacionats amb l'enfosquiment: compostos fenòlics i 5-hidroximetilfurfural (5-HMF).

Per dur-ho a terme, es va plantejar un mostreig amb 6 sèries de vins escumosos, durant més de dos anys en període comercial, conservats en diferents condicions de temperatura: nevera (4 °C), celler (16 °C) i ambient (20 °C). La identificació i quantificació dels compostos d'interès va ser duta a terme mitjançant la separació i

detecció per HPLC-DAD-FLD-MS. La mesura del paràmetre  $A_{420}$  es va realitzar a partir de la mesura directa de l'absorbància a 420 nm.

Per tal de que un compost serveixi com a marcador, ha de complir certes característiques: ha de comportar-se igual en totes les sèries, no pot desaparèixer amb el temps i la seva variació ha de ser superior al coeficient de variació del mètode. En aquest sentit, dels paràmetres analitzats només el 5-HMF i els àcids cafèic, cutàric i cumàric complien amb els requisits. Tot i això, només el 5-HMF augmentava linealment de forma significativa a totes les temperatures, així que el posterior estudi es va centrar amb aquest compost, així com el paràmetre  $A_{420}$  ja que és el paràmetre d'ús habitual per les bodegues, però no existeix informació sobre la seva cinètica en vins escumosos comercials.

Ambdós paràmetres seguien cinètiques d'ordre zero, ja que augmentaven linealment amb el temps. Les cinètiques mostren com la mesura del 5-HMF té diverses avantatges respecte la del  $A_{420}$ . El primer té menor variabilitat (més precís), és més sensible, i augmenta de forma lineal en tot l'interval de temperatures estudiat (4-20 °C). A més el paràmetre  $A_{420}$  a temperatures baixes no augmentava de forma significativa. Fent ús de l'equació d'Arrhenius es va proposar un model matemàtic amb la concentració de 5-HMF com a paràmetre per poder determinar el període òptim, segons la temperatura d'emmagatzematge, abans que els vins perdin les seves millors propietats. Així mateix, una bodega pot conèixer com han



estat conservats els seus vins en cas de devolució.

Resultats concrets:

- El temps i la temperatura d'emmagatzematge afecten al fenomen de l'enfosquiment i els compostos relacionats.
- El 5-HMF és un bon marcador de temps-temperatura, presentant millors característiques per avaluar la qualitat dels vins que el clàssic paràmetre  $A_{420}$ .
- S'han establert un model matemàtic amb la concentració del 5-HMF com a variable predictora, que permet predir el període òptim de consum dels vins segons les condicions d'emmagatzematge.

## Kinetics of Browning, Phenolics, and 5-Hydroxymethylfurfural in Commercial Sparkling Wines

A. Serra-Cayuela,<sup>†</sup> M. Jourdes,<sup>‡,§</sup> M. Riu-Aumatell,<sup>\*,†</sup> S. Buxaderas,<sup>†</sup> P.-L. Teissedre,<sup>‡,§</sup> and E. López-Tamames<sup>†</sup>

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

<sup>‡</sup>Université de Bordeaux, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), EA 4577 Œnologie, et <sup>§</sup>Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), USC 1366 Œnologie, Faculté d'Œnologie, 210 chemin de Leysotte, CS 50008, 33882 Villenave d'Ornon, France

**ABSTRACT:** We analyzed the degree of browning (absorbance at 420 nm), the phenolics, and the 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) content in six sparkling wines series kept at three temperatures (4, 16, and 20 °C) for over 2 years. Caffeic acid, *trans*-coumaric acid, *p*-coumaric acid, and 5-HMF were the compounds with the greatest correlation with browning and time. 5-HMF was the only compound that evolved linearly at all temperatures. We propose that 5-HMF is a better time–temperature marker than the  $A_{420}$  parameter or phenolics, because it shows higher linearity with time at all temperatures, is more sensitive to temperature changes, and has lower variability. The kinetics of 5-HMF was studied showing a zero-order behavior. We propose mathematical models that wineries can use to predict the browning shelf life of their sparkling wines as a function of the storage time and temperature.

**KEYWORDS:** kinetics, sparkling wines, browning, phenolics, 5-HMF, storage temperature, shelf life

### ■ INTRODUCTION

Sparkling wines are produced by the fermentation of a blend of base wines through the addition of yeasts and sugar. Fermentation can take place in sealed bottles (Champenoise or the traditional method) or in bulk tanks (Charmat method). After a period of aging, the lees are removed from the wine. CO<sub>2</sub> that has been generated is preserved, and the *liqueur d'expédition* is added. The most common sparkling wines are Champagne, Cava, Crémant, Mousseux, Prosecco, Spumante, and Sekt. These sparkling wines are distributed worldwide and stored under a range of conditions. Producers are concerned about the quality of their wines and, especially, about shelf life. Stability is defined as the property of not suffering any undesirable physical, chemical, or organoleptic changes during a given period of time. The shelf life depends upon both the environmental conditions to which a product is exposed and the acceptable loss of quality before it should be withdrawn from sale. Wineries need a stability parameter that can indicate the shelf life of sparkling wines and the optimum storage conditions. Browning is a natural process that usually occurs in white wines<sup>1–3</sup> but also takes place in sparkling wines<sup>4–6</sup> over time. It is a key quality indicator because consumers can notice it and wineries make every effort to prevent it. Absorbance at 420 nm ( $A_{420}$ ) is a typical, fast, and easy enological parameter that is used by wineries to determine the degree of browning in white wines. However, the value of the  $A_{420}$  parameter is the result of the oxidation of various compounds, and its measurement has low sensitivity.<sup>6</sup> There is general consensus that browning in the aging and storage period is a non-enzymatic process. Most authors consider that it is due to the oxidation and polymerization of the phenolics present in wines,

although other reactions may occur.<sup>7,8</sup> The phenolic composition of sparkling wines has been previously reported.<sup>4,5,9,10</sup> Some studies on white wines address the evolution of phenolics,<sup>1,11–14</sup> but few are focused on their kinetics.<sup>2,15</sup> There are hardly any studies on the evolution of commercial sparkling wines,<sup>4,6</sup> and to the best of our knowledge, there are no studies on kinetics in sparkling wines during commercial storage. Meanwhile, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), an indicator of the progress of Maillard browning, has been used as a quality marker for industrial manufactured foods.<sup>16,17</sup> This compound is present in sparkling wines<sup>18</sup> and increases linearly with time.<sup>6</sup> The behavior and kinetics of 5-HMF have been studied in overheated fortified wines<sup>19</sup> and rice wine.<sup>20</sup> In both cases, the concentration of 5-HMF was found to be related to time and temperature.

Temperature can be monitored and controlled during shelf life and may affect the content of certain compounds in sparkling wine and, consequently, its quality. Thus, the aim of this work was to use parameters related to browning (phenolics and 5-HMF) to construct mathematical models for predicting the shelf life of commercial sparkling wines. To carry out these kinetics studies, six series of Spanish sparkling wines, produced at industrial scale, were stored at three temperatures for over 2 years.

**Received:** July 25, 2013

**Revised:** December 21, 2013

**Accepted:** January 21, 2014

**Published:** January 21, 2014

## MATERIALS AND METHODS

**Wines.** We studied commercial sparkling wines that had been produced on an industrial scale at the Freixenet S.A. winery. The production process involved removing the lees and adding the appropriate amount of *liqueur d'expédition* that corresponded to the Brut category (sugar content < 12 g/L). The wines were produced from a blending of the grape varieties Macabeu, Xarel·lo, and Parellada. For over 2 years, six series of sparkling wine (coded A, B, C, D, E, and F) were kept under three temperatures: room (20 °C), cellar (16 °C), and fridge (4 °C). Production involved either the traditional (A, B, E, and F) or Charmat (C and D) methods. Wines E and F were Reserva category (>15 months of aging). Two bottles from each series of wine at each temperature were taken at 0, 4, 8, 12, and 20 months of storage for wines A–D and at 0, 4, 12, and 30 months for wines E and F. In total, we used 144 bottles of 75 cL from six series of commercial sparkling wines. Table 1 shows some of the enological parameters of

**Table 1. Commercial Sparkling Wine Characteristics at the Initial Sampling Point**

sampling wine series	pH	free SO <sub>2</sub> (mg/L)	total SO <sub>2</sub> (mg/L)	total sugar content (g/L)	alcohol content (vol %)	CO <sub>2</sub> pressure (bar)
A	3.02	18	132	9.8	11.6	6.2
B	3.03	18	116	10.2	11.7	6.2
C	3.03	22	131	11	10.6	4.9
D	3.03	22	116	10.8	10.4	5.1
E	2.98	21	126	9.5	11.7	6.0
F	2.98	19	104	9.3	11.8	6.1

each series at the initial sampling point (time zero). All bottles were opened in the dark, degassed, and stored at –20 °C until analysis.

**Chemicals.** Deionized water was purified with a Milli-Q water system (Millipore, Bedford, MA). Acetonitrile [high-performance liquid chromatography (HPLC) grade] and acetic acid were purchased from Prolabo-VWR (Fontenays/Bois, France). Gallic acid (>98%), tyrosol (>98%), caftaric acid (>97%), caffeic acid (98%), catechin (>98%), *p*-coumaric acid (>98%), and 5-HMF (>99%) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), while protocatechuic acid (>90%) and ferulic acid were acquired from Extrasynthese (Genay, France).

