



## **Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas**

**Laura Medina Trujillo**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI**

# **Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas**

---

**LAURA MEDINA TRUJILLO**



**TESIS DOCTORAL  
2017**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

Laura Medina Trujillo

**Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas**

Tesis Doctoral dirigida por:

Dr. Fernando Zamora Marín y Dr. Joan Miquel Canals Bosch

Departamento de Bioquímica y Biotecnología



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

Tarragona 2017

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Fernando Zamora Marín y Joan Miquel Canals Bosch, profesores titulares del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la facultad de Enología de la Universidad Rovira i Virgili,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado **“Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas”**, que presenta Laura Medina Trujillo para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de esta universidad.

Tarragona, 21 de Abril del 2017

Dr. Fernando Zamora Marín

Dr. Joan Miquel Canals Bosch



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

Esta tesis doctoral ha sido financiada por:

**CDTI** (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial), **programa CIEN**.  
“Nuevas estrategias para la sostenibilidad y el incremento de la competitividad del sector en el mercado internacional (VINySOST 2014).

**URV** (Universitat Rovira i Virgili), beca “**Martí Franquès**” 2013PMF-PIPF-21.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

## Agradecimientos

En primer lugar agradecer a la Universitat Rovira i Virgili la beca pre-doctoral "Martí Franquès" disfrutada durante estos tres años, sin ella hubiese sido imposible escribir las líneas que se incluyen bajo esta memoria.

A mis directores de tesis, los doctores Fernando Zamora y Joan Miquel Canals, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo tras el cual se recogen estos resultados. Gracias por la dedicación y ayuda mostrada durante este largo período.

A mis compañeros de laboratorio que compartieron conmigo el día a día y que en su momento formaron parte del grupo TECNENOL. Nikos, Mariona, Elena y María, gracias por vuestra ayuda en bodega, por aclararme dudas con el HPLC "florero" y enseñarme a dializar proteínas y usar el Mosalux. Así como a las nuevas incorporaciones, Jordi y Pere, a quienes cedo el relevo como próximos doctores. Agradecer también a la otra mitad del laboratorio, mis pequeñas lácticas, Mar, Judith e Isa, por sus conversaciones, por interesarse por mí durante mi trabajo experimental y por ofrecerme su ayuda.

A los chicos de la bodega y a Pedro, gracias por facilitarme el trabajo siempre acompañado de buenos y agradables momentos. A Rubén, Xavi y Pau, por enseñarme a medir viscosidades, usar el estalagmómetro y ayudarme con el cromatógrafo de gases. Y en especial a ti Santiago, mil gracias por toda la ayuda y atención recibida, eres una gran persona a la que aprecio mucho.

A mis padres, a mi hermana Esther y a mi tío Miguel Ángel por el apoyo siempre recibido y por entender mi marcha. Asimismo, y con un cariño especial, a mi yaya y a Boli, estéis donde estéis, gracias por todo el amor que me habéis dado.

A mis amigas de Madrid, a todas en general y sin excepción. Gracias por escucharme siempre que lo he necesitado a pesar de la distancia y por estar siempre a mi lado.

Gracias a Jenny, M<sup>a</sup> José y a una personita vallisoletana que ha dado un toque especial a todos mis días vividos aquí en Tarragona. A la futura Dra. Pascual, a la que cedo el ramo. Gracias por la convivencia, por las risas compartidas dentro y fuera de la URV siempre acompañadas de ese toque cítrico-fáunico, por nuestros iconos de whatsapp y porque para mí has sido un pilar muy importante en este duro camino.

Y por supuesto, gracias infinitas a ti Juanjo a quien dedico mi Tesis Doctoral. Gracias por toda la ayuda que me has prestado, no tengo palabras para poder agradecerte todo lo que has hecho por mí. Eres un gran profesional y una referencia a seguir que se merece tener un hueco en este mundo que algunos creen llamar "Ciencia". Te quiero mucho.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

*Dedicada a Juanjo*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

Las ideas no duran mucho...

Hay que hacer algo con ellas.

*Santiago Ramón y Cajal*



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

---

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Los vinos espumosos.....</b>	<b>3</b>
1.1. Métodos de elaboración de vinos espumosos .....	4
1.1.1. Método ancestral o rural.....	4
1.1.2. Método <i>champenoise</i> o tradicional .....	5
1.1.2.1. Obtención del vino base .....	6
1.1.2.2. Tiraje.....	7
1.1.2.3. Crianza en rima .....	7
1.1.2.4. Removido.....	8
1.1.2.5. Degüelle.....	8
1.1.3. Grandes envases o Granvás.....	9
1.1.4. Método transfer.....	10
<b>2. El Cava.....</b>	<b>11</b>
2.1. Historia .....	11
2.2. La Denominación de Origen (D.O.) Cava .....	13
2.3. Regulaciones específicas de la D.O. Cava.....	14
<b>3. Espuma y efervescencia .....</b>	<b>17</b>
3.1. Las burbujas.....	18
3.1.1. Envejecimiento de Ostwald .....	20
3.1.2. Coalescencia .....	20
3.1.3. Drenaje y explosión.....	21
3.2. Metodologías para la caracterización de la espuma.....	23
3.2.1. Método de Bikerman .....	24
3.2.2. El Mosalux.....	25
3.2.2.1. Descripción y funcionamiento del equipo Mosalux.....	25
3.2.3. El método de Rudin .....	28
3.2.4. Análisis de imágenes .....	28

---

---

**TABLA DE CONTENIDOS**


---

3.3. Factores que condicionan la estabilidad y permanencia de la espuma.....	31
3.3.1. Influencia de la composición del vino .....	31
3.3.1.1. El etanol.....	32
3.3.1.2. Las proteínas.....	33
3.3.1.3. Los polisacáridos y las manoproteínas.....	34
3.3.1.4. Los lípidos .....	37
3.3.2. Influencia de la variedad vinífera.....	38
3.3.3. Influencia del estado sanitario.....	40
3.3.4. El grado de madurez de la uva.....	41
3.3.5. Las condiciones de elaboración .....	42
3.3.6. Las levaduras y el tiempo de crianza sobre lías .....	44
<b>4. Preparados de levaduras secas inactivadas.....</b>	<b>45</b>
4.1. Producción de preparados de LSI .....	47
4.2. Aplicaciones de los preparados de LSI en vinificación .....	49
4.2.1. Efectos sobre la fermentación alcohólica.....	49
4.2.2. Efectos sobre la fermentación maloláctica .....	51
4.2.3. Estabilización tartárica y proteica .....	52
4.2.4. Efecto de las LSI sobre el aroma y el color de los vinos blancos y rosados. ....	54
4.2.5. Efecto de los preparados de LSI sobre el color, la composición fenólica y la astringencia de los vinos tintos .....	56
4.2.6. Efecto de los preparados de LSI en la espumabilidad de los vinos.....	58
<b>5. Levaduras No-Saccharomyces .....</b>	<b>59</b>
5.1. Levaduras <i>No-Saccharomyces</i> : Inoculación secuenciada en vinificación.....	62
5.2. Efecto de la inoculación secuenciada con <i>No-Saccharomyces</i> sobre el aroma del vino .....	63
5.3. Efecto de la inoculación secuenciada con levaduras <i>No-Saccharomyces</i> sobre el contenido en macromoléculas y las propiedades espumantes del vino .....	65

---

5.4. Efecto de la inoculación secuenciada con No- <i>Saccharomyces</i> sobre otros componentes del vino .....	66
<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>69</b>
<b><u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</u></b>	<b><u>85</u></b>
<b><u>RESULTADOS .....</u></b>	<b><u>89</u></b>
<b>Capítulo 1.</b> Caracterización físico-química de la espuma de vinos base blanco y rosado para la elaboración de vino espumoso (AOC Cava).....	<b>91</b>
<b>Capítulo 2.</b> Efecto de la inoculación secuencial ( <i>Torulaspota delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae</i> ) en la primera fermentación sobre las propiedades espumantes del vino espumoso.....	<b>119</b>
<b>Capítulo 3.</b> Influencia de la suplementación con levaduras secas inactivadas durante el tiraje sobre la composición, las propiedades espumantes y la calidad sensorial de los vinos espumosos (Cava).....	<b>139</b>
<b><u>DISCUSIÓN GENERAL.....</u></b>	<b><u>153</u></b>
<b><u>CONCLUSIONES GENERALES.....</u></b>	<b><u>163</u></b>

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

# INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

## 1. Los vinos espumosos

Históricamente la invención de los vinos espumosos se le ha atribuido al monje francés Dom Pierre Pérignon. No obstante, existen evidencias históricas como referencias en el antiguo (Libro de Proverbios 23:31) y nuevo testamento (9:17), así como en el Libro I de La Eneida (Virgilio, 729:741), que demuestran que los vinos espumosos ya existían con anterioridad (*Bullock y col., 1998*).

Aunque tal vez los vinos espumosos se generaran de forma espontánea y en numerosas ocasiones a lo largo de la historia, debido a la refermentación natural de los vinos, si bien es cierto que Dom Pierre Perignon fue el primero en estudiarlos de forma específica.

Hoy en día, los vinos espumosos se elaboran en diferentes países y se definen además con términos especiales según su productor. Entre los espumantes más famosos cabe destacar el *Champagne* en Francia, el Cava en España, el *Spumante* en Italia, el *Sekt* en Alemania o el *Cap Clasique* en Sudáfrica.

Por tanto, los vinos espumosos comprenden una amplia gama de vinos según las variedades de uva utilizadas, las regiones donde se producen y los sistemas empleados durante su elaboración, que los hacen ser muy distintos entre sí. Si bien todos ellos presentan un carácter común, el origen del gas carbónico, el cual es endógeno o natural.

A los vinos espumosos, cuyo gas carbónico procede de la primera fermentación alcohólica del mosto o de la refermentación del vino base, se les denomina vinos espumosos naturales. Existen diferentes métodos para su elaboración, siendo la principal característica que los diferencia el recipiente en el que tiene lugar la segunda fermentación o toma de espuma. Por consiguiente, los espumosos que se elaboran mediante los métodos *champenoise* o tradicional,



## INTRODUCCIÓN

---

transfer y ancestral, la toma de espuma acontece en la misma botella en la que se realizó el tiraje; mientras que los espumosos que se producen por el método grandes envases o Granvás, la toma de espuma sucede en depósitos isobáricos (*Hidalgo, 2011*).

### 1.1. Métodos de elaboración de vinos espumosos

Como se ha comentado en el apartado 1, existen diferentes métodos para la elaboración de vinos espumosos naturales. Según la Orden del 27 de Julio de 1972 (B.O.E. del 8 de Agosto de 1972), por la que se reglamentan los vinos espumosos naturales y los vinos gasificados, los vinos espumosos naturales son aquellos vinos que han sido sometidos a una segunda fermentación alcohólica en un recipiente herméticamente cerrado, y que como consecuencia de su especial elaboración, presentan gas carbónico de origen endógeno. El producto una vez terminado deberá tener una presión mínima de cuatro atmósferas medida a 20 °C.

En España se pueden distinguir cuatro tipos de vinos espumosos naturales según la técnica de elaboración: Cava, Vino espumoso natural, Método transfer y Grandes envases o Granvás. Los dos primeros se caracterizan por elaborarse según el método tradicional, diferenciándose el primero por pertenecer a la Denominación de Origen Cava, y el segundo, aun elaborándose por el mismo sistema de elaboración, por no pertenecer a dicha denominación.

#### 1.1.1. Método ancestral o rural

El método ancestral o rural, descubierto por error (o serendipia) en 1513 en los conventos benedictinos de Limoux (Francia), es probablemente el primer método desarrollado para la elaboración de vinos espumosos. Empieza con la obtención del vino base, mediante fermentación espontánea y según las

técnicas clásicas de elaboración de vinos tranquilos. En una segunda fase, este vino base que todavía contiene azúcar residual, es transformado en vino espumoso. La fermentación secundaria o toma de espuma se produce dentro de la botella sin adición de azúcar (sin licor de tiraje o licor de expedición), siendo los únicos azúcares fermentables por tanto los del mosto (*Stefani y col., 2015*).

### **1.1.2. Método *champenoise* o tradicional**

Originario de la región de Champagne (Francia), es un método de elaboración ampliamente conocido por el que se consiguen los vinos espumosos de mayor calidad y precio. El producto obtenido, sea *Champagne* en Francia o Cava en España, es un vino espumoso natural en el que todo el proceso de elaboración y crianza transcurren en la misma botella en la que se realizó el tiraje.

Las principales etapas de elaboración de los vinos espumosos según el método tradicional son: obtención del vino base, tiraje, crianza en rima, removido y degüelle (*Hidalgo, 2011*). En la **(Figura 1)** se muestra un esquema del proceso de elaboración tradicional.

Según la legislación, el término “*champenoise*” queda reservado de forma exclusiva para los vinos de *Champagne*. Para el resto de vinos espumosos elaborados por este procedimiento, se aplica el término “tradicional”.

## INTRODUCCIÓN

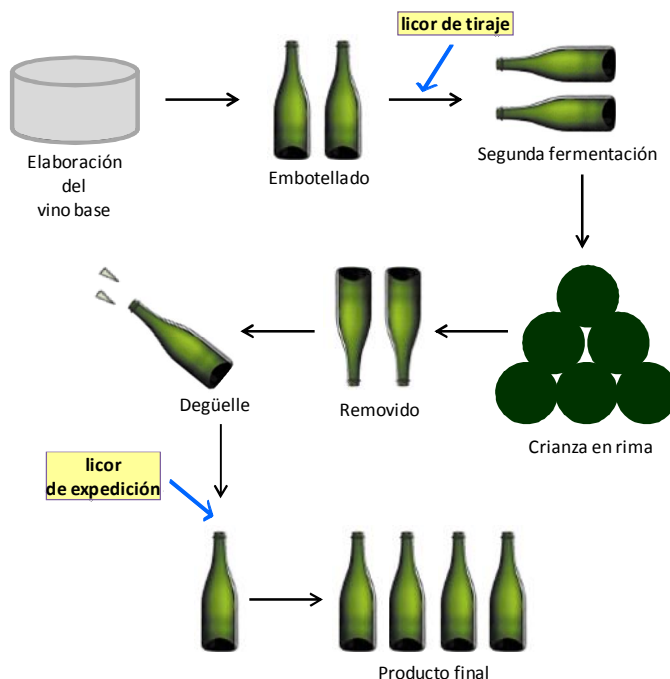


Figura 1. Etapas de la elaboración de vinos espumosos por el método tradicional  
Adaptado de Stefani (2015)

### 1.1.2.1. Obtención del vino base

Para la elaboración del vino base se sigue el proceso de elaboración de vinos tranquilos, partiendo de variedades legalmente autorizadas. El objetivo es obtener un vino base con un contenido alcohólico moderado, una acidez relativamente elevada, y con el menor tiempo de maceración posible del mosto con los hollejos. Si el contenido en ácido málico es muy elevado, es recomendable, por motivos sensoriales, que los vinos base realicen la fermentación maloláctica con el fin de reducir su contenido.

Los vinos base antes del tiraje deberán estar perfectamente limpios y estabilizados frente a precipitaciones tartáricas y proteicas (Kemp y col., 2015), ya que una vez introducidos en la botella junto al licor de tiraje no podrán sufrir ningún tratamiento (Hidalgo, 2011).

### **1.1.2.2. Tiraje**

Consiste en el embotellado del vino base junto con el licor de tiraje, que es una mezcla formada por vino base, azúcar y levaduras. La cantidad máxima de azúcar que podrá ser adicionada según legislación es de 25 g/L de vino base, y de ella dependerá la presión de dióxido de carbono a alcanzar dentro de la botella. También se pueden añadir otras sustancias, como el ácido cítrico o activadores de la fermentación. Además, es preciso adicionar bentonita y/u otros clarificantes como los alginatos, con el fin de facilitar el removido de las levaduras para su posterior eliminación.

Las levaduras que llevaran a cabo la segunda fermentación son de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Se trata de unas cepas de levaduras seleccionadas con especificidad, capaces de llevar a cabo con la máxima eficacia un proceso que se da en condiciones muy restrictivas. Estas levaduras se caracterizan por reunir una serie de características, como la tolerancia al etanol y a las altas presiones de CO<sub>2</sub>, la capacidad de fermentar a valores de pH y temperatura bajos, y la habilidad de flocular.