**Enological Parameters.** The total sugar content, alcohol content, pH, and free and total sulfur dioxide were measured using well-established standard methods<sup>21</sup> (Table 1).

Absorbance at 420 nm was considered as the browning index because it is a typical, fast, and easy parameter that is used by the producers of Spanish sparkling wines. It was measured using a 10 mm path length quartz cuvette. Values were multiplied 1000-fold and expressed as milli-absorbance units (mAU). A Shimadzu UV-3600 spectrophotometer (Duisburg, Germany) was used. All measurements were taken in duplicate.

**Identification and Quantification of Phenolics.** We used a Thermo Finnigan Surveyor HPLC system (Les Ulis, France) comprised of an autosampler (Surveyor Autosampler Plus), a quaternary pump (Surveyor LC Pump Plus), and an ultraviolet–visible (UV–vis) detector (Surveyor PDA Plus) hyphenated to a fluorescence detector (Finnigan FLD Plus) and a Thermo-Finnigan LCQ Advantage MS spectrometer equipped with an ion trap mass analyzer, all controlled by the Xcalibur data treatment system. Photodiode array (PDA) detection was configured to read from 200 to 600 nm, while for the fluorescence detection,  $\lambda_{ex}$  = 280 nm and  $\lambda_{em}$  = 320 nm [superhigh photomultiplier tube (PMT) voltage]. Electrospray ionization mass spectrometry was performed in negative and positive modes, reading *m/z* between 80.00 and 1200.00 with the following optimized parameters: capillary temperature, 300 °C; capillary voltage, –5 V; nebulizer gas flow, 1.75 L/min; desolvation gas flow, 1 L/min; and spray voltage, 5 kV.

The analyses were carried out in a Nucleosil 100-5 C<sub>18</sub> column (250 × 4 mm, 5  $\mu$ m, Agilent, France) at room temperature, and the samples

were kept at 8 °C in the sample tray. The following eluents were used: solvent A, water/acetic acid (99:1, v/v); and solvent B, acetonitrile/acetic acid (99:1, v/v). The elution gradient was as follows: 0 min, 3% B; 24 min, 6% B; 30 min, 6% B; 38 min, 12% B; 46 min, 20% B; 50 min, 20%; 58 min, 60% B; 63 min, 80% B; and 68 min, 80% B. The system was re-equilibrated for 10 min before the next injection.

For identification purposes (Table 2), 5 mL of sparkling wine samples was evaporated under vacuum (below 30 °C) and the residue

**Table 2. Identification and Quantification Parameters of the Phenolics in the Sparkling Wine Samples<sup>a</sup>**

compound	Rt (min)	$\lambda$ (nm)	std add	ESI–MS	% CV
gallic acid	6.6	272	+	(–) 169	5
protocatechuic acid	11.4	260	+	(–) 153	5
tyrosol	16.0	257	+	(+) 139	4
caftaric acid	18.1	328	+	(–) 311	5
caffeic acid	19.2	323	+	(–) 179	6
GRP	22.8	365	+	(–) 616	7
<i>cis</i> -coutaric acid	23.3	308	+	(–) 295	6
<i>trans</i> -coutaric acid	27.8	308	+	(–) 295	5
catechin	29.3	280/320 <sup>b</sup>	+	(–) 289	6
ferulic acid	37.4	329	+	(–) 325	5
<i>p</i> -coumaric acid	43.9	308	+	nf	6
HMF	0.7	284	+	(+) 127	4

<sup>a</sup>The retention times, maximum wavelength, and *m/z* used for the identification as well as confirmation by a standard addition (std add) method, when available, and the coefficient of variation (% CV) of the method are shown. Rt, retention time;  $\lambda$ , wavelength; std add, standard addition; ESI–MS, positive or negative and its *m/z*; nf, not found.

<sup>b</sup>Excitation and emission.

was redissolved in 500  $\mu$ L of solvent A from the HPLC methodology (concentration of 10:1). The concentrated fraction was used for compound identification by high-performance liquid chromatography–photodiode array–fluorometric detection–mass spectrometry (HPLC–PDA–FLD–MS), by comparing the retention times to co-injected commercial standards (when available), UV spectra, and mass spectrometry (MS) spectra (in positive and negative modes).

For the quantification, recently filtered (0.45  $\mu$ m) wine samples, with no prior treatment, were injected directly (20  $\mu$ L) into the system. Each sample was injected in duplicate. Each compound was quantified using an external calibration curve obtained from the corresponding standard measured at the maximum wavelength, except for caftaric, grape reaction product or 2-S-glutathionylcaftaric (GRP), *cis*–/*trans*–coutaric, and ferulic acids, in which the respective free non-esterified standards (caffeic, *p*-coumaric, and ferulic acids) were used. Quantification was performed by PDA detection at the maximum wavelength of each compound, except for catechin, for which fluorometric detection (FLD) was used.

**5-HMF Quantification.** The method described by Serra-Cayuela et al.<sup>18</sup> was used for the determination of this compound. Briefly, an ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) Acquity chromatographic system (Waters, Milford, MA) with a binary pump, an autosampler, and a photodiode array detector (DAD, Waters 2996) was employed. The system was controlled by Empower Pro 2 (Waters, Milford, MA). Chromatographic separation was carried out using a BEH C<sub>18</sub> column (50 × 1.0 mm inner diameter) with a particle size of 1.7  $\mu$ m (Waters, Milford, MA), kept at 40 °C. The mobile phase consisted of eluent A as a solution of acetonitrile/water/formic acid (2:97:1, v/v/v) and eluent B as a solution of acetonitrile/water/formic acid (80:19:1, v/v/v). The mobile phase was passed through a 0.22  $\mu$ m polytetrafluoroethylene (Acrodisc, CR PTFE, Waters, Milford, MA) filter. Sample vials in the injector were maintained at 10 °C, and the injected volume was 5  $\mu$ L. The linear gradient conditions were as follows: 0 min, 0% B, 3 min, 20% B; 3.5 min, 100% B; 4 min, 0% B; and 5 min, 0% B, at a flow rate of 0.800 mL/min. Data were acquired

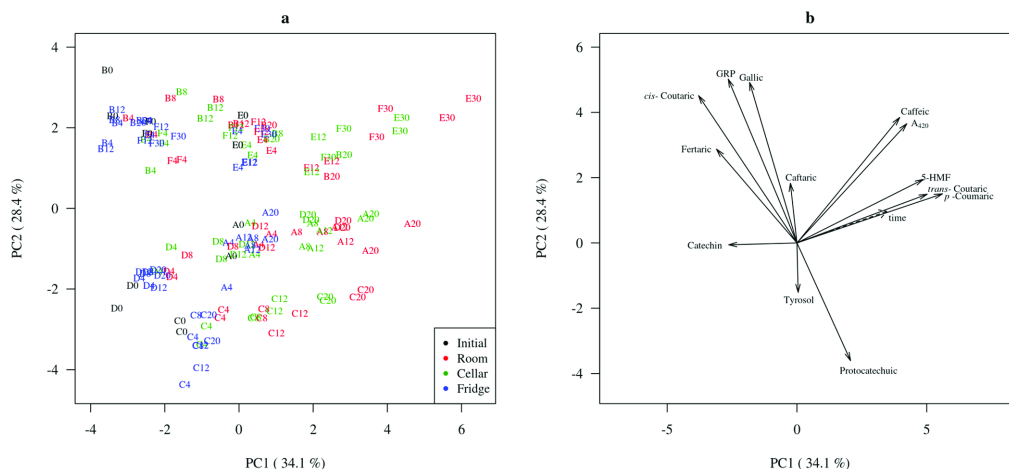


Table 3. Mean Content of Phenolics, 5-HMF, and Browning at the Three Temperatures<sup>a</sup>

compound	T (°C)	A		B		C		D		E		F	
		$\bar{i}$ (mg/L)	$((\Delta f - i)/i)$ (%)	$\bar{i}$ (mg/L)	$((\Delta f - i)/i)$ (%)	$\bar{i}$ (mg/L)	$((\Delta f - i)/i)$ (%)	$\bar{i}$ (mg/L)	$((\Delta f - i)/i)$ (%)	$\bar{i}$ (mg/L)	$((\Delta f - i)/i)$ (%)	$\bar{i}$ (mg/L)	$((\Delta f - i)/i)$ (%)
gallic acid	4	0.89	b	1.06	b	0.62	b	0.66	8	0.81	b	0.98	-5
	16	b	-16	b	b	b	b	b	b	b	b	b	-15
protocatechuic acid	20	-27	b	1.51	b	3.97	b	1.17	12	1.38	b	1.68	-9
	16	24	b	b	b	48	b	b	12	b	b	b	b
tyrosol	20	25	b	3.85	b	3.54	b	13.25	7	4.14	b	7.42	b
	16	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
caftaric acid <sup>d</sup>	20	4	b	4.73	b	3.82	b	4.04	b	5.19	b	3.95	b
	16	b	b	b	b	-10	b	-6	b	b	b	b	b
caffeic acid	20	-14	b	0.59	b	0.48	b	0.42	-15	0.87	b	0.76	-23
	16	26	b	b	b	40	b	77	b	b	b	b	b
GRP	20	24	b	13.19	b	2.25	b	3.02	76	8.49	b	10.91	16
	16	b	b	b	b	45	b	76	b	b	b	b	23
<i>cis</i> -coumaric acid <sup>d</sup>	20	-34	b	2.13	b	0.85	b	1.1	-38	1.53	b	1.83	-42
	16	-34	b	-43	b	-51	b	-30	-44	b	b	b	-48
<i>trans</i> -coumaric acid <sup>d</sup>	20	13	b	1.12	b	1.08	b	1.01	-38	1.47	b	1.14	-47
	16	44	b	0.48	b	0.54	b	0.49	105	0.44	b	0.47	71
catechin	20	44	b	0.48	b	0.54	b	0.49	91	0.44	b	0.47	60
	16	-20	b	-22	b	-29	b	-16	-15	b	b	b	b
ferulic acid <sup>d</sup>	20	b	b	1.22	b	0.82	b	1.12	-32	1.00	b	1.21	-16
	16	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	-17
<i>p</i> -coumaric	20	b	b	0.36	b	0.44	b	0.32	b	0.66	b	0.45	b
	16	14	b	0.36	b	0.44	b	0.32	b	0.66	b	0.45	b
5-HMF	20	55	b	0.46	b	0.34	b	0.32	141	0.78	b	0.73	68
	16	15	b	0.46	b	0.34	b	0.32	131	0.78	b	0.73	95
A <sub>390</sub> <sup>f</sup>	20	289	b	77	b	58	b	51	410	79	b	69	212
	16	373	b	77	b	58	b	51	603	79	b	69	352
	20	19	b	15	b	27	b	29	26	26	b	25	25
	16	26	b	17	b	37	b	46	35	35	b	32	32

<sup>a</sup>The percentage of variation  $((\Delta f - i)/i)$  between the final and initial values within each series is also shown. <sup>b</sup>No differences were found by the ANOVA test ( $p > 0.05$ ). <sup>c</sup>Using caffeic acid as the standard. <sup>d</sup>Using *p*-coumaric acid as the standard. <sup>e</sup>Using ferulic acid as the standard. <sup>f</sup>The mean is expressed as mAU.

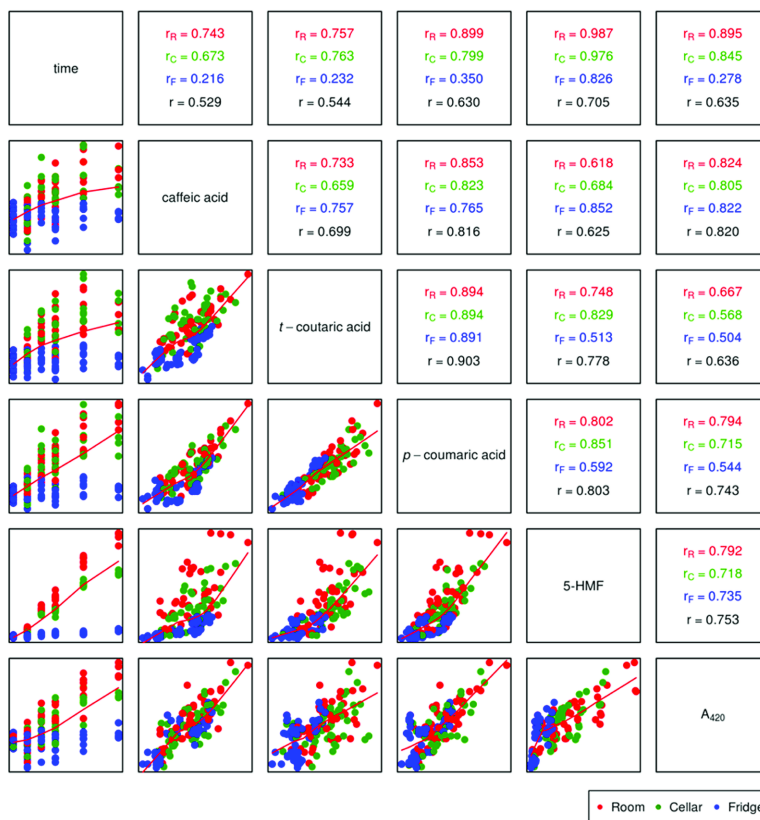


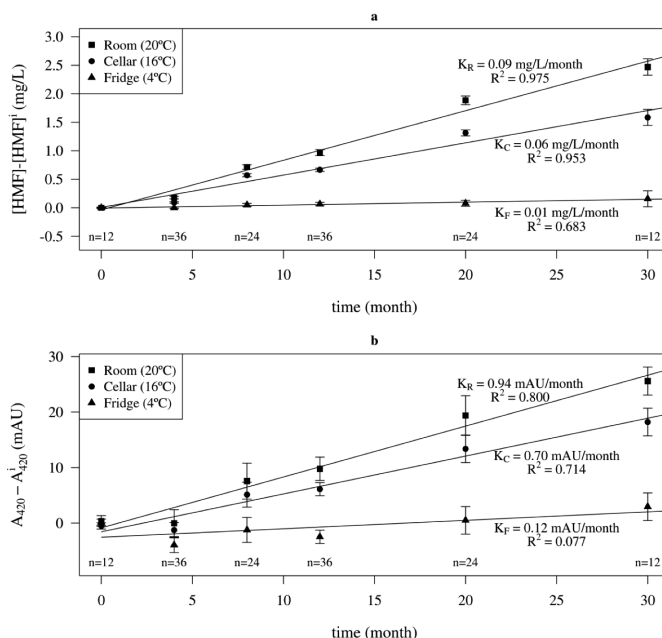
Figure 2. Pearson correlation between selected phenolics, 5-HMF,  $A_{420}$ , and time at each temperature and the overall value.

Table 3 shows the initial values of each compound and the  $A_{420}$  parameter. GRP, caffeic acid (both quantified as caffeic acid equivalent), tyrosol, and protocatechuic acid were the compounds with the highest concentration. In contrast, flavan-3-ol catechin and the hydroxycinnamic *p*-coumaric acid were the phenolics with the lowest content. Table 3 also shows the percentage of variation between the final and initial point for each wine series and each storage temperature. These percentages of variation are only shown when the difference was statistically significant by the ANOVA test. The compound 5-HMF had by far the greatest positive variation during shelf life. Thus, this compound underwent considerable changes during storage at the temperatures studied. To a lesser extent, caffeic acid, *trans*-couteric acid, *p*-coumaric acid, and  $A_{420}$  also underwent positive variation during storage. A compound must meet a certain requirement to be used as a marker; it should behave in the same way in all series. Consequently, gallic acid, tyrosol, and ferulic acid were discarded as markers. These compounds, along with protocatechuic acid, were rejected because they increased or decreased depending upon the wine series. Finally, caffeic acid, GRP, *cis*-couteric acid, and catechin were not further considered, because all of these compounds always decreased with time. A marker cannot disappear over the

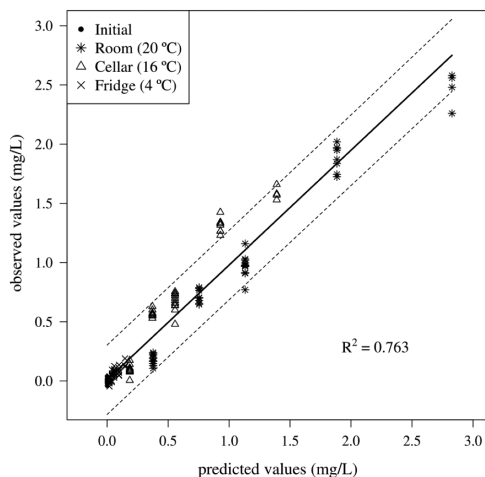
shelf life of a product, because this would make it difficult to determine the storage time.

Figure 2 shows the correlation of the compounds that had the highest coefficient of variation and always increased over time (5-HMF, caffeic acid, *trans*-couteric acid, and *p*-coumaric acid), as well as the classic browning parameter ( $A_{420}$ ). All compounds had a high correlation with  $A_{420}$ , with caffeic acid being the compound with highest correlation. The correlation with caffeic and *p*-coumaric acids could be due to the fact that both arise from the hydrolysis of their respective esters (caftaic and *cis*-coumaric acids). Caffeic, *trans*-couteric, and *p*-coumaric acids did not change significantly at low temperatures (ANOVA test), and no difference was observed between 16 and 20 °C (Figure 2 and Table 3). Thus, only 5-HMF changed significantly ( $p < 0.05$ ) at all temperatures and wine series. Therefore, this compound had the most suitable characteristics to be a time–temperature marker, which led us to study its kinetics. Moreover, 5-HMF was correlated ( $p < 0.05$ ) with the  $A_{420}$  parameter, which is usually monitored in wineries by measuring browning<sup>3,25</sup> (Figures 1b and 2).