Una vez adicionado el licor de tiraje al vino base, el vino es embotellado y cerrado de forma hermética. Tradicionalmente, las botellas se tapaban con tapones de corcho y se fijaban a la botella mediante una grapa metálica. Hoy en día la inmensa mayoría de los elaboradores de vinos espumosos utilizan otro sistema de cierre formado por un obturador y un tapón corona (*Hidalgo, 2011*).

### **1.1.2.3. Crianza en rima**

Realizado el tiraje las botellas son colocadas en las “cavas”, locales subterráneos habilitados para la crianza, en posición horizontal y formando unas pilas de botellas conocidas como “rimas”. Durante esta etapa comenzará

## INTRODUCCIÓN

---

la segunda fermentación o toma de espuma, a una temperatura entre 10 y 15 °C, y la crianza sobre lías, de duración variable y regulada en general por la Denominación de Origen (*Hidalgo, 2011*).

### 1.1.2.4. Removido

Terminado el período de crianza se procede a desplazar las lías resultantes de la segunda fermentación hasta el cuello de la botella, mediante un proceso denominado removido. Este procedimiento puede realizarse de forma manual, con la ayuda de los pupitres, o con sistemas más o menos automatizados como los giropalets.

Según la forma tradicional o manual, las botellas se agitan para remover las lías, colocándose después en posición ligeramente inclinada en los pupitres. Transcurridos unos dos días, cuando las lías ya se han depositado en el fondo de la botella, se procede a empezar el removido. Esta técnica consiste en girar diariamente un octavo de vuelta la botella hasta completar unos tres giros en veinticuatro días. Con cada giro, se incrementa poco a poco el grado de inclinación de la botella hasta situarse casi perpendicular al suelo. Una vez se ha conseguido que las lías se sitúen en el cuello de la botella, se mantienen en esta posición denominada “en punta” hasta el momento del degüelle (*Hidalgo, 2011*).

### 1.1.2.5. Degüelle

Consiste en la eliminación de las lías acumuladas en el cuello de la botella una vez finalizada la etapa de crianza y el removido. El degüelle puede efectuarse “en caliente” o “en frío”. El degüelle en caliente se realiza de forma manual, en cambio el degüelle en frío se lleva a cabo tras congelar el cuello de la botella por introducción en un baño criogénico. Después, la botella se coloca en

posición vertical invertida y se abre, expulsando así las lías congeladas por la propia presión interna. El degüelle en frío puede mecanizarse, mientras que el degüelle en caliente al ser manual no. En el caso de que las botellas hubiesen sido tapadas con tapón de corcho y grapa, el degüelle debe realizarse en caliente. Una vez finalizada esta operación, el vino debe estar perfectamente limpio, sin restos de sedimentos.

Con la expulsión de las lías se produce una pérdida de vino que debe ser restituida hasta restablecer el volumen inicial. Esta compensación puede hacerse con un vino espumoso de la misma partida. También puede añadirse, previo a su adición, un licor de expedición azucarado. Este licor de expedición puede estar compuesto de los siguientes productos: sacarosa, mosto de uva, mosto de uva parcialmente fermentado, o mosto de uva concentrado rectificado o no, vino base y destilados vínicos, etc. De este modo, y dependiendo de la cantidad de azúcar adicionada a través del licor de expedición, se obtendrán vinos espumosos de diferente grado de dulzor. Existe además una clasificación de los vinos espumosos en función de su riqueza en azúcar, establecida por los organismos de control.

Una vez introducido el licor de expedición, se cierra la botella con un tapón de corcho y se sujeta al cuello de esta con un bozal o morrión (*Hidalgo, 2011*).

### **1.1.3. Grandes envases o Granvás**

Los vinos espumosos elaborados a partir del método Granvás se caracterizan por realizar la segunda fermentación en grandes depósitos isobáricos, también denominados autoclaves. Terminado el período de crianza se procede a efectuar una filtración isobárica previa a su embotellado.

## INTRODUCCIÓN

---

Existen dos grandes tipos de Granvás en función de si se parte de mosto o de un vino estabilizado. El *Sekt* alemán, por ejemplo, se elabora a partir de vino, mientras que el *Prosecco* o el *Asti Spumante* se producen a partir de mostos que han sido primero fermentados a presión atmosférica.

Una vez alcanzado el punto adecuado de fermentación se cierra el depósito con el objetivo de que el CO<sub>2</sub> generado en las últimas fases de la fermentación se acumule, teniendo lugar dos fermentaciones o solo una.

Dependiendo del tiempo mínimo que el vino espumoso permanece en contacto con las lías, tras acabar la fermentación, se contemplan dos clases o métodos de Granvás: el método “corto” (veintiún días) y el método “largo” (seis meses).

La calidad de los vinos obtenidos por Granvás es en general inferior a los vinos elaborados por el método tradicional, debido a la escasa influencia de la autólisis de las levaduras, sobre todo en el caso del método corto. Sin embargo, son vinos que conservan la frescura y los aromas varietales afrutados característicos de las variedades de uva utilizadas. Por tanto, es un sistema de elaboración muy adecuado para elaborar vinos espumosos donde el protagonista es la fruta y no la levadura (*Hidalgo, 2011*).

Al método Granvás también se le conoce como método *Charmat*, en honor a Jean-Eugène Charmat quien lo perfeccionó. En la actualidad se utiliza como alternativa al método tradicional para producir grandes volúmenes de vino espumoso.

### 1.1.4. Método transfer

El método transfer se caracteriza, al igual que el método tradicional, porque tanto el proceso de fermentación como el de crianza transcurren en la misma botella en la que se realizó el tiraje. La fase de rima, sin embargo, tendrá una

duración variable en función de las normativas específicas, trasvasándose después el vino espumoso junto con las lías a un tanque presurizado desde el que se desarrollará un filtrado isobárico previo a su embotellado definitivo.

A esta técnica de elaboración se la considera un híbrido del método tradicional y del Granvás, debido a que las fases de tiraje y de crianza en rima se ejecutan según el método tradicional, mientras que el proceso de filtrado, estabilización y embotellado del vino se efectúan por el método Granvás (*Hidalgo, 2011*).

## **2. El Cava**

El Cava es un vino espumoso natural producido según el método tradicional con unos vinos base procedentes de unas localizaciones geográficas determinadas, y bajo el cumplimiento de la normativa establecida por el Consejo Regulador del Cava (B.O.E. del 20 de Noviembre de 1991; <http://www.docava.es/>).

### **2.1. Historia**

Las primeras referencias de la elaboración de un vino espumoso en España datan de principios del siglo XIX, cuando algunos elaboradores influenciados por el éxito del *Champagne* inician su producción a muy pequeña escala. De este modo, Luís Justo Villanueva, profesor de química del Instituto Agrícola Catalán de San Isidro, puede considerarse artífice de la implantación del entonces llamado método *champenoise*. De hecho, algunos discípulos suyos como Agustí Vilaret o Miquel Esquirol iniciaron pequeñas elaboraciones en Blanes, Reus y Tarragona, presentando además en la exposición general de Madrid (1857) un vino espumoso denominado “Baró de les Quatre Torres”.

Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XIX en que José Raventós Fatjó, quizás el discípulo más aventajado de Luís Justo Villanueva, empezó a elaborar

---



## INTRODUCCIÓN

---

vino espumoso de forma generalizada, gracias a una segunda fermentación en botella, logrando lanzar su primera producción en 1872 al mando de la empresa Codorniu. No obstante fue su hijo Manuel Raventós Doménech, quien al hacerse cargo de la empresa, perfeccionó y afianzó el trabajo de su progenitor extendiendo además el proceso de comercialización de estos vinos. Incluso contribuyó a superar la crisis de la filoxera realizando importantes cambios en el viñedo, como fijar los varietales autóctonos que se utilizan en la actualidad (*Cayuela, 1989*).

De esta forma, y durante la segunda década del siglo XX, la elaboración de vinos espumosos se consolidó en cuanto a producción y consumo en España, adquiriendo su gran auge en los años 60. Esto hizo que años más tarde la localidad de Sant Sadurní D'Anoia (Barcelona) se convirtiera en la capital del vino espumoso (*Cayuela, 1989*).

Gracias a la expansión internacional, impulsada en especial por Freixenet en los años 80, y a la entrada de España en la Unión Europea en 1986, los vinos espumosos alcanzaron un gran crecimiento a nivel internacional, siendo hoy en día uno de los pilares fundamentales del sector vitivinícola español.

La denominación de este tipo de vino espumoso como “Cava” se debe a que en 1883 España firmó un tratado con Francia, ratificado en 1891, por el cual se estableció que solo se puede llamar *Champagne* al vino espumoso producido en la región de Champagne (Francia). Previendo esta problemática legal, los elaboradores de vino espumoso decidieron a finales de la década de los 70 utilizar el término “Cava” para designar a sus vinos espumosos. De este modo, el término “método *champenoise*” fue sustituido por el de “método tradicional” por idénticas razones.

La incorporación de España en la CEE el 1 de enero de 1986 supuso el reconocimiento del Cava como Vino Espumoso de Calidad Producido en una Región Determinada (V.E.C.P.R.D.), categoría en la que se incluyen todos los vinos espumosos de primera clase o máxima calidad, y que se equiparan a las Denominaciones de Origen (*Andrés-Lacueva y col., 1996a*). Con esta resolución finalizaba el largo y difícil proceso que conllevó la inclusión del Cava en la máxima categoría de calidad admitida por la CEE, pudiéndose solo elaborar Cava dentro del Estado español, y siempre y cuando la región abarcase la Denominación de Origen, denominada “Región del Cava” (*Cayuela, 1989*).

Como paso posterior a la incorporación de España en la CEE y el reconocimiento del Cava como V.E.C.P.R.D, se publica la Orden Ministerial del 14 de noviembre de 1991 (B.O.E. del 20 de Noviembre de 1991), que aprueba el vigente reglamento de la Denominación de Origen “Cava”, y de su Consejo Regulador. Esta normativa, junto con la Orden Ministerial del 23 de febrero de 2007 (B.O.E. del 27 de Febrero de 2007), y la Ley 24/2003 del 10 de julio de la Viña y del Vino (B.O.E. del 11 de Julio de 2003), regulan en la actualidad el sector del Cava.

## **2.2. La Denominación de Origen (D.O.) Cava**

Es una Denominación de Origen especial pues no es una unidad geográfica concreta, sino que se extiende por diferentes zonas de España peninsular, amparando a todos los productores del Cava (*García Gallego, 2008*).

Según la Orden del 14 de Noviembre de 1991 (B.O.E. del 20 de Noviembre de 1991), la región del Cava se extiende por 159 municipios: 132 en Cataluña (63 en Barcelona, 52 en Tarragona, 12 en Lleida y 5 en Girona), 18 en La Rioja, 2 en Aragón (Zaragoza), 3 en el País Vasco (Álava), 2 en la Comunidad Floral de Navarra, 1 en la Comunidad Valenciana (Valencia) y 1 en Extremadura

## INTRODUCCIÓN

---

(Badajoz). En 2015, la superficie vitícola inscrita fue de 33.591 Has, distribuidas en 6350 explotaciones.

### 2.3. Regulaciones específicas de la D.O. Cava

Las variedades de vid autorizadas para producir uva destinada a la elaboración del Cava (**Tabla 1**) se encuentran especificadas en la Orden del 14 de Noviembre de 1991 (B.O.E. del 20 de Noviembre de 1991). El rendimiento máximo de todas las variedades está unificado en los 12.000 kg de uva por hectárea.

Tabla 1. Variedades

Variedades Uva Blanca	Variedades Uva Tinta
Macabeo (Viura)	Garnacha tinta
Xarel·lo	Monastrell
Parellada	Pinot Noir
Malvasía (Subirat Parent)	Trepat <sup>2</sup>
Chardonnay	

<sup>1</sup> Orden del 14 de Noviembre de 1991 (B.O.E. del 20 de Noviembre de 1991)

<sup>2</sup> Únicamente autorizado para vinos rosados

Todas las variedades tintas con la única excepción del Trepat pueden utilizarse para la elaboración de vinos base blancos (*Blanc de noir*).

En lo que se refiere al vino base para la elaboración del Cava debe cumplir, según la legislación actual vigente, las siguientes características analíticas (**Tabla**

---

2). Además, solo podrán destinarse a la elaboración del vino base las primeras fracciones del prensado con un rendimiento máximo de 1 hl de vino por cada 150 kg de uva, produciéndose siempre en “virgen” y pudiendo ser blancos o rosados.

Tabla 2. Valores analíticos del vino base<sup>1</sup>

<b>Parámetro Enológico</b>	<b>Rango de valores</b>
Graduación alcohólica	9,5-11,5 % vol
Acidez total mínima (en ácido tartárico)	5,5 g/L
Extracto seco no reductor	13 a 22 g/L
Acidez volátil real (en ácido acético)	< 0,60 g/L
SO <sub>2</sub> total	< 140 mg/L
Cenizas	0,70 a 2 g/L
pH	2,8 a 3,3

<sup>1</sup> Orden del 14 de Noviembre de 1991 (B.O.E. del 20 de Noviembre de 1991)

Respecto a los tipos de Cava, estos se clasifican en función de diferentes criterios, atendiendo al tiempo de crianza, su riqueza en azúcares o si son blancos o rosados.

Dependiendo del tiempo en que un vino espumoso permanezca en contacto con las lías se distinguen tres categorías: Cava, Reserva y Gran Reserva. Según el Reglamento de la UE y de la D.O. Cava (CEE 823/87; Orden del 14 de Noviembre de 1991 (B.O.E. del 20 de Noviembre de 1991); Orden APA/415/2007 (B.O.E. del

## INTRODUCCIÓN

---

23 de febrero de 2007), la duración del proceso de elaboración del Cava, desde el momento del tiraje hasta el degüelle, no podrá ser inferior a nueve meses. Asimismo, la legislación también contempla las menciones de Reserva y Gran Reserva para aquellos vinos espumosos cuyo tiempo de crianza, desde el momento del tiraje hasta el degüelle, no sea menor a quince y treinta meses. En 2015 la producción registrada para estas tres categorías de espumoso respecto al total fue de un 88 % para el Cava, un 10 % para el Reserva y un 2 % para el Gran Reserva.

El 13 de junio de 2016 el Consejo Regulador del Cava presentó en Barcelona una nueva categoría *Premium* denominada “Cava de paraje calificado”, que incluye aquellos Cavas elaborados con uvas procedentes de un paraje determinado, y que contempla un período mínimo de fermentación en botella de treinta y seis meses.

En función de la concentración de azúcar añadida al final del proceso de elaboración el Cava se clasifica según indica la **(Tabla 3)**.

A parte de las clasificaciones descritas con anterioridad para el Cava otra posible clasificación es atendiendo a su color. De esta forma se denomina Cava rosado al que se elabora a partir de vinos base rosados, los cuales han sido producidos a partir de las variedades tintas autorizadas. Comentar también que la producción de Cava rosado respecto al total representa un 10 %.

Tabla 3. Tipos de cava<sup>1</sup>

<b>Tipo</b>	<b>Contenido en Azúcar</b>
<i>Brut Nature</i>	Hasta 3 g/L (y sin adición de azúcar)
<i>Extra Brut</i>	Hasta 6 g/L
<i>Brut</i>	Hasta 15 g/L
<i>Extra Seco</i>	De 12 a 20 g/L
<i>Seco</i>	De 17 a 35 g/L
<i>Semi-seco</i>	De 33 a 50 g/L
<i>Dulce</i>	> 50 g/L

<sup>1</sup> Orden del 14 de Noviembre de 1991 (B.O.E. del 20 de Noviembre de 1991); Orden APA/415/2007 (B.O.E. del 23 de febrero de 2007)

### 3. Espuma y efervescencia

La espuma, ligada al desprendimiento de CO<sub>2</sub> en el seno del vino, constituye una de las propiedades más importantes de los vinos espumosos. El efecto que generan la efervescencia y la espuma es el primer factor organoléptico que el consumidor observa cuando un vino espumoso es vertido en una copa (*Liger-Belair y col., 2012*).