**5-HMF and  $A_{420}$  Models.** The kinetics of 5-HMF (Figure 3a) and  $A_{420}$  (Figure 3b) were studied and compared. To determinate the reaction order, the integrated kinetic equations



**Figure 3.** Kinetics of (a) 5-HMF and (b) A<sub>420</sub> of commercial sparkling wines during storage at three temperatures (room, cellar, and fridge). The mean, the 95% confidence interval, and the number of samples (*n*) for the set of all series (A–F) at each time point are plotted. The velocity constant of formation (*k*) of the zero-order kinetics is also shown for each temperature.



**Figure 4.** Correlation between observed versus predicted values of 5-HMF, with dashed line representing the 95% prediction interval.

of zero, first, and second order were tested to find the reaction order that best fit the experimental data (data not shown). Both 5-HMF and A<sub>420</sub> showed zero-order kinetics (eq 1), increasing linearly over time

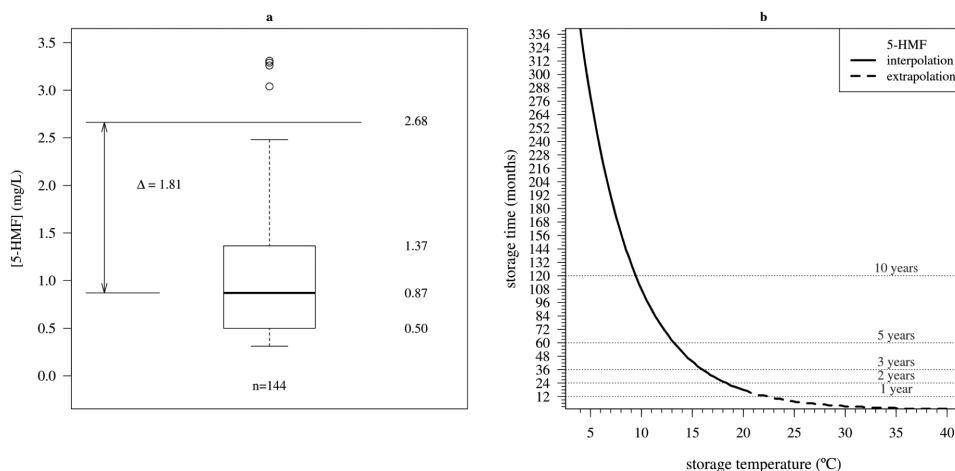
$$Y = Y_i + kt \tag{1}$$

where *Y* is the 5-HMF content (mg/L) or absorbance at 420 nm (mAU), *Y*<sub>*i*</sub> is the initial value of the 5-HMF content (mg/L) or initial absorbance (mAU), *k* is the velocity constant (expressed as mg L<sup>-1</sup> month<sup>-1</sup> for 5-HMF or mAU/month for A<sub>420</sub>), and *t* is time (in months).

The velocity constants (*k*) were calculated at each temperature (*k*<sub>R</sub>, room; *k*<sub>C</sub>, cellar; and *k*<sub>F</sub>, fridge. 5-HMF (Figure 3a) showed higher differentiation than the A<sub>420</sub> parameter between the velocity constants at various temperatures (Tukey HSD test) because 5-HMF has lower variability than A<sub>420</sub> (Figure 3b). Moreover, the A<sub>420</sub> parameter at the fridge temperature did not change significantly with time (Figure 3b and Table 3). According to the results indicated above, we will focus only on 5-HMF kinetics to construct a prediction model because this compound has less variability, is more sensitive, and can be used in a larger range of temperatures than the A<sub>420</sub> parameter. We used the Arrhenius equation (eq 2) to predict *k* at any temperature

$$k = Ae^{\left(\frac{-E_a}{R(T+273.15)}\right)} \tag{2}$$

where *k* is the pseudo-zero-order rate constant (mg L<sup>-1</sup> month<sup>-1</sup>), *A* is the pre-exponential constant, *T* is the temperature (°C), *E*<sub>*a*</sub> is the activation energy (kJ/mol), and *R* is the universal gas constant (8.314 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>). *E*<sub>*a*</sub> and *A* are obtained from a representation of the natural logarithm of eq 2. The slope multiplied by *R* provided *E*<sub>*a*</sub> while *A* was obtained from the *y* intercept. For 5-HMF, the values were *E*<sub>*a*</sub> =



**Figure 5.** (a) Box-and-whisker plot of 5-HMF values for all of the series samples. The first, second, and third quartiles and the minimum and maximum values of each category are shown. The outlier limit, defined as 1.5-fold the interquartile difference, and its distance to the median are indicated. The outliers are represented by circles. (b) Time-temperature plot for predicting the shelf life of sparkling wines. The dashed lines indicate the extrapolation of the models.

125 kJ/mol and  $A = 2 \times 10^{21} \text{ mg L}^{-1} \text{ month}^{-1}$ . These  $E_a$  and  $A$  values allowed us to establish eq 3, which was obtained by substituting eq 2 into eq 1. This equation can be used to predict the 5-HMF content, depending upon the length and temperature of storage

$$[\text{HMF}] = [\text{HMF}]_i + 1.7 \times 10^{21} e^{\left(\frac{-15014}{T+273.15}\right)} t \quad (3)$$

where  $[\text{HMF}]$  is the content of 5-HMF in mg/L,  $[\text{HMF}]_i$  is the initial content (mg/L),  $T$  is the temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), and  $t$  is the time (months).

**Sparkling Wine Shelf Life Prediction.** Figure 4 shows the correlation between observed versus predicted values to show the goodness of the fitted model. The predicted model could be used to assess the length of storage depending upon the temperature conditions. At higher temperatures (outside the range studied) the behavior may be used by extrapolation. For instance, a sparkling wine stored at  $25^{\circ}\text{C}$  for 15 months would increase its 5-HMF content by 4.05 mg/L.

The “best before” date of wine is regulatory not considered. However, it is of great interest for winemakers to know the shelf life of a wine. To determine whether a wine had anomalous data related to browning, we performed a box-and-whisker plot for 5-HMF (Figure 5a), which shows the median and upper inner fence for all of the samples. The latter parameter indicates the limit from which point the samples were considered overdeveloped (statistical outliers) and is defined as 1.5-fold the interquartile difference ( $Q_{75}-Q_{25}$ ). Thus, the difference between the upper inner fence and median was considered the maximum variation that a wine can undergo before it has overdeveloped. This assessment is purely mathematical and does not take into account sensory aspects. The variation was 1.81 mg/L (Figure 5a); therefore, eq 4 is obtained substituting this value in eq 3. With this equation (eq 4), we can predict the maximum time of storage, depending upon the temperature

$$t = 9.9 \times 10^{-22} e^{\left(\frac{15014}{T+273.15}\right)} \quad (4)$$

where  $t$  is the time (months) and  $T$  is the temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ).

Thus, this equation can be used to predict the maximum time before a wine overdevelops at a certain temperature or vice versa. Figure 5b graphically represents eq 4. The representation is also extrapolated outside the range of temperatures studied (dashed curve), thus showing the behavior in most common storage conditions. Thus, a sparkling wine stored at  $20^{\circ}\text{C}$  would have overdeveloped after the first year and a half according to measurements of 5-HMF. At lower temperatures ( $4-16^{\circ}\text{C}$ ), wines evolve slowly, with their life lengthening for many years. For instance, by extrapolation of the prediction model, at intermediate temperatures ( $16-24^{\circ}\text{C}$ ), the shelf life of the sparkling wines would range from around 1 to several years. For storage at higher temperatures (above  $27^{\circ}\text{C}$ ), the prediction model indicates that sparkling wines should be consumed as soon as possible (within the first few months). Notwithstanding, because sparkling wines are produced from different grape varieties (blanc de blanc or blanc de noir) and blending, we believe that each winery could calculate the shelf life of their sparkling wine using their own initial value and the limit beyond which they consider the wine has overdeveloped. Once these values have been determined, the shelf life could be calculated by applying them to eq 3.

In summary, sparkling wines are stable at regular storage temperatures. Lower temperatures (fridge) can almost completely prevent browning and inhibit other reactions that involve phenolics. The hydroxycinnamic acids: caffeic, *trans*-coumaric, and *p*-coumaric, were the phenolics that have the highest correlation with browning and time, and their concentration increased over time. The compound 5-HMF proved to be a better time-temperature marker than  $A_{420}$  or any of the phenolics tested, because it increased linearly with time at all temperatures, was more sensitive, even at low temperatures, and more precise (with lower variability). The



mathematical models allow us to determinate the concentration of 5-HMF, depending upon the length and temperature of storage. The model could be used by wineries to predict sparkling wine shelf life, that is, to determinate how long sparkling wines can be stored at a certain temperature before they overdevelop. Furthermore, in the case of complaint, the wineries can use 5-HMF as a reliable marker to reveal the conditions under which the sparkling wine had been stored.

#### ■ AUTHOR INFORMATION

##### Corresponding Author

\*Telephone: +34-934033795. Fax: +34-934035931. E-mail: montseriu@ub.edu.

##### Funding

This study was made possible by funding from the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) Grant AGL2011-23872, the ACCIÓ EVALXARTA2010 (EX12) and the Generalitat de Catalunya (2009SGR-606). The Ph.D. student Arnau Serra-Cayuela was awarded a grant and scholarship from the Universitat de Barcelona (APIF-UB).

##### Notes

The authors declare no competing financial interest.

#### ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Freixenet S.A. wineries for providing the samples.

#### ■ ABBREVIATIONS USED

LO<sub>Q</sub>, limit of quantification; GRP, grape reaction product (2-S-glutathionylcysteinyl); 5-HMF, 5-hydroxymethylfurfural; PCA, principal component analysis; *k*, velocity constant; *A*, pre-exponential constant; *E<sub>a</sub>*, activation energy

#### ■ REFERENCES

- (1) Maury, C.; Clark, A. C.; Scollary, G. R. Determination of the impact of bottle colour and phenolic concentration on pigment development in white wine stored under external conditions. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *660*, 81–86.
- (2) Salacha, M.-I.; Kallithraka, S.; Tzourou, I. Browning of white wines: Correlation with antioxidant characteristics, total polyphenolic composition and flavanol content. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, *43*, 1073–1077.
- (3) Singleton, V. L.; Kramlinga, T. E. Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *Am. J. Enol. Vitic.* **1976**, *27*, 157–160.
- (4) Bosch-Fusté, J.; Sartini, E.; Flores-Rubio, C.; Caixach, J.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Viability of total phenol index value as quality marker of sparkling wines, "cavas". *Food Chem.* **2009**, *114*, 782–790.
- (5) Ibern-Gómez, M.; Andrés-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R. M.; Buxaderas, S.; Singleton, V. L.; de la Torre-Boronat, M. C. Browning of cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 29–36.
- (6) Serra-Cayuela, A.; Aguilera-Curiel, M.; Riu-Aumatell, M.; Buxaderas, S.; López-Tamames, E. Browning during biological aging and commercial storage of cava sparkling wine and the use of 5-HMF as a quality marker. *Food Res. Int.* **2013**, *53*, 226–231.
- (7) Li, H.; Guo, A.; Wang, H. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem.* **2008**, *108*, 1–13.
- (8) Oliveira, C. M.; Ferreira, A. C. S.; De Freitas, V.; Silva, A. M. S. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food. Res. Int.* **2011**, *44*, 1115–1126.
- (9) Chamkha, M.; Cathala, B.; Cheynier, V.; Douillard, R. Phenolic composition of champagnes from Chardonnay and Pinot Noir vintages. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3179–3184.

(10) Pozo-Bayón, M. A.; Hernández, M. T.; Martín-Álvarez, P. J.; Polo, M. C. Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2089–2095.

(11) Hernanz, D.; Gallo, V.; Recamales, Á. F.; Meléndez-Martínez, A. J.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J. Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombar. *Food Chem.* **2009**, *113*, 530–537.

(12) Berg, H. W.; Akiyoshi, M. Some factors involved in browning of white wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1956**, *7*, 1–7.

(13) Kallithraka, S.; Salacha, M. I.; Tzourou, I. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chem.* **2009**, *113*, 500–505.

(14) Mayén, M.; Barón, R.; Mérida, J.; Medina, M. Changes in phenolic compounds during accelerated browning in white wines from cv. Pedro Ximenez and cv. Baladi grapes. *Food Chem.* **1997**, *58*, 89–95.

(15) Sioumis, N.; Kallithraka, S.; Makris, D. P.; Kefalas, P. Kinetics of browning onset in white wines: Influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food Chem.* **2006**, *94*, 98–104.

(16) Delgado-Andrade, C.; Seiquer, I.; Haro, A.; Castellano, R.; Navarro, M. P. Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chem.* **2010**, *122*, 145–153.

(17) Teixidó, E.; Núñez, O.; Santos, F. J.; Galceran, M. T. 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1902–1908.

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

(19) Pereira, V.; Albuquerque, F. M.; Ferreira, A. C.; Cacho, J.; Marques, J. C. Evolution of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (F) in fortified wines submitted to overheating conditions. *Food. Res. Int.* **2011**, *44*, 71–76.

(20) Chen, L.; Huang, H.; Liu, W.; Peng, N.; Huang, X. Kinetics of the 5-hydroxymethylfurfural formation reaction in Chinese rice wine. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3507–3511.

(21) International Organisation of Vine and Wine (OIV). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*; OIV: Paris, France, 2004.

(22) Zar, J. H. *Biostatistical Analysis*, 5th ed.; Pearson: London, U.K., 2009.

(23) Es-Safi, N.-E.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Study of the reactions between (+)-catechin and furfural derivatives in the presence or absence of anthocyanins and their implication in food color change. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5946–5954.

(24) Nonier, M. F.; Vivas, N.; Gaulejac, N. V.; de Absalon, C.; Vitry, C. Study by LC/ESI/MS<sup>n</sup> and ESI/HR/MS of SO<sub>2</sub> interactions in flavanols–aldehydes nucleophilic reactions. *Food Chem.* **2010**, *122*, 488–494.

(25) Zoecklein, B. W. *Wine Analysis and Production*; Chapman and Hall: London, U.K., 1995.

#### **4.4 Avaluació sensorial**

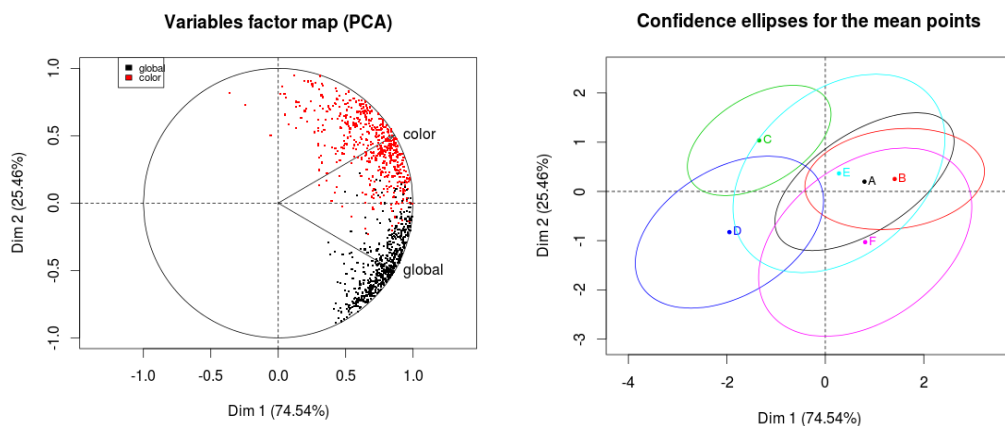
Es van realitzar dos tipus de tast diferents: triangulars i descriptius. En el primer cas es van fer dos tipus de comparacions, per una banda esbrinar si les mares tenien un paper destacat en la qualitat final del producte (comparativa rima *vs* comercial), i per segon lloc saber quines eren les millors condicions d'emmagatzematge (ambient, celler o nevera). En els tasts descriptius es va valorar la nota de color (grau d'enfosquiment) i la nota global (color, aroma, escuma, etc...).

En els triangulars on es comparava l'efecte de les mares, els tastadors van diferenciar els productes, però no va haver unanimitat alhora d'escollir el més ben valorat (no es van detectar diferències significatives).

Pel que fa a l'estudi de la discriminació entre les tres temperatures d'emmagatzematge, va quedar palès que les mostres conservades a temperatura de nevera eren les pitjors valorades (valoració global). En segon lloc es van situar els vins emmagatzemats a temperatura ambient, tot i que no sempre es van trobar diferències amb els vins conservats a temperatura de celler.

En el cas dels tasts descriptius es van avaluar la tonalitat de color i la valoració global. Els jutges van valorar millor els Cava (A, B, E i F) en front dels Charmats (C i D), tal i com s'indica a la

figura IV-1 mitjançant els *loadings* de l'anàlisi de components principals (PCA), juntament amb els centres i l'interval de confiança expressat amb el·lipses a partir del test de  $T^2$  de Hotelling.



**Figura IV-1.** PCA de les notes de color i global de les sis sèries de Cava durant l'emmagatzematge a tres temperatures.

Pel que fa a la variació en el temps, la tendència majoritària és que els tastadors no son capaços d'observar diferències en el temps (ANOVA), tant amb la nota de color com en la nota global. Això pot ser degut a que els tasts es van fer, com a mínim, passats quatre mesos i per tant sense la referència de l'anterior tast. Així doncs, per futurs estudis de llarga durada s'haurà de replantejar el sistema de tasts fent ús, per exemple, de vins o patrons de referència i/o amb major entrenament del panell.

# *Discussió*



## V. Discussió

L'enfosquiment és un fenomen que ocorre tant en el període de rima com en el comercial en els vins escumosos. En ambdós casos s'observa un augment lineal amb el temps, mesurat com absorbància a 420 nm. Aquest resultats obtinguts estan en concordança amb el que s'havia observat en tests accelerats (Bosch-Fusté et al., 2009). No s'han trobat diferències en els ràtios d'augment d'ambdós períodes i, per tant, s'ha conclòs que les mares de segona fermentació no afecten al fenomen de l'enfosquiment. Aquests resultats difereixen amb el que es va observar en els vins de Xerès on es conclòia que les mares retardaven l'enfosquiment (Lopez-Toledano et al., 2006). Aquesta diferència pot ser deguda a la *flor*, que consisteix en una capa de llevats a la part superior que protegiria el vi de l'oxidació durant l'envelliment, fenomen que no ocorre en els vins escumosos. En canvi, si que s'ha observat que amb l'addició de SO<sub>2</sub> amb el licor d'expedició, per elaborar els vins comercials, es produeix una disminució del A<sub>420</sub> (Serra-Cayuela et al., 2013a). Tot i això, els sulfits només provocarien una disminució inicial (efecte blanquejant), però no influiria posteriorment en el seu augment.