A la hora de evaluar la calidad de un vino espumoso una de las cualidades que más se valoran es la dinámica creada por las burbujas y el collar durante el proceso de verter y beber el vino (*Liger-Belair y col., 2005*). La formación y permanencia de este collar de espuma, entendido como la fila de burbujas

## INTRODUCCIÓN

---

situada en la superficie del líquido, es considerado además como un parámetro de calidad (*Liger-Belair y col., 1999*). Del mismo modo que la finura de las burbujas, su persistencia y la presencia de cordones más o menos largos dan una idea de la calidad de la espuma (*Poinsaut, 1991; Malvy y col., 1994; Liger-Belair, 2001*). De entre los factores que condicionan la estructura/textura de la espuma, y por tanto, de las burbujas, destacan el método de elaboración utilizado y las características del vino base.

El desprendimiento de burbujas, conocido como efervescencia, es producido como consecuencia de la liberación del CO<sub>2</sub> disuelto en el vino. La efervescencia puede observarse casi desde el primer momento en que un vino espumoso es servido en una copa, en forma de cordones o rosarios verticales (*Senée y col., 1998*). Estos cordones tienen su origen en la base de la copa y recorren en sentido ascendente el líquido hasta llegar a su superficie (*Liger-Belair y col., 1999*). Una vez allí, y suponiendo un comportamiento ideal, las burbujas se agrupan desplazándose hacia las paredes de la copa y adhiriéndose a ellas, dando lugar a un círculo de espuma conocido como corona (*Cilindre y col., 2010*). A la duración del desprendimiento de gas carbónico se le denomina permanencia de la espuma, y corresponde con un estado estacionario en el que la velocidad de desaparición de las burbujas en la superficie es igual a la de incorporación de nuevas burbujas en el cordón (*Vanrell, 2002*).

### 3.1. Las burbujas

En un vino espumoso la calidad del producto también se relaciona con el tamaño de las burbujas. Cuanto menores sean las burbujas que asciendan lentamente a través del líquido, mayor calidad exhibirá el producto en sí (*Liger-Belair y col., 1999*).

Desde un punto de vista químico, un vino espumoso es una solución hidroalcohólica sobresaturada en  $\text{CO}_2$  que contiene una gran diversidad de moléculas (*Liger-Belair y col., 2012; Beaumont y col., 2016*). Dentro de la botella existe un estado de equilibrio termodinámico entre el gas carbónico disuelto y la fase de vapor en el espacio de cabeza (*Liger-Belair y col., 1999*). Cuando la botella se abre la presión de  $\text{CO}_2$  contenida en el espacio de cabeza decrece bruscamente, provocando que la concentración de  $\text{CO}_2$  en el vino no esté en equilibrio con su presión parcial en la fase gaseosa. El vino entra, por tanto, en un estado metaestable donde la fase líquida está sobresaturada en  $\text{CO}_2$  (*Liger-Belair y col., 1999*). Con el fin de alcanzar un nuevo estado termodinámico estable con respecto al  $\text{CO}_2$  disuelto y gaseoso, el vino espumoso debe desgasificarse de forma progresiva (*Beaumont y col., 2016*). De esta forma, el  $\text{CO}_2$  disuelto se libera de la fase líquida sobresaturada (a) en forma de burbujas heterogéneamente nucleadas (proceso de efervescencia) en el interior de la copa, y (b) por difusión "invisible" a través de la interfase vino/aire (*Beaumont y col., 2016*). En una copa de cristal clásica solo el 20 % de las moléculas de  $\text{CO}_2$  son liberadas en forma de burbujas, mientras que el resto lo hacen a través de la interfase vino/aire (*Liger-Belair y col., 2016*).

La efervescencia se produce debido a la generación de burbujas en las irregularidades de la superficie del vidrio, fenómeno conocido como nucleación heterogénea (*Liger-Belair y col., 2016*). El nacimiento regular y repetitivo de las burbujas y su migración hacia la superficie, generan los rosarios o cordones de burbujas (*Senée y col., 1999*). Sin embargo, la espuma es un sistema termodinámico inestable, es decir, con el paso del tiempo su estructura va cambiando buscando minimizar la energía del sistema (*Weaire y Hutzler, 1999*). Existen tres mecanismos que rigen la evolución temporal de la espuma: el



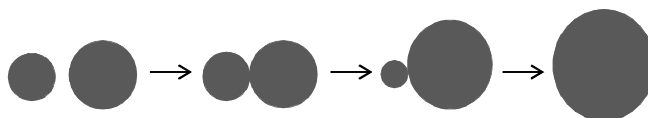
## INTRODUCCIÓN

---

envejecimiento de Ostwald, la coalescencia y el drenaje (*Schramm, 2005*), que explicaremos en los siguientes apartados.

### 3.1.1. Envejecimiento de Ostwald

Descubierto por el investigador Wilhelm Ostwald en 1896, este fenómeno se basa en la difusión de  $\text{CO}_2$  entre dos burbujas que están en contacto (**Figura 2**). Según la ley de Laplace esta difusión ocurrirá desde la burbuja más pequeña (mayor presión de gas) hacia la de mayor tamaño (menor presión de gas) adyacente a ella, convirtiéndose esta a su vez en una burbuja mayor (*Dressaire y col., 2008*).



**Figura 2.** Envejecimiento de Ostwald

### 3.1.2. Coalescencia

Este mecanismo consiste en la rotura de la capa líquida que separa dos burbujas próximas entre sí, generando como consecuencia una burbuja de mayor tamaño que desaparece con rapidez (*Carrier y Colin, 2003; Schramm, 2005*). Esta unión entre dos burbujas ocurre a través de la parte cóncava de la burbuja, y como consecuencia de la menor presión en esta zona con respecto a la parte expuesta a la presión atmosférica (**Figura 3**). Gracias a esta aproximación se forma el collar de burbujas alrededor del cristal de la copa, donde las burbujas más cercanas a la pared del cristal se encuentran fijadas a través de su menisco.

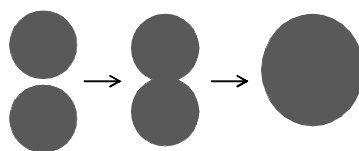


Figura 3. Coalescencia

### 3.1.3. Drenaje y explosión

El drenaje de la espuma es un complejo proceso físico-químico hidrodinámico regido por muchos factores simultáneos (*Kruglyakov y col., 2008*). La espuma es una dispersión altamente concentrada de gas (fase dispersa) en un líquido (fase continua) que se encuentra sujeta a la gravedad, y como consecuencia ambas fases (líquida y gaseosa) tienden a separarse con el tiempo. El líquido contenido en la espuma comienza a fluir en la dirección del campo gravitacional y la espuma va perdiendo parte de su contenido de líquido (*Kruglyakov y col., 2008*). A este efecto se le suma el de los gradientes de presión provocando con ello cambios locales en la fracción líquida. A este fenómeno se le conoce como drenaje.

Por efectos del drenaje la fracción líquida contenida en la espuma tiende a una situación de equilibrio mecánico. Una vez alcanzado este equilibrio la fracción líquida en la parte superior e intermedia de la espuma es mínima (en torno a un 10 %), y por tanto, las burbujas adoptan una forma poliédrica donde el espesor de las películas que las rodean es más delgado debido al poco líquido presente. Sin embargo, en la parte inferior de la espuma la fracción líquida tiende al valor límite de una espuma húmeda (*Weaire y Hutzler, 1999*), y la forma de las burbujas es más esférica. Cuando el espesor de las películas llega a ser crítico en

## INTRODUCCIÓN

las burbujas con forma poliédrica, estas se rompen de manera espontánea (Figura 4).

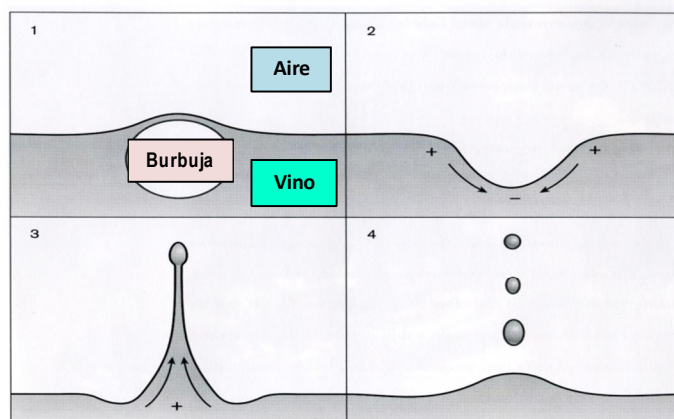


Figura 4. Drenaje y explosión

Como consecuencia del estallido de una burbuja en la superficie del líquido aparece una cavidad formada por la otra mitad de la burbuja. En la capa de líquido que rodea esta cavidad se producen unos gradientes de presión traducidos en una serie de corrientes hidrodinámicas, que tienden a cerrar este hueco. Debido a este fenómeno hidrodinámico, se origina la proyección de un chorro de líquido hacia arriba impulsado por los gradientes de presión, que se acaba rompiendo en pequeñas gotitas. Se ha demostrado que las gotitas expulsadas al aire por causa de este efecto contienen una mayor concentración de compuestos orgánicos tensoactivos que las halladas en la matriz líquida (Liger-Belair y col., 2001; Vanrell, 2002). Este estallido de burbujas en la superficie líquida juega un papel muy importante en el análisis sensorial de un vino, al favorecer la apreciación de sus aromas (Figura 5).



Figura 5. Estallido de burbujas

### 3.2. Metodologías para la caracterización de la espuma

Hasta hace poco más de ocho décadas tan solo se podían apreciar las características espumantes de un vino espumoso mediante la degustación, lo que limitaba su análisis a la disponibilidad de un panel de expertos y dificultaba además la obtención de referencias fácilmente parametrizables.

La espuma es una cualidad que define al vino espumoso y es la primera que observa el consumidor. Por esta razón ha sido objeto de numerosos estudios científicos basados en el conocimiento de los factores intrínsecos (variedad de uva, vendimia), y extrínsecos (tecnologías de elaboración), que afectan tanto a la composición de la espuma como a sus propiedades espumantes.

Con el fin de correlacionar las propiedades espumantes con las características físico-químicas del vino, se han realizado numerosos intentos por encontrar técnicas instrumentales que permitan tanto la obtención del comportamiento de la espuma, como el poder comparar las diferencias existentes entre distintos vinos espumosos.

Entre los diferentes métodos propuestos, los más utilizados son los que se basan en medir la cinética de desprendimiento de  $\text{CO}_2$  (Maujean y col., 1988), los métodos basados en el burbujeo de gas y seguimiento de la espuma

## INTRODUCCIÓN

---

formada (*Bikerman, 1938*), y los que utilizan el análisis de imagen (*Machet y col., 1993; Robillard y col., 1995*). En los siguientes apartados nos centraremos en explicar el fundamento de estos métodos.

### 3.2.1. Método de Bikerman

Propuesto por *Bikerman (1938)*, es el método tradicional utilizado para evaluar la capacidad espumante de los vinos tranquilos. No obstante, ha sido adaptado posteriormente por varios autores para medir las características espumantes de otras bebidas efervescentes, como la sidra (*Blanco-Gomis y col., 2007*) y los vinos espumosos (*Pueyo y col., 1995*).

El sistema de medida consiste en burbujear gas (aire, N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>) a través de un volumen de vino para generar espuma (*Gallart y col., 1997*). El equipo utilizado consta de tres elementos: una columna graduada de 15 mm de diámetro y 530 mm de altura, un medidor de masa de gas y un controlador de flujo. La columna, la cual contiene el vino previamente desgasificado (10 mL), está formada en su parte inferior por un vidrio poroso y una salida hacia el exterior donde se conectará la inyección de gas.

La medida de las propiedades espumantes del vino a analizar se realiza a un valor establecido de flujo de CO<sub>2</sub> (mL/min) variable dependiendo de la bebida efervescente a estudiar, de forma que la altura alcanzada por la espuma permanezca constante y sea lo suficientemente elevada para ser medida con precisión, y sin que llegue a colapsar (*Pueyo y col., 1995*).

Mediante este método puede determinarse el coeficiente de Bikerman ( $\Sigma$ ), que es independiente del aparato y del procedimiento empleado. Este coeficiente representa la vida media de la burbuja, en estado estacionario, cuando la formación y la destrucción de la espuma están en equilibrio. Se calcula como la

ratio entre la altura alcanzada por la espuma (expresada en mL), y el flujo de CO<sub>2</sub> empleado (expresado en mL/s) a presión constante (*Gallart y col., 1997*).

### **3.2.2. El Mosalux**

El Mosalux (del griego *mosa*: espuma, y del latín *lux*: luz) es un equipo automatizado basado en los mismos principios del sistema de Bikerman. Fue diseñado por los laboratorios de enología de la Facultad de Ciencias de Reims (Francia), en colaboración con la Estación Enotécnica de Champagne ubicada en Epernay (France) (*Maujean y col., 1988, 1990*).

Se trata de un método objetivo y normalizado que permite medir las propiedades espumantes de los vinos (medidas físicas), en unas condiciones determinadas y estandarizadas de eferescencia artificial. El principio de su funcionamiento se basa en la medida de la altura de la espuma generada por la inyección de CO<sub>2</sub>, a un flujo y presión determinados, a través de un vidrio poroso en el vino. La altura se determina gracias a la intercepción de la espuma producida con un haz de luz infrarroja.

Con este sistema instrumental se pueden medir las características de la espuma de diferentes bebidas efervescentes (*Poinsaut, 1991*), siendo por tanto un método de referencia muy utilizado tanto por los laboratorios de investigación, como por parte de las bodegas dedicadas a la elaboración de vinos espumosos.

#### **3.2.2.1. Descripción y funcionamiento del equipo Mosalux**

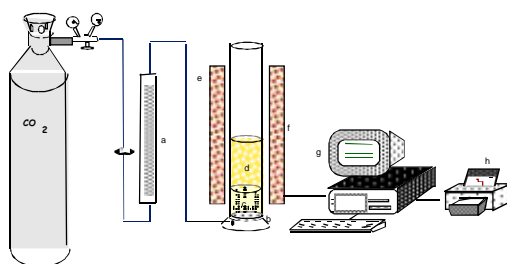
El Mosalux está constituido por un módulo de medición conectado a un ordenador (**Figura 6**). El elemento principal del módulo de medida es una probeta de vidrio de 40 mm de diámetro y 430 mm de altura. La parte inferior de dicha probeta está compuesta por un vidrio poroso, y un tubo de salida donde se conectará la inyección de CO<sub>2</sub>. La velocidad de flujo de CO<sub>2</sub> es

## INTRODUCCIÓN

regulada y fijada por un medidor de flujo de bolas. Finalmente, a la izquierda de la probeta se encuentra una fuente emisora de luz infrarroja, y a la derecha un receptor de señales.

La formación de espuma se consigue inyectando la corriente de CO<sub>2</sub> a la probeta que contiene el vino (100 mL), previamente desgasificado, y las medidas de los parámetros de la espuma se realizan a unos valores establecidos de presión de CO<sub>2</sub> (1 bar) y flujo de CO<sub>2</sub> (7 L/h) constantes. La altura de la espuma es medida a través del sistema emisor-receptor de infrarrojos, y la señal de salida detectada y traducida por el ordenador en una gráfica en forma de curva, que representa el comportamiento espumante del vino objeto de estudio.

a: Caudalímetro	e: Emisor de rayos infrarrojos
b: Vidrio poroso	f: Receptor de rayos infrarrojos
c: Vino	g: Ordenador
d: Espuma	h: Impresora



**Figura 6.** Esquema del equipo Mosalux  
*Adaptado de Vanrell (2002)*

El Mosalux permite obtener una representación de la evaluación de la altura en función del tiempo. Manteniendo siempre constantes la presión y el flujo de gas, la altura de la espuma aumenta, en primer lugar, hasta llegar a un máximo para luego disminuir y estabilizarse a una altura determinada. Cuando ya no se observan variaciones significativas de la altura, se para el flujo de CO<sub>2</sub> y se mide el tiempo de desaparición completa de la espuma. En la (**Figura 7**) se representa

una curva típica de evolución de la altura de la espuma obtenida con el Mosalux. Las medidas realizadas con este equipo permiten obtener tres parámetros, HM, HS y TS, que se definen como:

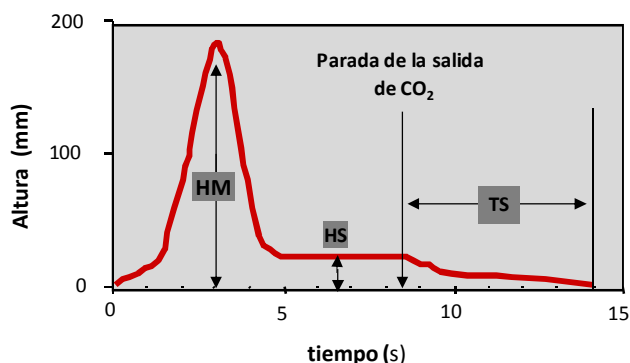


Figura 7. Curva típica de evolución de la espuma  
Adaptada de Vanrell (2002)

- HM o espumabilidad. Es la altura máxima alcanzada por la espuma tras la inyección de  $\text{CO}_2$ . Corresponde a la capacidad del vino para formar espuma, lo que se asimila a la altura de la espuma obtenida inmediatamente después de verter un vino espumoso en una copa. Se mide en milímetros (mm).
- HS o persistencia de la espuma (HS). Es la altura a la que se estabiliza la espuma mientras se mantienen las mismas condiciones de presión y flujo de  $\text{CO}_2$ . Se equipara a la persistencia de la corona y/o a la capacidad del vino para producir una espuma estable. Se mide en milímetros (mm).
- TS o tiempo de estabilidad de la espuma (TS). Es el tiempo que transcurre desde que se detiene la emisión de  $\text{CO}_2$  hasta la desaparición completa de la espuma. Se relaciona con el tiempo de estabilidad de la espuma cuando la efervescencia decrece. Se mide en segundos (s).

Una modificación del sistema Mosalux fue desarrollada por *Moreno-Arribas y colaboradores (2000)*, basándose en una adaptación del método de Bikerman.



## INTRODUCCIÓN

---

Diseñaron un equipo para determinar la altura de la espuma producida en función del tiempo al inyectar un flujo de aire controlado al vino. Como detector de la espuma utilizaron un emisor-detector de ultrasonidos determinando dos parámetros: Hpeak (la altura máxima de la espuma después de la inyección de aire), y Hplateau (la altura a la cual permanece estable la espuma durante la inyección de aire).

### 3.2.3. El método de Rudin

*Rudin (1957)* propuso un método para la determinación de la estabilidad de la espuma basado en el tiempo en el que esta se mantiene estable antes de colapsar. La técnica se basa en llenar un tubo con la muestra, previamente desgasificada, hasta alcanzar una altura de 10 cm. A continuación se inyecta la corriente de CO<sub>2</sub> a presión y flujo controlados hasta generar espuma, cuya altura se va midiendo a intervalos de tiempo regulares hasta llegar a una altura de 32,5 cm en el tubo. En ese instante se detiene la corriente de gas y se comienza a monitorizar el tiempo de decaimiento de la espuma (*Head Retention Value; HRV*).

Este procedimiento es muy utilizado en cervezas al presentar valores de HRV muy altos (entre 90 y 150 segundos). Sin embargo, en vinos espumosos es un método de difícil aplicación al ser sus valores de HRV menores y poco discriminantes. No obstante, *Vincenzi y colaboradores (2014)* han utilizado esta metodología para evaluar las características espumantes del Prosecco.

### 3.2.4. Análisis de imágenes

Los sistemas de visión artificial se basan en adquirir imágenes mediante cámaras, generalmente bidimensionales, para después procesarlas en forma digital y poder extraer y medir determinadas propiedades de las imágenes

adquiridas. Se trata, por tanto, de una tecnología que intenta analizar e interpretar imágenes de una forma equivalente a la inspección visual humana.

El sistema en sí consta de diversos elementos que pueden variar dependiendo del tipo de problema que se está intentado resolver, y las condiciones en las que se desarrolla. No obstante la mayoría de ellos comparten un tronco común constituido por los siguientes componentes: iluminación, cámara, óptica, placa digitalizadora, unidad de procesamiento y software (*Saldaña y col., 2013*).

Para el caso de bebidas efervescentes esta técnica permite la visualización, medición y cuantificación de manera objetiva y automática de las características visuales de la efervescencia, eliminando así la variabilidad que pudiera presentar un catador en el momento de evaluar la bebida. Mediante este sistema pueden determinarse parámetros como la altura y el collar, producidos en el vidrio (copa) como consecuencia de la espuma (*Machet y col., 1993; Robillard y col., 1995*).

Hay que tener en cuenta a la hora de realizar el análisis que la calidad del vidrio y los parámetros ambientales influyen de forma significativa en la medida (*Moreno-Arribas y Polo., 2009*). Aun así es un sistema muy reproducible que permite valorar de una manera automatizada, y en condiciones reales, la calidad de la espuma en una copa.

El sistema más completo, diseñado con la tecnología de tratamiento de imágenes, es el método CAVE (*Computer Assisted Viewing Equipment*). Esta técnica permite evaluar las propiedades espumantes de un vino espumoso durante el proceso de vertido y en condiciones reales de degustación (*Cilindre y col., 2010*). Fue desarrollado en la década de 1990 con el propósito de cuantificar la evolución del collar con el paso del tiempo. Hoy en día este es el único aparato que permite un análisis descriptivo del comportamiento de la

---

## INTRODUCCIÓN

---

espuma, durante y después del vertido, de un vino espumoso, aportando además información como las velocidades de la espuma y del líquido durante el vertido, así como la altura del collar después del vertido (*Cilindre y col., 2010*).

El sistema CAVE está formado por un “brazo-robot” de vertido asistido por un ordenador y un sofisticado sistema de registro de datos, constituido por tres cámaras de video situadas en diferentes posiciones que toman imágenes desde ángulos múltiples. También presenta un láser que atraviesa la copa, detectando tanto la espuma como los niveles de líquido en la copa. La altura de la espuma y la del líquido son registradas durante el tiempo que dura el vertido (*Cilindre y col., 2010*).

La caracterización del comportamiento de la espuma en el momento del vertido del vino en la copa permite obtener parámetros como las velocidades de ascenso de la espuma y del líquido, así como la altura máxima de la espuma. Al finalizar el vertido se estudia la altura del collar hasta que la altura mínima de la espuma y la altura máxima del líquido son alcanzadas (*Cilindre y col., 2010*).

A diferencia de los métodos de burbujeo de gas las muestras no tienen que ser previamente desgasificadas. En las condiciones de servicio del vino, tanto su temperatura como la forma de la copa pueden ser también controladas y estandarizadas. Sin embargo, a pesar de contar con estas ventajas es un sistema poco utilizado.

Debido a la complejidad instrumental de estos sistemas algunos investigadores han desarrollado sistemas más simples. Así, *Curioni y colaboradores (2015)* estudiaron la evolución de la espuma durante el tiempo que duraba el vertido de un vino en una copa. Para ello utilizaron una grabación por video cámara de la cual extrajeron fotogramas, determinando de esta forma, para cada

fotograma, la altura de la espuma y la del líquido subyacente respecto al tiempo.

### **3.3. Factores que condicionan la estabilidad y permanencia de la espuma**

La calidad de un vino espumoso está condicionada en gran medida por sus propiedades espumantes. Conceptos como la espumabilidad o cantidad de espuma producida, y la persistencia de la espuma o el tiempo de estabilidad, son considerados como factores de calidad a la hora de evaluar un vino espumoso.

La formación de espuma no solo se debe al desprendimiento de CO<sub>2</sub>, sino también a la presencia de determinados componentes en el vino que modifican su tensión superficial, o que aumentan la viscosidad del medio (*Hidalgo, 2011*). En consecuencia, todos los componentes del vino que ejerzan una influencia sobre estos parámetros, afectarán de forma indirecta a sus características espumantes. La composición química del mosto y del vino, que es dependiente de la variedad y del grado de madurez de la uva, incidirá del mismo modo en la calidad de la espuma. Asimismo, las condiciones de vinificación (*Cilindre y col., 2010*), y en especial, de estabilización (*Vanrell, 2002*), también tendrán un efecto sobre las características espumantes.

#### **3.3.1. Influencia de la composición del vino**

En la bibliografía científica se pueden encontrar numerosos estudios que abordan la incidencia de los diversos componentes del vino sobre sus propiedades espumantes (*Brissonet y Maujean, 1993; Pueyo y col., 1995; López-Barajas y col., 2001; Gallart y col., 2002; Vanrell y col., 2002; Coelho y col., 2011; Martínez-Lapuente y col., 2015*). Incluso se han formulado ecuaciones matemáticas de predicción de las propiedades espumantes en función de la

## INTRODUCCIÓN

---

composición química del vino (*López-Barajas y col., 1999*). Sin embargo, se puede afirmar que estos estudios no son del todo concluyentes, e incluso se llega a conclusiones contradictorias al comparar unos estudios con otros. No obstante, sí que existe un consenso general sobre la influencia de ciertos componentes del vino sobre sus propiedades espumantes.

En el presente apartado se aborda de manera específica los componentes del vino que parecen ejercer una mayor incidencia sobre las características de la espuma.

### 3.3.1.1. El etanol

Las burbujas que constituyen el collar formado sobre la superficie del vino están sujetas a fenómenos de inestabilidad, como comentamos con anterioridad en el apartado 3.1 de esta memoria. Estos mecanismos a su vez están controlados por la formación de una capa de adsorción compuesta por las moléculas tensoactivas presentes en el vino, que se ubican en la interfase gas/líquido de las burbujas. Estas sustancias, de carácter anfipático, rodean la película superficial de las burbujas ejerciendo un papel muy importante en la estabilidad de la espuma (*Bamforth, 1985; Schramm, 2005*).

El etanol es una molécula tensoactiva que participa en la interfase gas/líquido de las burbujas, ejerciendo una gran influencia sobre su estabilización (*Hidalgo, 2011*). Algunos autores han descrito que, en concentraciones bajas, el etanol puede actuar de forma positiva sobre la estabilidad de la espuma. Tal sería el caso de algunas cervezas (*Brierley y col., 1996*). No obstante en el caso de los vinos espumosos, dado que contienen una mayor concentración de etanol, este ejerce siempre un efecto negativo (*Dussaud y col., 1994; Girbau-Sola y col., 2002; Esteruelas y col., 2015*). De hecho, se ha descrito que a la concentración habitual del etanol en los vinos espumosos (entorno al 12 % v/v), este

compuesto disminuye la tensión superficial del vino a un valor de alrededor de 49 mN/m (*Péron y col., 2000*).

El etanol también influye en la participación de las proteínas y de los lípidos en la interfase gas/líquido de las burbujas, afectando por tanto al comportamiento espumante del vino (*Vanrell, 2002*). En el caso de las proteínas, el etanol actúa como agente desnaturalizante debilitando las uniones hidrofóbicas entre las cadenas proteicas (*Canals, 1997; Senee y col., 1999*). Y en el caso de los lípidos, incide sobre el estado físico en que estos puedan encontrarse en el vino (*Dussaud y col., 1994; Vanrell, 2002*).

En el proceso de elaboración de los vinos espumosos la concentración de etanol se ve incrementada, respecto a la del vino base de partida, en la segunda fermentación. Este incremento produce una reducción de la espumabilidad (HM) del vino, del orden del 50 %, y un aumento del tiempo de estabilidad de la espuma (TS), lo que indica que este último parámetro se ve afectado por otros fenómenos que tienen lugar durante la segunda fermentación en botella (*Vanrell, 2002*).

### **3.3.1.2. Las proteínas**

Pertenecen al grupo de biomoléculas presentes en el vino, y fueron los primeros compuestos correlacionados con las características de la espuma debido a sus propiedades tensoactivas (*Brissonet y Maujean, 1993*). Gracias a estas propiedades, forman capas de adsorción y estabilizan la interfase gas/líquido a las concentraciones usuales del etanol (*Bamforth, 1985; Brissonet y Maujean, 1991; Moreno-Arribas y col., 2000*).

A parte de estar implicadas en las denominadas quiebras proteicas, las proteínas aportan untuosidad al vino, fijan los aromas e incrementan la

## INTRODUCCIÓN

---

formación de espuma (*Esteruelas y col., 2009a*). De igual modo que participan en la resistencia y elasticidad de la película superficial que rodea a las burbujas (*Malvy y col., 1994*).

Hay estudios que corroboran la existencia de una relación entre la concentración de proteínas y la calidad de la espuma de los vinos espumosos, medida mediante el método Mosalux (*Brissonnet y Maujean, 1993; Pueyo y col., 1995; Esteruelas y col., 2015*). La mayoría de estos trabajos indican una correlación positiva entre la concentración de proteínas, y la altura máxima de la espuma o espumabilidad (HM). Sin embargo, respecto a la altura estable o estabilidad de la espuma (HS) los resultados no son tan claros, debido a que algunos autores hablan de un efecto positivo (*Malvy y col., 1994*) y otros describen una influencia negativa (*Andrés-Lacueva y col., 1996b*).

Asimismo, la eliminación de proteínas causada durante la clarificación con bentonita afecta de manera drástica a las características espumantes del vino (*Malvy y col., 1994; Vanrell y col., 2002; Vanrell y col., 2005*). De forma similar, *Vanrell y colaboradores (2007)* observaron que la utilización de bentonita como coadyuvante de removido en los vinos espumosos, provocaba una fuerte disminución del contenido en proteínas. Este hecho daba lugar a una disminución significativa de los valores de HM y HS en los vinos base así como en los correspondientes Cavas elaborados sin adición de benonita.

### **3.3.1.3. Los polisacáridos y las manoproteínas**

Además de contribuir a las sensaciones de cuerpo y volumen en boca, los polisacáridos también pueden influir en las características espumantes de los vinos espumosos, dada su influencia sobre la viscosidad del vino (*Vidal y col., 2004; Gawel y col., 2016; Culbert y col., 2017*).

Los polisacáridos presentes en el vino pueden proceder de las uvas, de las levaduras y bacterias, de la adición exógena (derivados de levaduras, goma arábica y/o carboximetil celulosa), e incluso de hongos filamentosos como *Botrytis cinerea*. Sin embargo, desde un punto de vista enológico y cuantitativo, los polisacáridos más importantes son los que provienen de las uvas y de las levaduras (*Martínez-Lapuente y col., 2013*).

No obstante, no todos los polisacáridos tienen el mismo comportamiento en el vino. Factores como la cantidad, el tamaño o el tipo de polisacárido determinarán, en gran medida, su impacto sobre las propiedades sensoriales y espumantes del vino (*Martínez-Lapuente y col., 2013; Culbert y col., 2017*). Estudios realizados por *Moreno-Arribas y colaboradores (2000)* demostraron que tanto el contenido total de polisacáridos como los polisacáridos neutros, correlacionaban de forma significativa con la espumabilidad (HM) y la estabilidad de la espuma (HM). En cambio, los polisacáridos ácidos no mostraban ninguna correlación significativa con ninguno de estos parámetros. Por otra parte, *López-Barajas y colaboradores (2001)* expusieron que los polisacáridos de masas moleculares comprendidas entre 62 y 48 kDa, 13 y 11 kDa, y 3 y 2 kDa parecían incrementar los valores de la espumabilidad (HM). Además, la fracción de polisacáridos de masa molecular entre 3 y 2 kDa podría participar además en la estabilidad de la espuma (HS). A su vez, *Martínez-Lapuente y colaboradores (2015)* expresaron que el contenido total de polisacáridos, así como los polisacáridos procedentes de las uvas y de las levaduras, no mostraban ninguna correlación significativa con HM y HS, solo la manifestaban con el tiempo de estabilidad de la espuma (TS).