L'ús de tècniques analítiques avançades, com la cromatografia acoblada a un detector de diode array (UV) i un detector de masses masses (MS/MS) en sèrie, i també el NMR, ha permès l'elucidació de l'estructura del compost que en anteriors treballs del grup no havia pogut ser identificat (Baron et al., 2000; Bosch-Fusté et al.,

2009; Mayen et al., 1997). Es tracta del 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), un compost que suposadament prové de la deshidratació dels sucres presents en els vins escumosos (Pereira et al., 2011). Així mateix, s'ha desenvolupant i validat un mètode ràpid de quantificació per UPLC-DAD (Serra-Cayueta et al., 2013b).

Amb la finalitat de trobar marcadors de qualitat, s'ha estudiat els compostos que poden estar relacionats amb l'enfosquiment com són els compostos fenòlics i el 5-HMF. El mostreig ha permès estudiar i comparar els períodes de rima i comercial. La mesura dels fenols totals, mitjançant el mètode de Folin-Ciocalteu no és útil per observar diferències amb el temps, ja que aquest paràmetre es manté constant. L'estudi dels compostos fenòlics individuals ha permès observar com l'àcid gàl·lic, l'àcid 2-S-glutationilcaftàric i la catequina tenen un comportament diferent segons el període (rima o comercial). L'àcid caftàric, l'àcid *cis*-cutàric i l'àcid fertàric disminueixen amb el temps, mentre que el tirosol, l'àcid *trans*-cutàric, l'àcid cafèic i l'àcid *p*-cumàric augmenten. Tot i això només l'àcid *p*-cumàric i *trans*-cutàric augmenten de forma significativa. Aquests resultats concorden amb altres estudis (Bosch-Fusté et al., 2009; Hernanz et al., 2009; Ibern-Gómez et al., 2000; Kallithraka et al., 2009), tot i que també existeixen certes discrepàncies en el comportament d'aquest compostos. Aquest fet implica que l'evolució dels compostos fenòlics depèn de diversos factors, com el tipus de vi, el període (rima o comercial), la temperatura, mètode d'elaboració, etc..., i per tant, sigui difícil emprar-los com a

marcadors de qualitat universals.

En canvi, el 5-HMF augmenta significativa i linealment en ambdós períodes, tot i que amb diferent ràtio; en el període comercial la seva formació és més elevada, segurament degut al superior (més de deu vegades) contingut en sucres.

A partir del mostreig de vins escumosos comercials s'han avaluat el potencial que tenen els compostos relacionats amb l'enfosquiment (fenols i 5-HMF) com a marcadors de qualitat. En aquest sentit es van descartar els compostos fenòlics ja que no complien amb les condicions adequades per ser emprats com a marcador: comportament diferent segons la serie, disminuïen amb el temps, augment inferior al del coeficient de variació del mètode o no augmentaven en totes les temperatures (a baixes temperatures els fenols no evolucionaven amb el temps). És per això que es va optar per emprar el 5-HMF, ja que aquest compost si que complia amb les característiques per ser un bon marcador, mostrant un elevat coeficient de correlació amb el temps inclús a baixes temperatures.

S'ha proposat el 5-HMF com un marcador més adequat que el clàssic  $A_{420}$ , ja que és un compost que augmenta en tots els intervals de temperatures habituals, a diferència del paràmetre  $A_{420}$  que no seria útil a baixes temperatures. A més, la mesura d'aquest compost és més sensible, precisa i no es veu afectat per l'addició de sulfits quan aquest és afegit amb el licor d'expedició. Per altra banda, en el període de rima el 5-HMF és capaç de separar amb major eficiència entre categories de Cava.



S'ha observat que la temperatura és un factor clau per la conservació de les propietats organolèptiques, més concretament del color. Per tal d'evitar l'enfosquiment, i que els vins escumosos conservin un grau de qualitat acceptables s'han proposat un model matemàtic (equacions temps-temperatura), a partir de la mesura del 5-HMF. Fins ara existien estudis cinètics en vins blancs relacionats amb l'enfosquiment (Pérez-Zúñiga et al., 2000; Sioumis et al., 2006), però fins als resultats obtinguts en aquest treball no es disposava de les cinètiques ni models matemàtics que permeten la predicció del temps de màxima qualitat dels vins escumosos segons les seves condicions d'emmagatzematge. Aquest model, tot i que s'hauria de validar amb més mostres, pot ser de gran utilitat per les empreses elaboradores de vins escumosos ja que els hi permetrà conèixer el temps que poden estar els seus vins en el mercat abans no perdin les seves propietats òptimes segons les condicions d'emmagatzematge, i també és una eina útil en el cas de devolucions o reclamacions.

# *Conclusions*



## VI. Conclusions

- S'ha elucidat i confirmat l'estructura d'un marcador de qualitat en vins escumosos: el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). Així mateix s'ha desenvolupat i validat un mètode ràpid (UPLC-UV) per la quantificació d'aquest compost en vins escumosos. S'ha establert l'interval de concentracions en que es troba en els vins escumosos.
- Les mares del Cava no influeixen en la cinètica de formació de l'enfosquiment dels vins escumosos, ja que no s'han trobat diferències en el ràtio d'augment entre els períodes de rima i vida comercial.
- Alguns compostos fenòlics tenen un comportament diferent segons el període: rima o comercial. En ambdós casos s'ha observat correlació de l'àcid *trans*-cutàric i l'àcid *p*-cumàric amb l'enfosquiment, i en el cas de la vida comercial també l'àcid cafèic. Els compostos fenòlics conservats a baixes temperatures (comercial nevera) no evolucionen de forma significativa, essent marcadors menys potents que el 5-HMF.

- El 5-HMF és un bon marcador de temps-temperatura, i té una elevada correlació amb l'enfosquiment. Presenta diverses avantatges com a marcador respecte el clàssic paràmetre  $A_{420}$ : és més sensible a les variacions de temperatura, és més precís i es pot emprar en un interval de temperatures major.
- Per primera vegada, s'han establert models predictius que permeten conèixer el temps òptim de qualitat dels vins escumosos, les millors condicions d'emmagatzematge, així com una eina per les bodegues per conèixer com han estat conservats els vins en cas de reclamació.

## VI. Conclusions

- It has been elucidated and confirmed the structure of a marker for quality sparkling wines: 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF). Likewise, a rapid method (UPLC-UV) for the quantification of this compound in sparkling wines has been developed and validated. The range of concentrations found in sparkling wines has been established.
- The lees of Cava do not influence the sparkling wines formation kinetics of browning, as no differences were found in the increment ratio between the periods of biological ageing and commercial storage.
- Some phenolic compounds evolve differently depending on the ageing period: biological or commercial. In both cases it has been observed correlation of *trans*-coutàric acid and *p*-coumaric acid with the browning, and in the case of shelf life also with caffeic acid. At low temperatures (fridge) phenolics do not evolve significantly, being lesser powerful as a marker than 5-HMF.

- 5-HMF is a good marker of time-temperature, and has a high correlation with browning. It has several advantages as a marker compared to the classical  $A_{420}$  parameter: is more sensitive to temperature variations, it is more precise and can be used in a greater range of temperatures.
- For the first time, predictive models have been established which allow knowing the optimal time for quality of the sparkling wines, the best storage conditions, as well as a tool for wineries to recognize how the wines are kept in case of complaint.

# ***Bibliografia***





## VII. Bibliografia

- Aguilar, A., Gómez-Valentín, E., Lucas, J.M., 2006. Cinètica química, 1a reimpr corr. ed, Elements de química física. Llibres de l'Índex : Universitat de Barcelona, Departament de Química Física, Barcelona.
- Atkins, P., de Paula, J., 2010. Physical chemistry. W.H. Freeman, New York.
- Barbe, J.-C., de Revel, G., Joyeux, A., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A., 2000. Role of Carbonyl Compounds in SO<sub>2</sub> Binding Phenomena in Musts and Wines from Botrytized Grapes. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3413–3419.
- Baron, R., Mayen, M., Merida, J., Medina, M., 2000. Comparative study of browning and flavan-3-ols during the storage of white sherry wines treated with different fining agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 226–230.
- Barroso, C.G., Sánchez, L.L., Otero, J.C., Cela, R., Pérez-Bustamante, J.A., 1989. Studies on the browning of fino sherry and its relation to polyphenolic compounds. *Z Lebensm Unters Forch* 189, 322–325.
- Bosch-Fusté, J., Sartini, E., Flores-Rubio, C., Caixach, J., López-Tamames, E., Buxaderas, S., 2009. Viability of total phenol index value as quality marker of sparkling wines, “cavas”. *Food Chemistry* 114, 782–790.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E., 1996. The Maturation and Aging of Wines, in: Principles and Practices of Winemaking. Springer US, pp. 382–426.
- Buxaderas, S., López-Tamames, E., 2010. Managing the quality of sparkling wines, in: Reynolds, A.G. (Ed.), Managing Wine Quality Volume 2: Oenology and Wine Quality. Woodhead Publishing, Cambridge, England, pp. 553–588.
- Buxaderas, S., López-Tamames, E., 2012. Sparkling Wines: Features and Trends from Tradition, in: Advances in Food and Nutrition Research. pp. 1–45.
- Calò, A., Daniele, C., Lanati, D., Martelli, G., 1999. Il vino: scelta, acquisto, conservazione e degustazione: manuale del sommelier. Giunti Editore, Italia.
- Cavazzani, N., Suárez Suárez, A., 1989. Fabricación de vinos espumosos. Acribia Editorial, Zaragoza.
- Chamkha, M., Cathala, B., Cheynier, V., Douillard, R., 2003.