Entre los polisacáridos del vino, destacan las glicoproteínas por su participación en las características espumantes de los vinos espumosos, siendo su efecto aún



## INTRODUCCIÓN

---

más acusado que el de las proteínas (*Martínez-Lapuente y col., 2015*). Entre las glicoproteínas que podemos encontrar en el vino, las manoproteínas de levadura, liberadas durante la fermentación y especialmente la autólisis, han sido estudiadas en los últimos años por su capacidad de mejorar las propiedades espumantes de los vinos espumosos (*Nuñez y col., 2005, 2006; Coelho y col., 2011; Pérez-Magariño y col., 2015*).

Es un hecho generalmente aceptado que los vinos espumosos elaborados por el método tradicional y sometidos a largas crianzas dan lugar a una espuma muy persistente, y a una efervescencia muy integrada. Este efecto ha sido relacionado con el enriquecimiento en manoproteínas que sufren estos vinos como consecuencia de la autólisis (*Pérez-Magariño y col., 2015*). No obstante, la crianza sobre lías conlleva un importante coste económico y de tiempo. Por esta razón, se ha propuesto el uso de derivados de levaduras para enriquecer, de forma más rápida, los vinos espumosos en manoproteínas (*Nuñez y col., 2006; Rodríguez-Nogales y col., 2012; Pérez-Magariño y col., 2015*).

Estudios realizados por *Nuñez y colaboradores (2005 y 2006)* ponen de manifiesto que el enriquecimiento de un vino espumoso con un extracto térmico de manoproteínas, contribuye a mejorar sus propiedades espumantes. Otros autores obtuvieron asimismo resultados similares (*Vanrell y col., 2005; Martí-Raga y col., 2016*).

Por el contrario, *Pérez-Magariño y colaboradores (2015)* exhibieron que la adición de productos comerciales, enriquecidos en manoproteínas, durante el envejecimiento de los vinos espumosos, no modificaban, en general, las características espumantes de los vinos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos autores elaboraron los vinos espumosos con una dosificación de

bentonita, como coadyuvante de tiraje, cinco veces superior a la habitual (10 g/hl), lo que podría explicar los resultados obtenidos en el estudio.

#### **3.3.1.4. Los lípidos**

Se ha descrito que los lípidos intervienen en el aroma y sabor de los vinos, aunque los resultados son contradictorios en cuanto a sus efectos sobre la espumabilidad (*Hidalgo, 2011*). La mayoría de los estudios existentes en la bibliografía, que abordan su influencia sobre la espuma, están llevados a cabo en cerveza (*Bamforth, 1985; Dussaud y col., 1994; Bravi y col., 2014*), siendo pocos los trabajos que tratan este efecto en los vinos espumosos (*Pueyo y col., 2000; Robillard, 2002; Vanrell y col., 2002*).

*Dussaud y colaboradores (1994)* estudiaron el comportamiento de la espuma cuando se añadía una mezcla de lípidos comerciales a vinos base, con diferentes concentraciones de etanol (2 %, 5 % y 11,3 % v/v). Demostraron que para una concentración del 11,3 % v/v la adición de lípidos comerciales no afectaba de forma significativa a la calidad de la espuma, rigiéndose principalmente por la concentración de etanol.

Por otra parte, *Brissonet y Maujean (1991)* expusieron que los lípidos de cadena corta se concentraban en la espuma del vino. Este hecho llevó a pensar que los lípidos en el vino no se hallan formando micelas sino que se encuentran disueltos por el efecto del etanol, y/o formando complejos con otras moléculas como los glúcidos o las proteínas (*Dussaud y col., 1994*).

También *Vanrell (2002)* experimentó con añadir determinados ácidos grasos (C12 y C18:1) al vino, a una concentración de 10 mg/L, para estudiar su influencia sobre la espuma. Observó que ambos ácidos grasos provocaban un descenso de la espumabilidad (HM), siendo aún más acusada para el ácido C12.

## INTRODUCCIÓN

---

Respecto a la estabilidad de la espuma (HS) resultó ser incrementada, de forma leve y en igual proporción, para los dos ácidos grasos. El principal cambio se percibió para la estabilidad de la espuma (TS), la cual experimentó un declive muy drástico, y con igual tendencia al añadir uno u otro ácido graso.

Por otro lado, estudios de *Pueyo y colaboradores (1995)* permiten afirmar que el ácido C18:3 y el ácido C16 eran muy buenos estabilizadores de la espuma, tanto para vino como para Cava. Gallart y colaboradores (2002) demostraron que la espumabilidad (HM) se correlacionaba de forma negativa con la presencia de los ácidos grasos libres C8, C10 y C12, existiendo una correlación positiva con HM cuando los ácidos grasos se encontraban como ésteres etílicos. Para el caso de la estabilidad de la espuma (HS) y el tiempo de estabilidad (TS), no encontraron diferencias significativas.

Se puede concluir, por tanto, que los resultados publicados hasta ahora son discordantes, siendo necesaria la realización de más estudios que profundicen en la contribución que los lípidos puedan ejercer sobre la espuma del vino.

### **3.3.2. Influencia de la variedad vinífera**

Las regiones productoras de vinos espumosos a nivel mundial utilizan distintas variedades de uva para elaborar sus vinos. La variedad de uva es considerada como uno de los factores principales que influyen en el carácter de los vinos espumosos, junto con la ubicación del viñedo y la autólisis de la levadura (*De La Presa-Owens y col., 1998*).

Tradicionalmente, los vinos espumosos de la D.O. Cava se elaboraban en general con las variedades blancas Macabeo, Xarel·lo y Parellada. Sin embargo, en las últimas décadas han cobrado relevancia otras variedades de uva como la variedad blanca Chardonnay y la variedad tinta Pinot Noir. Además, los

elaboradores de vino consideran que estas dos últimas variedades dan lugar a vinos espumosos con mejores propiedades espumantes, y de hecho hay evidencias científicas que lo confirman (*Andrés-Lacueva y col., 1996a; Marchal y col., 2001*).

Estudios llevados a cabo por *Andrés-Lacueva y colaboradores (1996a)*, sobre el efecto de la variedad y del *coupage* en la elaboración del Cava, concluyeron que la variedad de uva seleccionada es una variable decisiva en la espumabilidad del vino. Asimismo comprobaron que los vinos elaborados con la variedad Chardonnay presentaban los valores más altos de espumabilidad (HM) y estabilidad de la espuma (HS), con menores valores de tiempos de estabilidad (TS) con respecto a otros vinos elaborados con variedades como Macabeo, Xarel·lo y Parellada. Del mismo modo, las mezclas elaboradas con la variedad Chardonnay dieron un valor de HM superior al de las mezclas realizadas sin incluir esta variedad. Igualmente, *López-Barajas y colaboradores (1997)* demostraron que los mostos varietales de Chardonnay presentaban las mejores propiedades espumantes. Sin embargo, dicha espumabilidad no fue representativa de los valores de HM de sus correspondientes vinos base, variando estos en función del año de cosecha (*López-Barajas y col., 1998*).

También, *Vanrell y colaboradores (2007)* demostraron que los vinos base de Chardonnay y Pinot Noir (elaborado como *Blanc de Noirs*) presentaban valores de HM y HS superiores, de forma significativa, a los elaborados con las variedades tradicionales, y lo correlacionaban con un mayor contenido en proteínas.

En los últimos años, otras variedades blancas españolas como el Verdejo, Malvasia Riojana, Albarín, Godello, Garnacha y Prieto Picudo han sido recomendadas para la elaboración de vinos espumosos de alta calidad. Además,

## INTRODUCCIÓN

---

Prieto Picudo, Albarín y Verdejo han sido consideradas como las variedades más prometedoras por presentar un perfil sensorial muy pronunciado (*Martínez-Lapuente y col., 2013*). Asimismo, los vinos espumosos elaborados con estas tres variedades, incluyendo la variedad Viura, han dado los valores más altos de HM, HS y TS (*Martínez-Lapuente y col., 2015*).

### 3.3.3. Influencia del estado sanitario

Es generalmente aceptado que la presencia de podredumbre gris (enfermedad causada por el hongo *Botrytis cinerea*) en la vendimia, afecta a la calidad de la espuma. Por esta razón, la D.O. Cava limita los niveles de ácido glucónico, considerado como un marcador de la presencia de *Botrytis cinerea* (*Canals y col., 2010*), a 600 mg/L para evitar que los vinos de uvas muy afectadas se utilicen en la elaboración del Cava.

*Marchal y colaboradores (2001)* estudiaron el efecto de distintos niveles de infección por *Botrytis cinerea* (0, 20 y 40 %), sobre las propiedades espumantes de diferentes *Champagnes* (elaborados con Chardonnay, Pinot Noir y Pinot Meunier). Demostraron que cuando el grado de infección aumentaba las propiedades espumantes de los vinos decrecía, debido a la secreción de proteasas por parte del hongo *Botrytis cinerea* (*Hong y col., 2011*), que degradan las proteínas de la uva. Del mismo modo, *Esteruelas y colaboradores (2015)* confirmaron que la espumabilidad (HM) correlacionaba de forma negativa con la concentración de ácido glucónico.

Por todo lo expuesto, se puede concluir que el control sanitario de la vendimia es un factor de extrema importancia en la elaboración de vinos espumosos.

### 3.3.4. El grado de madurez de la uva

El grado de madurez de las uvas es uno de los factores más importantes de cara a la calidad del vino. Normalmente es definido por el enólogo en función de la variedad, lugar de crecimiento de la uva o del tipo o estilo de vino que se elaborará (madurez tecnológica). Así, las características del mosto obtenido estarán condicionadas por este grado de madurez que a su vez fijará otros parámetros, como la concentración de azúcares, la acidez total o el pH, además de la concentración de otras sustancias como las proteínas, los polisacáridos o los polifenoles (*Hidalgo, 2011*).

*López-Barajas y colaboradores (1997)* comprobaron que el comportamiento de la espuma de los mostos estudiados, dependía del año de cosecha. Además, concluyeron que los mostos que presentaban un índice de maduración, entendido como la relación entre el contenido de sólidos solubles (° Brix) y la acidez titulable (gramos de ácido tartárico por litro de mosto), entre 4 y 5,5 proporcionaban las mejores propiedades espumantes.

También, *Esteruelas y colaboradores (2015)* estudiaron el efecto de la madurez de la uva en tres variedades de uva (Macabeo, Xarel·lo, Parellada y Chardonnay). Este estudio se efectuó durante dos vendimias, y los mostos con diferente nivel de madurez fueron igualados en contenido de azúcar y acidez, con el objetivo de determinar el efecto de la madurez sin que el contenido en etanol y la acidez de los vinos influyesen en el estudio. Los resultados mostraron que las vendimias menos maduras generaban vinos base y Cavas con mejores propiedades espumantes.

Por tanto, se puede afirmar que, por norma general, un exceso de madurez es negativo para la calidad de la espuma, y que este hecho incluso no solo se debe a un mayor contenido en alcohol de las vendimias más maduras.

---

## INTRODUCCIÓN

---

### 3.3.5. Las condiciones de elaboración

No solo la composición química de un mosto o un vino determinan las características espumantes del vino, también la metodología empleada durante su elaboración afecta a su comportamiento espumante. Además, la composición química también se ve influenciada por otros aspectos como las operaciones pre y post-fermentativas realizadas durante la elaboración del vino.

Teniendo en cuenta el papel de las proteínas en las propiedades espumantes, durante el proceso de prensado se debe evitar la extracción de compuestos fenólicos de las partes sólidas de la uva, ya que estos pueden reaccionar con las proteínas del mosto y provocar su eliminación, afectando de forma negativa a la espumabilidad del vino base (*Hardy, 1992*).

En la región de Champagne (Francia) se ha comprobado que alrededor del 5 % del mosto obtenido al principio del proceso presenta valores de HM, HS y TS casi nulos, dando los valores máximos al final del primer ciclo de prensado (*Poinsaut, 1991*). Por esta razón, los primeros litros de mosto nunca se incluyen en la *Cuvée*. Con esto se puede concluir que, además de sustancias favorables para la espuma, el mosto debe contener sustancias con propiedades antiespumantes.

Tras el proceso de prensado, el mosto presenta un aspecto turbio. En la elaboración de vinos blancos (que es la misma que para vinos espumosos), el vino debe estar completamente limpio. Es una forma de prevenir que las sustancias presentes en las pieles, semillas o peciolo se solubilizan y aporten notas vegetales y amargas al vino (*Hidalgo, 2011*). Con el desfangado, que radica en la sedimentación espontánea de dichas partículas sólidas, se consigue un vino limpio. Sin embargo, en ocasiones, y para acelerar este proceso, se

adiciona, de forma controlada, al mosto diferentes productos con capacidad para flocular, sedimentar y arrastrar las partículas que se encuentran en suspensión. Además, estos productos pueden tener también un efecto estabilizante y suponer, en algunos casos, una mejora a nivel organoléptico.

De entre todos los tratamientos existentes para la clarificación, nos centraremos a continuación en explicar el uso del carbón activo y la bentonita. Ambos clarificantes son muy utilizados en la AOC *Champagne*, dado que elaboran de forma mayoritaria vinos blancos a partir de uvas tintas como Pinot Noir y Pinot Meunier (*Blanc de Noirs*).

En enología, el carbón activo se utiliza para reducir de forma selectiva el color de los mostos y los vinos, evitar el pardeamiento de los vinos blancos, y eliminar olores desagradables, por adsorción específica de las moléculas responsables (*Hidalgo, 2011*). Por tanto, es una técnica muy aplicada para decolorar vinos blancos con tonalidades amarillo-paja o amarillo-rosáceo, y en la elaboración de los vinos *Blanc de Noirs*, para corregir una extracción excesiva de color.

La bentonita es una arcilla del tipo de montmorillonita que se caracteriza por ser un intercambiador de cationes. En el mosto, se utiliza durante el desfangado, al facilitar la clarificación por eliminación de ciertos coloides; y en vinos, su principal función es la de eliminar las proteínas responsables de la quiebra proteica (*Hidalgo, 2011*). En la elaboración de vinos espumosos, la bentonita es un elemento esencial durante la etapa de removido, al facilitar la sedimentación y la separación de las lías.

Existe un estudio comparativo, llevado a cabo por *Maujean y colaboradores (1990)*, sobre el efecto que provoca la adición de carbón activo o bentonita sobre las propiedades espumantes del vino. En este trabajo observaron que

---



## INTRODUCCIÓN

---

añadidos en iguales dosis, el carbón activo tiene un efecto negativo aún más acusado que la bentonita sobre la espumabilidad (HM). En cambio, la estabilidad de la espuma (HS) se ve favorecida con el uso del carbón activo.

### 3.3.6. Las levaduras y el tiempo de crianza sobre lías

En la elaboración de un vino espumoso por el método tradicional, la cepa de levadura utilizada para llevar a cabo la segunda fermentación afecta a su posterior proceso de autólisis y por tanto, a la composición final del vino (*Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006*). Las principales diferencias entre las cepas de levadura no solo radican en la velocidad de la autólisis, sino también en la cantidad y la naturaleza de los compuestos liberados al medio durante este proceso (*Feuillat y Charpentier, 1982*).

*Martí-Raga y colaboradores (2016)* estudiaron el efecto de diferentes cepas de levadura (PDM, ARM y P29) y el tiempo de crianza sobre las propiedades espumantes en la elaboración de vinos espumosos. Concluyeron que tanto la cepa de levadura como el tiempo de envejecimiento influyen de forma significativa sobre los valores de HM y HS. Para un mismo período de crianza, los vinos base fermentados con la cepa P29 obtuvieron los valores más altos de HM, y los vinos fermentados con la cepa PDM mostraron los valores más elevados de HS a los nueve meses de envejecimiento. En relación al efecto del tiempo de crianza sobre las características espumantes, HM y HS disminuyeron a los nueve meses de crianza con respecto al vino base. Sin embargo, al incrementar el tiempo de crianza a dieciocho meses, HM decreció y HS se vio incrementada. Finalmente, la ampliación del tiempo de envejecimiento compensó las diferencias de espumabilidad entre las cepas seleccionadas, no observándose diferencias significativas en HM, pero en especial en HS.

Por otra parte, *Pérez-Magariño y colaboradores (2015)* estudiaron cómo afecta el tiempo de crianza sobre lías a la espumabilidad de los vinos espumosos (blancos y rosados). Comprobaron que el tiempo de crianza mejoraba los parámetros de la espuma (HM, HS y TS) hasta los 18 o 30 meses. Del mismo modo, *Andrés Lacueva y colaboradores (1996a y 1997)* y *Moreno-Arribas y colaboradores (2000)* observaron que las propiedades espumantes dependían del tiempo de envejecimiento, aumentando la espumabilidad (HM) y la estabilidad de la espuma (HS) a los 18 meses de crianza sobre lías. A partir de ese tiempo, los vinos mostraban una disminución en HM y un aumento en HS, afirmando así que el tiempo óptimo de envejecimiento para lograr una espuma de calidad es de 18 meses. Estos autores además sugirieron que el incremento de HM podría ser debido al proceso de autólisis de las levaduras, de acuerdo con los resultados obtenidos por *Maujean y colaboradores (1990)*.

#### **4. Preparados de levaduras secas inactivadas**

La crianza del vino sobre lías es una técnica de envejecimiento tradicional, que tuvo su origen en la elaboración de vinos blancos fermentados en barrica en Borgoña (Francia). Más tarde fue aplicada a la elaboración de vinos espumosos naturales (*Champagne, Cava*) y a vinos de crianza biológica como los de Jerez.

Hoy en día la crianza sobre lías es una herramienta tecnológica muy extendida en todas las zonas vitivinícolas, al producir vinos más equilibrados y finos, de mayor complejidad aromática y cualidades gustativas (*Hernández y col., 2006*).

La importancia de envejecer un vino sobre lías radica en que durante este período tiene lugar la autólisis de las levaduras, liberándose una importante

## INTRODUCCIÓN

---

dotación enzimática intracelular en respuesta a determinadas señales bioquímicas que preceden a la muerte celular.

La autólisis comienza con el fin de la fase de fermentación tumultuosa. En esta etapa, el contenido en nutrientes es reducido y las células pierden progresivamente la capacidad para multiplicarse. En este estado, los constituyentes celulares de las levaduras empiezan a autodegradarse, por acción enzimática, cediendo moléculas y biopolímeros al medio y como resultado, la composición química del vino se ve modificada.

Compuestos como polisacáridos, proteínas, péptidos y aminoácidos libres, lípidos, nucleótidos y nucleósidos (*Comuzzo y col., 2015*) son liberados, siendo, según algunos estudios publicados, los responsables de la estabilidad del color, la disminución de la astringencia, la protección del vino frente a la oxidación o de una mayor complejidad aromática y “flavor” del vino (*Pozo-Bayón y col., 2009*).

Sin embargo, la autólisis natural de las levaduras es un proceso lento y costoso que requiere años incluso para completarse, no estando exento de riesgos microbiológicos y organolépticos. Por esta razón, en los últimos años está ganando interés el uso de preparaciones comerciales que incluyan en su composición productos liberados durante la autólisis de las levaduras, con el fin de conseguir efectos similares a los obtenidos durante la crianza sobre lías. Actualmente, estos preparados a base de levaduras secas inactivadas (LSI) son comercializados por diferentes empresas del sector biotecnológico, siendo comúnmente utilizados por la industria enológica.

Los preparados de LSI que pueden encontrarse en el mercado son principalmente levaduras inactivadas, autolisados de levaduras, paredes o cortezas de levaduras y extractos de levaduras. Todos ellos se incluyen bajo el

nombre genérico de preparados de LSI, aunque dependiendo de la casa comercial que los suministre pueden recibir diferentes nombres. No obstante, a lo largo de esta memoria emplearemos el término de preparados de LSI para referirnos a todo este tipo de productos.

#### **4.1. Producción de preparados de LSI**

El proceso de producción de derivados de levadura consiste en hacer crecer una cepa de levadura vínica *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada, en un medio rico en azúcares y en condiciones aerobias. Tras la obtención de la biomasa, las levaduras crecidas son recogidas, lavadas y sometidas al proceso de lisis (autólisis, termólisis, plasmólisis o hidrólisis ácida), siendo la autólisis el más utilizado (Comuzzo y col., 2012). Durante esta etapa tiene lugar la degradación celular de las levaduras por sus propias enzimas, en condiciones de pH y temperatura controladas. También es posible añadir enzimas de degradación al medio (proteasas y/o  $\beta$ -glucanasas), para acelerar el proceso de disrupción celular (Comuzzo y col., 2012). Transcurrida la autólisis, se pueden obtener diferentes preparados de LSI, en concreto, levaduras inactivadas, autolisados, extractos y cortezas de levadura (Andújar-Ortiz, 2011).

Las levaduras inactivadas se obtienen por inactivación térmica de las levaduras y posterior secado, tratándose por tanto de levaduras inviables y sin capacidad fermentativa. Al destruirse los enzimas responsables del proceso de autólisis durante la inactivación térmica, son preparados que prescinden de la degradación de los componentes celulares de la autólisis. Los autolisados de levadura se consiguen por secado de todo el lisado, y están compuestos por una fracción soluble formada en su mayoría por contenido citoplasmático (aminoácidos, péptidos, etc.), y una fracción insoluble compuesta principalmente por las paredes y membranas celulares de la levadura. Los

## INTRODUCCIÓN

---

extractos de levadura, por el contrario, se adquieren mediante la degradación total del contenido citoplasmático durante la autólisis, y posterior separación de la fracción insoluble. Y por último, las cortezas de levadura se obtienen por centrifugación de los extractos de levaduras y posterior descarte de la fracción soluble (Comuzzo y col., 2012).

La fabricación de preparados de LSI concluye con la etapa de secado, donde “roller drying” o “spray drying” son los procesos de secado más habituales. El producto final obtenido es un sólido en forma de polvo fácilmente dosificable en el vino.

De entre todas estas preparaciones comerciales, cabe destacar las manoproteínas por ser objeto de muchos estudios científicos. Las manoproteínas son glucoproteínas que constituyen la capa externa de la pared celular de las levaduras enológicas, en especial de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las manoproteínas de levaduras comerciales se obtienen a partir de la pared celular de las levaduras, o de las levaduras secas activadas enteras por tratamientos enzimáticos o físico-químicos. Respecto a los autolisados o extractos de levaduras, son productos que han sido sometidos a tratamientos de purificación adicionales (Comuzzo y col., 2012). Los diversos procesos empleados para su obtención junto con la heterogeneidad de este grupo de compuestos, hacen que muchas de estas preparaciones comerciales difieran en peso molecular y en composición química (porcentaje de azúcar, proteína, aminoácidos, etc.). Aun así son uno de los aditivos más utilizados en vinificación para mejorar los procesos tecnológicos, y las características sensoriales de los vinos (Pozo-Bayón y col., 2009).

## **4.2. Aplicaciones de los preparados de LSI en vinificación**

La finalidad de estos preparados de LSI en vinificación es mejorar los procesos tecnológicos, las características organolépticas de los vinos y la eliminación de agentes contaminantes de los mismos. Por ello, y dependiendo de su función en el vino, cada preparado comercial de LSI presenta una composición específica, en cuanto a su contenido en pared celular, manoproteínas solubles y compuestos específicos, tales como micronutrientes, esteroides, glutatión, etc (*Andújar-Ortiz, 2011*).

Aunque todos estos productos derivados de la levadura prometen mejoras muy específicas en el vino, existen pocos estudios científicos que evalúen sus efectos.

En las siguientes secciones se describirán las diferentes aplicaciones de los preparados comerciales de LSI y sus efectos en el vino, teniendo en cuenta la evidencia científica actual relacionada con su modo de acción.

### **4.2.1. Efectos sobre la fermentación alcohólica**

En la actualidad, una de las principales aplicaciones de los preparados de LSI es mejorar los procesos fermentativos del vino. Como potenciadores de la fermentación, su acción se basa en dos mecanismos de acción diferentes: el primero está relacionado con el efecto protector que ejercen las LSI durante la hidratación de las levaduras secas activas (LSA), y el segundo, con su capacidad para estimular las fermentaciones alcohólica y maloláctica (*Pozo-Bayón y col., 2009*).

Durante los procesos de secado y rehidratación de las LSA, las membranas de las levaduras pueden sufrir daños al estar sometidas a cambios estructurales y a transformaciones funcionales (*Beker y col., 1984*), pudiendo llegar a perder

## INTRODUCCIÓN

---

hasta un 30 % de determinados compuestos intracelulares, por incrementarse la permeabilidad de su membrana plasmática.

Existen diversos preparados comerciales de LSI capaces de liberar esteroides y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) cuando son añadidos al agua de rehidratación (*Andújar-Ortiz, 2011*). Los esteroides se incorporan a la membrana plasmática de las LSA mejorando su composición lipídica y reparando los posibles daños. Por otro lado, los PUFAs reducen el choque osmótico de las LSA ocasionado por el alto contenido en azúcares del mosto, y favorecen la adaptación metabólica de las células a las nuevas condiciones (*Caridi, 2002*). Por tanto, mediante el uso de LSI, durante el proceso de hidratación de las levaduras secas activas, se puede mejorar la viabilidad de las levaduras.

No obstante, para que la fermentación alcohólica se desarrolle con éxito se requiere una cantidad mínima de nitrógeno en el medio, para que las levaduras puedan formar sus estructuras celulares y reproducirse. Una deficiencia en nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) puede conducir a una disminución de la velocidad de la fermentación, e incluso a paradas de la misma (*Kunkee, 1991*).

Por esta razón, en los últimos años se ha extendido el uso de preparados de LSI como fuente de nitrógeno orgánico (aminoácidos principalmente). En su mayoría, estas preparaciones comerciales están formadas por una fracción soluble (metabolitos citoplasmáticos) y una fracción insoluble (paredes de levadura y celulosa), además de contener vitaminas y minerales. La diferente composición de este tipo de preparados hace que tengan diferentes efectos en la fermentación. En este sentido se ha comprobado que la adición de preparados de LSI a mostos sintéticos deficientes en nitrógeno (NFA<150 mg/L), promueve la fermentación alcohólica debido al aporte de compuestos nitrogenados (*Feuillat y Guerreau, 1996*).

Además de servir como fuente nutricional al mosto, los preparados de LSI aportan esteroides y ácidos grasos de cadena larga que son utilizados por las levaduras como activadores de crecimiento. Ambos compuestos se encuentran de forma natural en el mosto, pero durante el proceso de desfangado su concentración se ve reducida. En condiciones anaerobias las levaduras no son capaces de sintetizar esteroides y ácidos grasos (*Ciesarová y col., 1996; Valero y col., 1998*), pero si pueden incorporarlos de manera exógena.

Por último comentar que los preparados de LSI, como activadores de la fermentación alcohólica, también pueden suplementar al mosto en vitaminas y minerales (*Pozo-Bayón y col., 2009*), estimulando así el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y actuando como cofactores de las reacciones enzimáticas (*Andújar-Ortiz, 2011*).

Otra de las funciones de los preparados de LSI es la de eliminar compuestos tóxicos. Los primeros preparados de LSI propuestos para tal fin fueron las paredes o cortezas de levadura. Al pH del vino, las manoproteínas, que forman las paredes de las levaduras, se encuentran con carga negativa, pudiendo establecer interacciones electrostáticas e iónicas con otros compuestos (*Caridi, 2006*). Entre los compuestos que son capaces de adsorber se encuentran los productos fitosanitarios, los ácidos grasos de cadena corta y los compuestos inhibidores del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (*Lafon-Lafourcade y col., 1984; Feuillat y Guerreau, 1996*).

#### **4.2.2. Efectos sobre la fermentación maloláctica**

La fermentación maloláctica (FML) del vino es un proceso esencial en vinos tintos y en algunos vinos blancos donde la acidez es excesiva. Los preparados de LSI que se comercializan para la FML aportan una mayor disponibilidad de nutrientes, una estimulación del crecimiento de las bacterias lácticas (BAL), y



## INTRODUCCIÓN

---

una reducción del tiempo necesario para que se complete la FML. En su composición, estos preparados pueden incluir levaduras inactivadas ricas en aminoácidos, minerales, cofactores y vitaminas, así como celulosa para mantener las BAL en suspensión y complementar la adsorción de compuestos tóxicos (*Andújar-Ortiz, 2011*).

La estimulación que producen los preparados de LSI respecto al crecimiento de las BAL podría deberse al suplemento nutricional, en aminoácidos y péptidos, que proporcionan al vino (*Guilloux-Benatier y Chassagne, 2003*). En lo que se refiere a la eliminación de sustancias tóxicas, las responsables de este efecto podrían ser las paredes de levadura, por su poder de adsorción, incluidas también en estos preparados (*Guilloux-Benatier y col., 1995*).

### 4.2.3. Estabilización tartárica y proteica

La quiebra proteica y la cristalización de las sales del ácido tartárico son dos alteraciones fisicoquímicas del vino que dan lugar a precipitaciones en el producto final.

La quiebra proteica se debe a la presencia de proteínas de bajo peso molecular (10-30 kDa), principalmente quitinasas, *thaumatin-like proteins* y  $\beta$ -glucanasas (*Esteruelas y col., 2009b*) consideradas inestables.

Existen numerosos tratamientos para las quiebras proteicas (precipitantes, adsorbentes, hidrolizantes o estabilizantes), entre los que cabe destacar la eliminación de las proteínas por adsorción mediante el uso de bentonita. Sin embargo, el empleo de bentonita como clarificante mineral no está exento de ciertas desventajas, como son la eliminación de compuestos responsables del aroma (*Martínez-Rodríguez y Polo, 2003; Pozo-Bayón y col., 2003*) o la merma del vino debido a las altas dosis de bentonita requeridas para su estabilización.

En la búsqueda de alternativas al uso de bentonita se encuentran el óxido de zirconio (*Salazar y col., 2006*), las enzimas proteolíticas (*Marangon y col., 2012*) o el uso de manoproteínas (*Dufrechou y col., 2015*).

Las manoproteínas comerciales fueron propuestas para mejorar la quiebra proteica, al demostrarse que los vinos blancos envejecidos sobre lías mostraban una mayor estabilidad frente a las proteínas como consecuencia de la liberación de manoproteínas (*Ledoux y col., 1992*). Sin embargo, el mecanismo de acción de las manoproteínas frente a la quiebra proteica no está del todo claro, aunque ha sido asociado a la actividad invertasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*Moine-Ledoux y Dubourdieu, 1999*).

La inestabilidad tartárica está relacionada con la presencia en el vino del ácido tartárico, uno de los ácidos mayoritarios de los vinos y el más abundante de los ácidos orgánicos de las uvas. Durante la vinificación y en presencia de los cationes calcio y potasio, este ácido puede llegar a insolubilizarse de forma parcial formando cristales de sales de tartrato, a las temperaturas normales de almacenamiento de los vinos.

Tratamientos como la adición al vino de inhibidores de la cristalización (carboximetilcelulosa) o el uso del poliaspartato de potasio han sido utilizados para evitar las cristalizaciones tartáricas, aunque no todos ellos están exentos de inconvenientes. También se ha comprobado que la adición de manoproteínas comerciales, durante este proceso, inhibe estas cristalizaciones al provocar cambios morfológicos en las sales del ácido tartárico (*Caridi, 2006*).

A parte de las manoproteínas comerciales, existen otros preparados de LSI, basados en autolisados de levaduras, que pueden asimismo mejorar la estabilización proteica y tartárica, al incluir en su composición manoproteínas de levadura (*Andújar-Ortiz, 2011*).

---

## INTRODUCCIÓN

---

No obstante, a pesar de considerar a las manoproteínas como un tratamiento estabilizante tanto de proteínas como de las sales del ácido tartárico, su utilización no garantiza su estabilidad, siendo necesario además el uso de otros tratamientos adicionales (*Zamora, 2005*).

### **4.2.4. Efecto de las LSI sobre el aroma y el color de los vinos blancos y rosados.**

Una de las aplicaciones que mayor interés ha suscitado, por parte de la industria enológica, es la utilización de preparados de LSI para mejorar las características organolépticas del vino. Así, en el mercado se encuentran preparados comerciales de LSI para vinificaciones en blanco y rosado o para vinificaciones en tinto, aunque algunos de ellos no son específicos para un determinado tipo de vino.