- Phenolic Composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot Noir Vintages. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3179–3184.
- Cheynier, V., Moutounet, M., Sarni-Manchado, P., 1998. Les composés phénoliques., in: *Oenologie, fondements scientifiques et technologiques*. Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 124–164.
- Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J.-M., Duprat, F., Moutounet, M., 1990. Must Browning in Relation to the Behavior of Phenolic Compounds During Oxidation. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 346–349.
- Clark, A.C., Prenzler, P.D., Scollary, G.R., 2003. The role of copper(II) in the bridging reactions of (+)-catechin by glyoxylic acid in a model white wine. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6204–6210.
- Clark, A.C., Scollary, G.R., 2002. Copper(II)-mediated oxidation of (+)-catechin in a model white wine system. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 8, 186–195.
- Consell Regulador del Cava, 2013. Les expedicions del CAVA ([http://cdn.crcava.es/pdf/2012/Les\\_expedicions\\_de\\_Cava\\_en\\_2012.pdf](http://cdn.crcava.es/pdf/2012/Les_expedicions_de_Cava_en_2012.pdf)).
- Danilewicz, J.C., 2003. Review of Reaction Mechanisms of Oxygen and Proposed Intermediate Reduction Products in Wine: Central Role of Iron and Copper. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 73–85.
- Darias-Martín, J.J., Andrés-Lacueva, C., Díaz-Romero, C., Lamuela-Raventós, R.M., 2007. Phenolic profile in varietal white wines made in the Canary Islands. *European Food Research and Technology* 226, 871–876.
- Del Barrio-Galán, R., Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Williams, P., Doco, T., 2011. Effect of aging on lees and of three different dry yeast derivative products on verdejo white wine composition and sensorial characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12433–12442.
- Deloire, A., Kraeva, E., Dai, G.-H., Renault, A.-S., Rochard, J., Chatelain, C., Carbonneau, A., Andary, C., 1998. Les mécanismes de défense de la vigne: Des utilisations possibles pour lutter contre les pathogènes: *Vigne*.

- Phytoma-La Défense des végétaux 46–51.
- Du Toit, W.J., Marais, J., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2006. Oxygen in must and wine: a review 27, 76–104.
- Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L., Charpentier, C., 2001. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 7, 153–159.
- Es-Safi, N.-E., Cheynier, V., Moutounet, M., 2000. Study of the reactions between (+)-catechin and furfural derivatives in the presence or absence of anthocyanins and their implication in food color change. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5946–5954.
- Es-Safi, N.-E., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M., 1999. Competition between (+)-Catechin and (–)-Epicatechin in Acetaldehyde-Induced Polymerization of Flavanols. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2088–2095.
- Es-Safi, N.-E., Le Guernevé, Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M., 1999. New Polyphenolic Compounds with Xanthylium Skeletons Formed through Reaction between (+)-Catechin and Glyoxylic Acid. *J. Agric. Food Chem.* 47, 5211–5217.
- Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W., Walker, R.B., 2010. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8139–8144.
- Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Escudero, A., Cacho, J., 1998. Role of Hydroxycinnamic Acids and Flavanols in the Oxidation and Browning of White Wines. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4937–4944.
- Fernandez-Zurbano, P., Ferreira, V., Pena, C., Escudero, A., Serrano, F., Cacho, J., 1995. Prediction of Oxidative Browning in White Wines as a Function of Their Chemical Composition. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2813–2817.
- Folin, O., Ciocalteu, V., 1927. On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. *J. Biol. Chem.* 73, 627–650.
- Fornairon-Bonnefond, C., Camarasa, C., Moutounet, M., Salmon, J.-M., 2002. New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: a bibliographic review. *J Inter Sci Vigne Vin* 49–69.

- Fulcrand, H., Cheynier, V., Oszmianski, J., Moutounet, M., 1997. An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytochemistry* 46, 223–227.
- Fulcrand, H., Doco, T., Es-Safi, N.-E., Cheynier, V., Moutounet, M., 1996. Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 752, 85–91.
- Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., Cheynier, V., 2006. Phenolic Reactions during Winemaking and Aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 289–297.
- Gallardo Chacón, J.J., 2010. Modificacions de les Propietats Físicoquímiques de les “Lies” de Segona Fermentació durant la Criança del Cava (Tesi). Universitat de Barcelona.
- García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, C., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., 2007. Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry* 105, 248–259.
- Garrido, J., Borges, F., 2011. Wine and grape polyphenols-A chemical perspective. *Food Research International* 44, 3134–3148.
- Girbau-Solà, T., 2003. Aptitud de las variedades Trepát y Monastrell para la elaboración de Cava: espuma y estabilidad de color (Tesi doctoral). Universitat de Barcelona.
- Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, Á.F., Meléndez-Martínez, A.J., González-Miret, M.L., Heredia, F.J., 2009. Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombar. *Food Chemistry* 113, 530–537.
- Ibern-Gómez, M., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., Singleton, V.L., De La Torre-Boronat, M.C., 2000. Browning of Cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 29–36.
- International Methods of Analysis of Wines and Musts, 2012. , in: OIV - International Methods of Analysis of Wines and Musts, OIV-MA-AS323-04B : R2009.
- Jackson, D.I., Lombard, P.B., 1993. Environmental and

- Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality - A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 409–430.
- Jackson, R.S., 2008. *Wine Science: Principles and Applications*, 3rd ed. Academic Press.
- Jaitz, L., Siegl, K., Eder, R., Rak, G., Abranko, L., Koellensperger, G., Hann, S., 2010. LC-MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. *Food Chemistry* 122, 366–372.
- Kallithraka, S., Salacha, M.I., Tzourou, I., 2009. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry* 113, 500–505.
- Liger-Belair, G., 2005. The Physics and Chemistry behind the Bubbling Properties of Champagne and Sparkling Wines: A State-of-the-Art Review. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2788–2802.
- Li, H., Guo, A., Wang, H., 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry* 108, 1–13.
- Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., Medina, M., 2006. Yeasts used to delay browning in white wines. *Food Chemistry* 97, 498–504.
- Macheix, J.J., Sapis, J.C., Fleuriet, A., 1991. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Crit Rev Food Sci Nutr* 30, 441–486.
- Martinotti, F., 1985. *Installation pour la fabrication continue des vins mousseux*. CH-10711.
- Maury, C., Clark, A.C., Scollary, G.R., 2010. Determination of the impact of bottle colour and phenolic concentration on pigment development in white wine stored under external conditions. *Anal. Chim. Acta* 660, 81–86.
- Mayen, M., Baron, R., Medina, M., 1997. Changes in phenolic compounds during accelerated browning in white wines from cv. Pedro Ximenez and cv. Baladi grapes. *Food Chemistry* 58, 89–95.
- Mazauric, J.-P., Salmon, J.-M., 2005. Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: I. Analysis of Remnant Polyphenolic Compounds in the Resulting Wines. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5647–5653.

- Mazauric, J.-P., Salmon, J.-M., 2006. Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: II. Analysis of Desorbed Polyphenol Compounds from Yeast Lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3876–3881.
- Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., 2005. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 85–118.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., Ricardo da Silva, J.M., 2003. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6475–6481.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., 2009. *Wine chemistry and biochemistry*. Springer, New York.
- Noble, A.C., Ough, C.S., Kasimatis, A.N., 1975. Effect of leaf content and mechanical harvest on wine “Quality”. *Am. J. Enol. Vitic.* 26, 158–163.
- Oliveira, C.M., Ferreira, A.C.S., De Freitas, V., Silva, A.M.S., 2011. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International* 44, 1115–1126.
- Oszmianski, J., Cheynier, V., Moutounet, M., 1996. Iron-Catalyzed Oxidation of (+)-Catechin in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1712–1715.
- Palma, M., Barroso, C., 2002. Application of a new analytical method to determine the susceptibility of wine to browning. *Eur Food Res Technol* 214, 441–443.
- Pereira, V., Albuquerque, F.M., Ferreira, A.C., Cacho, J., Marques, J.C., 2011. Evolution of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (F) in fortified wines submitted to overheating conditions. *Food Research International* 44, 71–76.
- Pérez-Zúñiga, F.J., Abad, F.B., Cartagena, L.G., 2000. Kinetics of non-enzymatic oxidation reactions: Browning in white wines. *European Food Research and Technology* 211, 252–256.
- Porgalı, E., Büyüktuncel, E., 2012. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by