Los preparados indicados para vinificación en blanco y rosado suelen incluir glutatión en su composición, y están indicados especialmente en preservar el aroma y el color de los vinos a lo largo de su envejecimiento en botella. Además, ciertos preparados de LSI indicados para vinos blancos contienen polisacáridos en su formulación, con la finalidad de aumentar el volumen en boca de los vinos. Para vinificación en tinto, se recomiendan preparaciones que presenten también polisacáridos, ya que según los fabricantes pueden ser útiles para estabilizar el color durante la crianza y modular la astringencia de los vinos (*Andújar-Ortiz, 2011*).

Las levaduras secas inactivadas ricas en glutatión (g-LSI) han sido propuestas para proteger la calidad organoléptica del vino, durante su almacenamiento, por su alto contenido en glutatión (GSH). Compuestos como ésteres, terpenos y tioles ven disminuida su concentración durante el envejecimiento del vino, ocasionando una pérdida aromática del mismo (*Papadopoulou y col., 2008*). Por tanto, en los últimos años ha aumentado el interés en la utilización de las g-LSI

debido a las propiedades antioxidantes atribuidas al glutatión, y en el papel que puede desempeñar este compuesto en la conservación de la calidad organoléptica de los vinos.

Sin embargo, la forma reducida del glutatión (GSH) es muy inestable en el vino (fácil oxidación, rápida combinación con polifenoles, etc.). Por esta razón, el papel de las g-LSI en la preservación del aroma de los vinos podría atribuirse a otros compuestos diferentes al GSH. *Rodríguez-Bencomo y colaboradores (2014)* demostraron que las LSI (tanto las enriquecidas en GSH como las que no lo contienen), presentan péptidos de pequeño tamaño que exhiben una capacidad antioxidante incluso mayor que el GSH. Por tanto, el efecto antioxidante atribuido a las g-LSI podría deberse fundamentalmente a estos péptidos, siendo también eficaces en la conservación de algunos terpenos durante el envejecimiento de un vino modelo. Por tanto, a la vista de estos resultados, se precisa la realización de más estudios que evalúen el papel de las g-LSI (y el del glutatión en sí).

En vinos rosados jóvenes se ha observado que la adición de g-LSI durante su envejecimiento ejerce un impacto directo sobre su perfil volátil. Así, estos vinos son más intensos en cuanto a aromas frutales, lo que podría estar relacionado con la protección de algunos de estos compuestos aromáticos frente a la oxidación (*Andújar-Ortiz y col., 2014*).

A parte de preservar el aroma de los vinos, los preparados de g-LSI también están indicados para proteger el color de los vinos blancos y rosados con el paso del tiempo. El papel que ejerce el glutatión frente al color de los vinos está relacionado con el pardeamiento de mostos y vinos. El glutatión reacciona con la o-quinona del ácido caftárico formando el ácido 2-S-glutationilcaftárico o GRP (Grape Reaction Product), paralizando la reacción de la o-quinona del ácido

---

## INTRODUCCIÓN

---

caftárico con otros compuestos, y evitándose así la formación de pigmentos de color pardo (*Ferreira-Lima y col., 2016; Webber y col., 2017*).

Igualmente, el GSH puede competir por la o-quinona del ácido caftárico con los tioles varietales del vino (4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP), acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA) y 3-mercaptohexan-1-ol (3MH), característicos de vinos blancos como Sauvignon blanc y Verdejo, protegiendo su aroma (*Tominaga y col., 1998; Campo y col., 2005*). La suplementación con g-LSI podría por tanto preservar la componente aromática que aportan estos compuestos al vino, evitando su oxidación. Por esta razón, los preparados de g-LSI que se comercializan están recomendados para vinos blancos y rosados que procedan preferentemente de variedades ricas en tioles volátiles. Sin embargo, no hay trabajos científicos que demuestren el efecto de estos preparados sobre la composición volátil de los vinos.

### **4.2.5. Efecto de los preparados de LSI sobre el color, la composición fenólica y la astringencia de los vinos tintos**

Para vinificaciones en tinto, las preparaciones comerciales de LSI recomendadas suelen incluir en su composición levaduras inactivadas. Estas levaduras inactivadas son capaces de liberar polisacáridos (concretamente manoproteínas), que están relacionados con una mejora de la estabilización del color de los vinos tintos durante la crianza.

En este sentido, *Escot y colaboradores (2001)* demostraron que las manoproteínas liberadas por diferentes cepas de LSA durante la fermentación y la autólisis de las levaduras, formaban complejos con las antocianinas evitando su precipitación y estabilizando el color. Por el contrario, otros trabajos científicos llevados a cabo demostraron que la adición de un preparado LSI rico en manoproteínas para vinificaciones en tinto no mejoraba la estabilidad del

color de los vinos, sino que mostraban un color similar o incluso inferior al del vino control (*Guadalupe y col., 2007; Nikfardjam y Pickering, 2008*). Esto podría deberse a la precipitación de los complejos formados entre las manoproteínas y los polifenoles (*Guadalupe y Ayestarán, 2008*).

Por otra parte, *González-Royo y colaboradores (2013)* demostraron que la suplementación con levaduras inactivadas durante la fermentación alcohólica causaba una ligera disminución del color. Sin embargo, esta pérdida de color no fue detectable mediante análisis sensorial.

Una de las aplicaciones más frecuentes para la que son utilizados los preparados de LSI ricos en polisacáridos, es para modular la astringencia y mejorar el cuerpo y la untuosidad del vino en boca. Se ha descrito que los polisacáridos y/o manoproteínas pueden inhibir la interacción proteína-tanino, dando lugar a la formación de complejos estables tanino-manoproteínas que al no poder interactuar con las proteínas de la saliva cambian la percepción de la astringencia (*Escot y col., 2001*).

*González-Royo y colaboradores (2013, 2017)* concluyeron que la suplementación con LSI modificaba la composición del vino al liberar compuestos como polisacáridos y oligosacáridos, además de reducir la concentración de proantocianidinas y disminuir su grado de polimerización. Sin embargo, en las pruebas sensoriales realizadas para evaluar la astringencia, no se percibieron diferencias significativas entre el control y las muestras tratadas con LSI, si bien se detectó una tendencia hacia su disminución (*González-Royo y col., 2017*). Análogamente, *Mekoue Nguela y colaboradores (2015)* evidenciaron una fuerte afinidad entre los taninos y las LSI, asociado a altos niveles de adsorción, lo cual debería repercutir en un descenso de la sensación de astringencia percibida.

---

## INTRODUCCIÓN

---

A parte de interaccionar con las proteínas de la saliva, las manoproteínas también influyen en otros componentes que participan en la sensación en boca de los vinos, aumentando la redondez y el volumen en boca e incluso aportando dulzor (*Vidal y col., 2004; Marchal y col., 2011*). *Guadalupe y colaboradores (2007)* comprobaron que la adición de un preparado de LSI rico en manoproteínas durante la vinificación en tinto, aumentaba la sensación de dulzor y redondez en boca, además de disminuir la astringencia de los vinos. Por el contrario, *Pickering y colaboradores (2008)* no encontraron diferencias en las sensaciones en boca percibidas entre un vino elaborado con un preparado LSI rico en manoproteínas, y un vino control. Por tanto, la variabilidad existente entre los resultados obtenidos por ambos autores, subraya la necesidad de profundizar más sobre el efecto de que estos preparados provocan en las sensaciones orales percibidas en los vinos tintos.

### **4.2.6. Efecto de los preparados de LSI en la espumabilidad de los vinos**

Dentro de los preparados comerciales de LSI, las preparaciones ricas en manoproteínas y polisacáridos, obtenidas a partir de las paredes celulares de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, han sido también relacionadas con la mejora de las propiedades espumantes de los vinos espumosos.

*Vanrell y colaboradores (2005)* mostraron que al suplementar con LSI los vinos espumosos (*Champagne* y *Cava*) durante el tiraje, estos presentaban una mayor concentración en proteínas además de mejores propiedades espumantes. Del mismo modo, *Marti-Raga y colaboradores (2016)* comprobaron que la adición de LSI a vinos espumosos durante la fase de tiraje, provocaba una mayor liberación de polisacáridos al medio y una mejora de los parámetros de la espuma de los vinos.

Por otra parte, *Nuñez y colaboradores (2006)* estudiaron el efecto de un extracto soluble de manoproteínas obtenido por diferentes métodos (enzimático y térmico), sobre las propiedades espumantes en medio sintético y en dos vinos espumosos. Estos autores observaron un efecto positivo del extracto térmico de manoproteínas sobre las propiedades espumantes de los vinos espumosos, concluyendo que el método utilizado en la obtención de los derivados de levadura influye en gran medida en la fracción de las manoproteínas obtenidas. Por el contrario, *Pérez-Magariño y colaboradores (2015)* no detectaron diferencias significativas entre los parámetros de la espuma (HM y HS) al añadir autolisados de levaduras secas a vinos espumosos.

## **5. Levaduras No-*Saccharomyces***

La vinificación llevada a cabo de forma espontánea (sin inoculación de levaduras comerciales), es el resultado de la acción secuenciada de varias especies de levadura pertenecientes a géneros distintos (*Saccharomyces* y No-*Saccharomyces*). Estas especies se encuentran de forma natural en la uva y el mosto, y en mayor o menor medida en el equipo de bodega (*Sabate y col., 2002*). Así, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* deriva principalmente de los equipos de bodega y en muy baja proporción de las uvas. Por el contrario, No-*Saccharomyces* se encuentra de forma mayoritaria en las uvas, y en menor medida en el equipo de bodega (*Jolly y col., 2003*).

Existe una gran diversidad de especies, conocidas como levaduras No-*Saccharomyces* que intervienen a lo largo de la fermentación alcohólica, sobre todo, en sus primeros estadios (*Jolly y col., 2003*). Gracias a estudios de taxonomía llevados a cabo por *Kurtzman y colaboradores (2011)*, se han podido



## INTRODUCCIÓN

---

identificar hasta 149 géneros de estas levaduras, los cuales comprenden cerca de 1500 especies (Jolly y col., 2014).

Entre las levaduras No-*Saccharomyces* que se localizan tanto en el mosto de uva como en la fermentación alcohólica se encuentran las citadas a continuación: *Pichia* spp., *Debaryomyces* spp., *Rhodotorula* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus albidus*, *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*), *Hanseniaspora guilliermondii* (*Kloeckera apis*), *Hanseniaspora occidentalis* (*Kloeckera javanica*), *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefyr*), *Torulaspota delbrueckii* (*Candida colliculosa*), *Metschnikowia Pulcherrima* (*Candida pulcherrima*) y *Zygosaccharomyces bailii* (Fleet y col., 1984; Querol y col., 1990; Bisson y Kunkee, 1991; Longo y col., 1991; Lonvaud-Funel, 1996; Lorenzini, 1999; Torija y col., 2001; Combina y col., 2005).

A pesar de que se cree que todas las levaduras No-*Saccharomyces* mueren poco después del inicio de la fermentación, como consecuencia de la elevada concentración de etanol y el SO<sub>2</sub> añadido (Jolly y col., 2014), esta creencia no ha sido sostenida por ciertos investigadores (Fleet y col., 1984; Heard y col., 1985; Cordero-Bueso y col., 2013), los cuales exponen que algunas sobreviven durante todo el proceso. De hecho, las levaduras pertenecientes a los géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora* y *Candida* predominan durante las primeras etapas de la fermentación alcohólica, seguidas por algunas especies de *Metschnikowia* y *Pichia* las cuales prevalecen en las etapas intermedias del proceso (Fleet, 1993; Fleet y Heard, 1993).

Inicialmente, las levaduras No-*Saccharomyces* eran consideradas responsables de los problemas microbianos producidos durante la elaboración del vino. Además, se las relacionaba con fermentaciones lentas o paradas de

fermentación, con altas concentraciones de azúcares residuales y con vinos de perfiles analíticos y sensoriales anómalos (*Ciani y col., 2010*).

Aunque algunas levaduras *No-Saccharomyces* pueden producir metabolitos beneficiosos para la calidad del vino, también pueden dar lugar a otros metabolitos de desecho, siendo por ello consideradas como levaduras alterantes. Entre los productos residuales que generan se encuentran el ácido acético, el acetaldehído, la acetoína, el acetato de etilo, así como otros compuestos que dan lugar a olores desagradables como los vinil y etilfenoles, relacionados con el desarrollo de *Brettanomyces/Dekkera spp.* Por esta razón, en la elaboración de vinos se ha tendido a utilizar inóculos de levaduras comerciales de *Saccharomyces cerevisiae*, para garantizar su imposición y evitar la aparición de defectos sensoriales (*Páez-Lerma y col., 2013*).

Sin embargo, los elaboradores de vino que realizaban fermentaciones espontáneas mediante las levaduras indígenas del viñedo, (lo que supone la dominancia mixta y/o secuencial de levaduras *No-Saccharomyces* y *Saccharomyces*), consideraban a las levaduras autóctonas como una parte integrante de la autenticidad de sus vinos, logrando una cierta tipicidad según regiones (*Amerine y col., 1972*). Así, y en determinadas ocasiones, los vinos obtenidos por fermentación espontánea presentaban una mayor complejidad y tipicidad con respecto a los vinos inoculados (*Varela y col., 2009*).

En consecuencia, en la última década se ha producido una reevaluación del papel que ejercen las levaduras *No-Saccharomyces* en la fermentación del vino, con el objetivo de identificar cultivos iniciadores alternativos para ser utilizados en procesos de fermentación mixta (*Ciani y col., 2010*). Con esto se persigue conseguir que tales especies de levadura mejoren la calidad del vino, evitando también la aparición de posibles defectos organolépticos.

---

## INTRODUCCIÓN

---

### 5.1. Levaduras *No-Saccharomyces*: Inoculación secuenciada en vinificación

Tradicionalmente, la fermentación alcohólica se producía de forma espontánea a partir de levaduras nativas presentes en las uvas. Este tipo de fermentación tradicional (espontánea) conlleva un proceso de vinificación mucho menos controlado, con un elevado riesgo de presentar alteraciones microbiológicas y químicas, y con unos tiempos de fermentación más prolongados.

Para conseguir un buen término de la fermentación y la obtención de vinos con las características deseadas, se comenzaron a utilizar inóculos de levaduras seleccionadas por su buena capacidad fermentativa. Años más tarde aparecieron las levaduras secas activadas (LSA), lo que facilitaba enormemente su utilización en bodega. Además, se observó que el uso continuado de una misma cepa comercial daba lugar a una vinificación más reproducible y, por tanto, a vinos con una cierta similitud organoléptica (*Shekhawat y col., 2017*).

En la actualidad, el sector del vino se halla en una situación cada vez más competitiva y globalizada, y por ello los elaboradores de vino se enfrentan a la necesidad de mejorar las características organolépticas de sus vinos, para así satisfacer las necesidades del mercado.

Por otra parte, los enólogos afrontan el reto de mejorar el proceso fermentativo y obtener una mayor complejidad aromática, lo que se traduce en una demanda de nuevas y mejores cepas de levadura capaces de adaptarse a diferentes tipos y estilos de vino. Por este motivo, en los últimos años se ha comenzado a estudiar el posible beneficio del empleo de levaduras *No-Saccharomyces* en fermentaciones mixtas controladas. En este sentido, ciertas levaduras *No-Saccharomyces* han sido propuestas para la elaboración de vinos mediante co-inoculación o mediante inoculación secuenciada. Entre estas levaduras *No-Saccharomyces* destacan *Torulaspora*, *Candida*, *Hanseniaspora*,

*Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Lachancea* y *Pichia* entre otras (Jolly y col., 2014).

El proceso de co-inoculación consiste en inocular de forma simultánea ambos géneros de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y No-*Saccharomyces*), para que ambas coexistan durante las primeras fases de la fermentación. Cuando la concentración de etanol en el medio aumente, *Saccharomyces cerevisiae* se impondrá, dada su mayor resistencia a este compuesto, y tenderá a dominar las etapas posteriores de la fermentación (Tristezza y col., 2016).

Por otro lado, la inoculación secuencial de levaduras radica en introducir al inicio de la fermentación alcohólica una cepa seleccionada de levadura No-*Saccharomyces*, dejándola fermentar durante un período de tiempo variable dependiendo del tipo de levadura utilizada. A continuación, se procede a inocular el medio con una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual controlará el final de la fase fermentativa (González-Royo, 2015). La inoculación secuenciada de levaduras es probablemente el sistema más utilizado en la actualidad para llevar a cabo fermentaciones mixtas (*Saccharomyces*/No-*Saccharomyces*).