- high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Research International* 45, 145–154.
- Pozo-Bayón, M.Á., Hernández, M.T., Martín-Álvarez, P.J., Polo, M.C., 2003. Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2089–2095.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290–4302.
- Proestos, C., Bakogiannis, A., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Kanellaki, M., Komaitis, M., 2005. High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. *Food Control* 16, 319–323.
- Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J.M., Mayen, M., Merida, J., Medina, M., 2002. Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7432–7437.
- Recamales, Á.F., Sayago, A., González-Miret, M.L., Hernanz, D., 2006. The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Research International* 39, 220–229.
- Reglamento de la Denominación «Cava» y de su Consejo Regulador, 1991. , BOE-A-1991-28079.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66, 401–436.
- Romero-Pérez, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., de la Torre-Boronat, M.C., 1996. Resveratrol and piceid as varietal markers of white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1975–1978.
- Saucier, C., Guerra, C., Pianet, I., Laguerre, M., Glories, Y., 1997. (+)-Catechin—acetaldehyde condensation products in relation to wine-ageing. *Phytochemistry* 46, 229–234.
- Saucier, C.T., Waterhouse, A.L., 1999. Synergetic Activity of Catechin and Other Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 47,



- 4491–4494.
- Serra-Cayuela, A., Aguilera-Curiel, M.A., Riu-Aumatell, M., Buxaderas, S., López-Tamames, E., 2013a. Browning during biological aging and commercial storage of Cava sparkling wine and the use of 5-HMF as a quality marker. *Food Research International* 53, 226–231.
- Serra-Cayuela, A., Castellari, M., Bosch-Fusté, J., Riu-Aumatell, M., Buxaderas, S., López-Tamames, E., 2013b. Identification of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) in Cava sparkling wines by LC-DAD-MS/MS and NMR spectrometry. *Food Chemistry* 141, 3373–3380.
- Shen, S.C., Wu, J.S.B., 2004. Maillard browning in ethanolic solution. *Journal of Food Science* 69, FCT273–FCT279.
- Simpson, R.F., 1982. Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis* 21, 233–239.
- Singleton, V.L., 1987. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical Implications. *Am. J. Enol. Vitic.* 38, 69–77.
- Singleton, V.L., Kramlinga, T.E., 1976. Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *Am. J. Enol. Vitic.* 27, 157–160.
- Singleton, V.L., Trousdale, E., 1983. White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC. *Am. J. Enol. Vitic.* 34, 27–34.
- Sioumis, N., Kallithraka, S., Makris, D.P., Kefalas, P., 2006. Kinetics of browning onset in white wines: Influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food Chemistry* 94, 98–104.
- Skoog, D.A., Crouch, S.R., Holler, F.J., 2008. *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning Editores.
- Somers, T.C., Vérette, E., Pocock, K.F., 1987. Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 40, 67–78.
- Timberlake, C.F., Bridle, P., 1976. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 27, 97–105.

- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., Pellerin, P., 2003. The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers* 54, 439–447.
- Wagener, G.W.W., 1980. The effect of mechanical harvesting on wines of Chenin Blanc grapes in South Africa. *Vitis* 19, 338–345.
- Waterhouse, A.L., Laurie, V.F., 2006. Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 306–313.



# ***Annex***



Serra-Cayuela, A., et al., (2011) Assessment of the autolysis status of lees during the ageing of Cava sparkling wine, Wine Active Compounds 2011 symposium, p.125-127



# ASSESSMENT OF THE AUTOLYSIS STATUS OF LEES DURING THE AGEING OF CAVA SPARKLING WINE

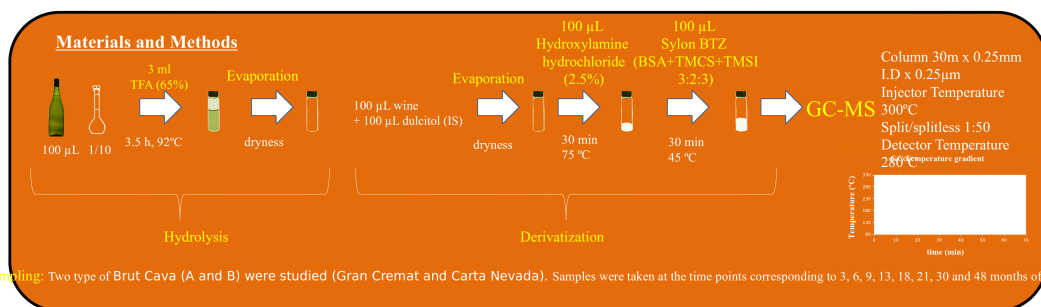
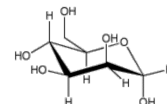
A. SERRA-CAYUELA, R. TUDELA, M. RIU-AUMATELL, S. BUXADERAS, E. LÓPEZ-TAMAMES

Department of Nutrition and Food Science, Reference Network in Food Technology (XaRTA), School of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain

Cava is a sparkling wine, the quality of which is certified by a Spanish denomination of origin. It is produced by the second fermentation of a base wine, using the traditional sur lie method. This involves an aging process in which wine and lees are in contact for at least nine months. It is known that wines contains several types of sugars and polyols [1]. The increase in wine oligosaccharides can be explained by the hydrolysis of macromolecules by glucanases from the yeast. It is important to note that the main polysaccharides in the cell wall are  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) glucans and mannoproteins, with some chitin [2], and their release during autolysis could increase the quality of the sparkling wine in characteristics such as fineness and persistence of bubbles [3].

## Aim of this work

The aim of the present study was to analyze the sugar profiles of sparkling wines and the kinetics of mannose release, in free and hydrolyzed forms, during the ageing of two Cava series over the course of 0 to 48 months.



Sampling: Two type of Brut Cava (A and B) were studied (Gran Cremat and Carta Nevada). Samples were taken at the time points corresponding to 3, 6, 9, 13, 18, 21, 30 and 48 months of

## Results and discussion

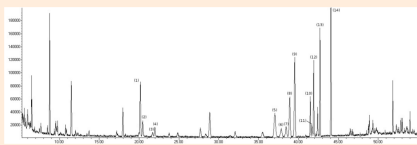


Figure 1: GC Chromatogram of sugars and polyols as silyl derivatives: (1) (*E*)-Arabinose, (2) (*Z*)-Arabinose, (3) (*E*)-Ribose, (4) (*Z*)-Ribose, (5) Mannitol, (6) Sorbitol, (7) Dulcitol, (8) (*E*)-Fructose, (9) (*Z*)-Fructose, (10) (*E*)-Galactose, (11) (*E*)-Mannose, (12) (*E*)-Glucose, (13) (*Z*)-Galactose, (*Z*)-Mannose, (*Z*)-Glucose, (14) Inositol.

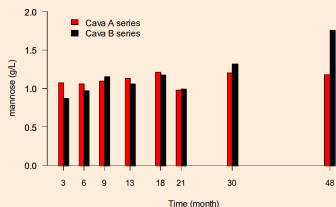


Figure 3: Evolution of hydrolyzed mannose released from oligosaccharides during long-term ageing.

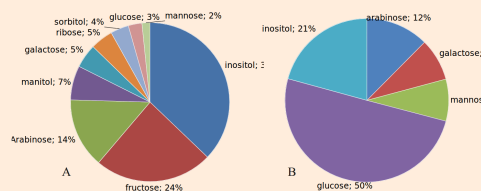


Figure 2: (A) Sugar profile of Cava sparkling wine expressed as a percentage distribution. (B) Characterization of hydrolyzed sugars from Cava sparkling wine expressed as a percentage distribution.

The chromatogram of the derivatized samples shows that Cava contains a large number of sugars and polyols, amongst which 9 carbohydrates were identified (Figure 1).

Figure 2A shows the free sugar composition of the sparkling wines from month to month 48 of ageing, where is observed that Inositol, fructose and arabinose are the most abundant carbohydrates, and the concentration of other sugars being less than 7%. In the case of the hydrolyzed sugars from sparkling wine samples, glucose was the most abundant sugar present (Figure 2B).

The evolution of the concentration of hydrolyzed mannose during ageing indicates an upward trend (Figure 3), while free mannose does not show significant differences (data not shown). The increase in mannose from wine oligosaccharides can be explained by the release of polyhydroxylated molecules during autolysis.

## Conclusions

- There exist a large variety of sugars and polyols, being fructose, arabinose and Inositol the most abundant free polyhydroxylated compounds, while glucose is the larger in the combined form.
- There is no appreciable changes of free mannose among time.
- The mannose released from cell wall as mannan trend to upward during ageing, so it may be related to the lees autolysis.

## Acknowledgements

We are grateful to Freixenet S.A wineries for providing samples. This study was made possible thanks to financial assistance from CICYT AGL 2008-03392/ALI, the Generalitat de Catalunya project 2009 SGR0606 and to Universitat de Barcelona through the grant APIF to the PhD student Arnau Serra Cayuela.

## References

1. S. Liu and CR. Davis. Am. J. Enol. Vitic. 45(2) (1994) pp. 229-234.
2. C. Charpentier and AM. Dos Santos, Int. J. Food Microbiol 96 (3) (2004) pp. 253-262.
3. YP. Nunez, AV. Carrascosa, R. Gonzalez, M. C. Polo, A. J. Martinez-Rodriguez, J. Agric. Food Chem 53 (18) (2005) pp. 7232-7237.