Mediante el uso de estas inoculaciones secuenciales se pretende conseguir vinos con una composición química diferente, y un perfil sensorial característico de la levadura No-*Saccharomyces* utilizada, diferenciándolos por tanto de los vinos fermentados con un único tipo de inóculo.

## **5.2. Efecto de la inoculación secuenciada con No-*Saccharomyces* sobre el aroma del vino**

Entre las propiedades enológicas atribuidas a las levaduras No-*Saccharomyces* destaca la producción de ciertos metabolitos volátiles durante la fermentación

## INTRODUCCIÓN

---

alcohólica, que pueden influir de manera decisiva en las características organolépticas del vino.

Se ha descrito que el desarrollo de ciertas levaduras No-*Saccharomyces* puede incrementar la producción de ciertos compuestos negativos para la calidad sensorial del vino, como el acetaldehído o el ácido acético (*Mylona y col., 2016*). Por esta razón es importante que la finalización del proceso fermentativo sea llevado a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* y evitar así un exceso de estos metabolitos.

Estudios llevados a cabo con especies de levaduras tales como *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* dieron como resultado un aumento de la concentración de esteres volátiles, los cuales contribuyen de forma significativa al aroma frutal de los vinos (*Liu y col., 2016*). Además se ha descrito que los géneros *Rhodotorula*, *Pichia* y *Torulaspota* son grandes productores de acetato de isoamilo (*Suomalainen y Lehtonen, 1979; Rojas y col., 2001; Nuñez-Guerrero y col., 2016*). Asimismo, diferentes especies del género *Hanseniaspora* son consideradas buenas productoras tanto de acetato de 2-feniletilo como de acetato de isoamilo (*Moreira y col., 2005, 2008; Plata y col., 2003; Rojas y col., 2001, 2003*). Por otra parte, la inoculación secuencial con *Wickerhamomyces anomalus* (anteriormente clasificada como *Hansenula anómala*) incrementa los niveles de acetatos y ésteres de etilo así como los alcoholes lineales, a la vez que disminuye la concentración de ácidos orgánicos (*Izquierdo y col., 2014*).

También se ha puesto de manifiesto la capacidad de liberación, por parte de las levaduras No-*Saccharomyces*, de terpenos y tioles volátiles a partir de sus precursores de aroma, gracias a la actividad enzimática de la levadura. De hecho, varios autores han observado la liberación de enzimas (esterasas,  $\beta$ -glucosidasas y proteasas) las cuales mejoran, en el caso de los terpenos, el

aroma floral del vino (*Fernández-González y col., 2003; Fleet, 2008; Rosi y col., 1994; Strauss y col., 2001*). Asimismo, *Ferreira y colaboradores (2001)* propusieron a las especies *Kloeckera apiculata*, *Wickerhamomyces anomalus* y *Metschnikowia pulcherrima* por mostrar una intensa actividad  $\beta$ -glucosidasa, e hidrolizar a los monoterpenos glicosilados modificando el aroma de los vinos y mejorando su carácter varietal. Además, la especie *Metschnikowia pulcherrima* también es capaz de producir tioles volátiles (*Liu y col., 2016*) así como aumentar la concentración de determinados fenoles volátiles, en especial, el 2,6-dimetoxifenol (*González-Royo y col., 2015*) el cual es considerado un descriptor del olor medicinal (*Culleré y col., 2004*).

### **5.3. Efecto de la inoculación secuenciada con levaduras No-Saccharomyces sobre el contenido en macromoléculas y las propiedades espumantes del vino**

Las levaduras No-Saccharomyces también pueden generar otros compuestos como polisacáridos y manoproteínas. *Domizio y colaboradores (2011a)* pusieron de manifiesto que las cepas de levaduras pertenecientes a los géneros *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces*, en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae*, podrían aumentar la concentración final en polisacáridos.

Recientemente, algunos autores han demostrado que las levaduras No-Saccharomyces presentan también una alta capacidad de liberación de manoproteínas durante la fermentación alcohólica (*Comitini y col., 2011; Domizio y col., 2011a, 2011b; Gobbi y col., 2013; Romani y col., 2010*). Un estudio llevado a cabo por *Domizio y colaboradores (2014)*, en fermentaciones mixtas y con diferentes géneros de levaduras No-Saccharomyces, puso de manifiesto la mayor capacidad de liberación de polisacáridos (en especial, manoproteínas) por parte de estas levaduras con respecto a *Saccharomyces*

## INTRODUCCIÓN

---

*cerevisiae*. Además indicaron la liberación de proteínas de distinto tamaño molecular (entre 25 y 250 kDa) por parte de las levaduras No- *Saccharomyces*.

Además de influir estas levaduras No-*Saccharomyces* en la composición química del vino, también pueden influir sobre la espumabilidad (HM) y la estabilidad de la espuma (HS). Estudios llevados a cabo en vino base (*González-Royo y col., 2015*) pusieron de manifiesto que la especie *Torulaspota delbrueckii*, en inoculación secuenciada con *Saccharomyces cerevisiae*, permitía obtener vinos con mejores propiedades espumantes. Así, los vinos base obtenidos por inoculación secuencial de levaduras presentaron valores de espumabilidad (HM) significativamente superiores a los obtenidos por inoculación convencional. Este hecho podría deberse a la liberación de una mayor cantidad de proteínas, en especial, de las de bajo peso molecular, por parte de la levadura *Torulaspota delbrueckii*.

### **5.4. Efecto de la inoculación secuenciada con No-*Saccharomyces* sobre otros componentes del vino**

Las levaduras No-*Saccharomyces*, además de producir aromas interesantes para la calidad del vino, también pueden generar otros productos durante el proceso de fermentación, entre los que se incluyen el glicerol, el ácido succínico o el ácido láctico (*Moreira y col., 2005; Jolly y col., 2014; Liu y col., 2016*). Sin embargo, dado que el empleo de estas levaduras se lleva a cabo mediante fermentaciones mixtas con otras levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae*, su efecto en los vinos dependerá del proceso global.

Se ha demostrado que algunas cepas de levaduras No-*Saccharomyces* como *Metschnikowia pulcherrima* y *Torulaspota delbrueckii*, en co-fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, producen vinos finales con una menor acidez volátil y una mayor concentración de glicerol (*Sadineni y col., 2012*). Estos resultados

coinciden con los obtenidos por *González-Royo y colaboradores (2015)*, en inoculación secuenciada con *Torulaspora delbrueckii*.

También se ha descrito la capacidad de estas especies de levaduras no convencionales en producir vinos con un menor contenido en alcohol. Se ha demostrado que co-fermentaciones e inoculaciones secuenciadas con *Metschnikowia pulcherrima* dan lugar a vinos con una concentración de etanol inferior a la obtenida mediante fermentación convencional con *Saccharomyces cerevisiae* (*Sadineni y col., 2012; Contreras y col., 2014*).

En relación al color de los vinos, este puede verse afectado también por ciertas levaduras No-*Saccharomyces*, que al liberar mayores cantidades de acetaldehído, ácido pirúvico y vinil fenoles pueden favorecer la formación de cicloaductos con los antocianos. Estos nuevos pigmentos denominados vitisinas (A y B) o piranoantocianos presentan tonalidades anaranjadas y son muy resistentes a la degradación, por lo que confieren una mayor estabilidad al color del vino. Este efecto fue estudiado con las especies de levaduras *Pichia guillermondii* y *Schizosaccharomyces pombe* en vinos tintos, comprobándose que ambas especies favorecían la estabilidad del color (*Benito y col., 2011; Morata y col., 2012*).



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

---

## Referencias bibliográficas

Alexandre, H., & Guilloux-Benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine - A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 119–127. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x

Amerine, M. A., & Ough, C. S. (1972). Recent advances in enology. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, 2(4), 407–515. DOI: 10.1080/10408397209527129

Andrés-Lacueva, C., Gallart, M., López-Tamames, E., & Lamuela-Raventós, R. M. (1996a). Influence of variety and aging on foaming properties of sparkling wine (Cava). 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12), 3826–3829. DOI: 10.1021/jf9605153

Andrés-Lacueva, C., López-Tamames, E., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S., & De La Torre-Boronat, M. D. C. (1996b). Characteristics of sparkling base wines affecting foam behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(4), 989–995.

Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S., & De La Torre-Boronat, M. D. C. (1997). Influence of Variety and Aging on Foaming Properties of Cava (Sparkling Wine). 2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2520–2525.

Andújar-Ortiz, I. (2011). Preparados enológicos comerciales a base de levaduras secas inactivas: caracterización, modo de acción e influencia en la composición y características sensoriales de los vinos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.

Andújar-Ortiz, I., Chaya, C., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., & Pozo-Bayón, M. A. (2014). Impact of using new commercial glutathione enriched inactive dry yeast oenological preparations on the aroma and sensory properties of wines. *International Journal of Food Properties*, 17(5), 987-1001. DOI: 10.1080/10942912.2012.685682

Bamforth, C. W. (1985). The foaming properties of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 91(6), 370–383. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1985.tb04359.x

Beaumont, F., Liger-Belair, G., & Polidori, G. (2016). Unveiling self-organized two-dimensional (2D) convective cells in champagne glasses. *Journal of Food Engineering*, 188, 58-65. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2016.05.012

Beker, M. J., Blumbergs, J. E., Ventina, E. J., & Rapoport, A. I. (1984). Characteristics of cellular membranes at rehydration of dehydrated yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19(5), 347–352. DOI: 10.1007/BF00253783

Bikerman, J. J. (1938). The unit of foaminess. *Transactions of the Faraday Society*, 34, 634-638.

Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (1991). Microbial interactions during wine production. *Mixed Cultures in Biotechnology*, pp. 39–68. New York: McGraw-Hill, Inc.

## INTRODUCCIÓN

---

Blanco-Gomis, D., Mangas-Alonso, J. J., Junco-Corujedo, S., & Gutiérrez-Álvarez, M. D. (2007). Cider proteins and foam characteristics: A contribution to their characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7), 2526–2531. DOI: 10.1021/jf062891l

Bravi, E., Benedetti, P., Marconi, O., & Perretti, G. (2014). Determination of free fatty acids in beer wort. *Food Chemistry*, 151, 374–378. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.063

Brierley, E. R., Wilde, P. J., Onishi, A., Hughes, P. S., Simpson, W. J., & Clark, D. C. (1996). The influence of ethanol on the foaming properties of beer protein fractions: A comparison of rudin and microconductivity methods of foam assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(4), 531–537.

Brissonet, F., & Maujean, A. (1991). Identification of some foam-active compounds in Champagne base wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(2), 97-102.

Brissonet, F., & Maujean, A. (1993). Characterization of foaming proteins in a Champagne base wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 297–301.

Bullock, J. D., Wang, J. P., & Bullock, G. H. (1998). Was Dom Perignon really blind? *Survey of Ophthalmology*, 42(5), 481–486. DOI: 10.1016/S0039-6257(97)00127-6

Canals, J. M. (1997). Aplicació de tècniques de cromatografia líquida de proteïnes (FPLC) a l'estudi de vins blancs. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.

Canals, J. M., & Zamora, F. (2010). Comparación de la eficacia analítica del biosensor para la determinación de ácido glucónico en mostos y vinos de la empresa “Biolan Microbiosensores S.L.” con el método enzimático aplicado manualmente y mediante un autoanalizador. *Revista Enología Año VIII*, Edición Marzo-Abril, 1-6.

Caridi, A. (2002). Protective agents used to reverse the metabolic changes induced in wine yeasts by concomitant osmotic and thermal stress. *Letters in Applied Microbiology*, 35(2), 98–101. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2002.01134.x

Caridi, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 89(3–4), 417–422. DOI: 10.1007/s10482-005-9050-x

Carrier, V., & Colin, A. (2003). Coalescence in draining foams. *Langmuir*, 19(11), 4535–4538. DOI: 10.1021/la026995b

Cayuela, J. (1989). Los Cavas españoles. Barcelona: Ediciones Sociales.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10(2), 123–133. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x

Ciesarová, Z., & Šmogrovičová, D. (1996). A Study of Ethanol Tolerance in Yeast. *Chemické Listy*, 90(8), 500–501.

Cilindre, C., Liger-Belair, G., Villaume, S., Jeandet, P., & Marchal, R. (2010). Foaming properties of various Champagne wines depending on several parameters: Grape variety, aging, protein and CO<sub>2</sub> content. *Analytica Chimica Acta*, 660(1–2, SI), 164–170. DOI: 10.1016/j.aca.2009.10.021

Coelho, E., Reis, A., Domingues, M. R. M., Rocha, S. M., & Coimbra, M. A. (2011). Synergistic effect of high and low molecular weight molecules in the foamability and foam stability of sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 3168–3179. DOI: 10.1021/jf104033c

Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., & Martínez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), 237–243. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017

Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(5), 873–882. DOI: 10.1016/j.fm.2010.12.001

Comuzzo, P., Tat, L., Liessi, A., Brotto, L., Battistutta, F., & Zironi, R. (2012). Effect of different lysis treatments on the characteristics of yeast derivatives for winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3211–3222. DOI: 10.1021/jf204669f

Comuzzo, P., Calligaris, S., Iacumin, L., Ginaldi, F., Palacios Paz, A. E., & Zironi, R. (2015). Potential of high pressure homogenization to induce autolysis of wine yeasts. *Food Chemistry*, 185, 340–348. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.03.129

Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1670–1678. DOI: 10.1128/AEM.03780-13

Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M., & Arroyo, T. (2013). Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *European Food Research and Technology*, 236(1), 193–207. DOI: 10.1007/s00217-012-1874-9

Culbert, J. A., McRae, J. M., Condé, B. C., Schmidtke, L. M., Nicholson, E. L., Smith, P. A., Howell, K. S., Boss, P. K., & Wilkinson, K. L. (2017). Influence of Production Method on the Chemical Composition, Foaming Properties, and Quality of Australian Carbonated and Sparkling White Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(7), 1378–1386. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b05678

Culleré, L., Escudero, A., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Gas Chromatography-Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality

## INTRODUCCIÓN

---

Spanish Aged Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1653–1660. DOI: 10.1021/jf0350820

Curioni, A., Vincenzi, S., & Bona, S. (2015). Some results on the evaluation of the foam behaviour for sparkling wines. In Proceedings of the 3rd OENOVITI International symposium “Cava Challenges 2015”, pp. 37-40. May 20, Barcelona, Spain.

De La Presa-Owens, C., Schlich, P., Davies, H. D., & Noble, A. C. (1998). Effect of Methode Champenoise process on aroma of four *V. vinifera* varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(3), 289–294.

Domizio, P., Romani, C., Comitini, F., Gobbi, M., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011a). Potential spoilage non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 61(1), 137–144. DOI: 10.1007/s13213-010-0125-1

Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011b). Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 170–180. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.020

Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L. F., & Barile, D. (2014). Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiology*, 43, 5–15. DOI: 10.1016/j.fm.2014.04.005

Dressaire, E., Bee, R., Bell, D. C., Lips, A., & Stone, H. A. (2008). Interfacial polygonal nanopatterning of stable microbubbles. *Science*, 320(5880), 1198–1201. DOI: 10.1126/science.1154601

Dufrechou, M., Doco, T., Poncet-Legrand, C., Sauvage, F.-X., & Vernhet, A. (2015). Protein/Polysaccharide Interactions and Their Impact on Haze Formation in White Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(45), 10042–10053. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02546

Dussaud, A., Robillard, B., Carles, B., Duteurtre, B., & Vignes-Adler, M. (1994). Exogenous Lipids and Ethanol Influences on the Foam Behavior of Sparkling Base Wines. *Journal of Food Science*, 59(1), 148–151. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1994.tb06920.x

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(3), 153–159.

Esteruelas, M., Poinaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M. F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2009a). Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine. *Food Chemistry*, 113(1), 28-35. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.031

Esteruelas, M., Poinaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M. F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2009b). Comparison of methods for estimating protein stability in white wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(3), 302–311.

Esteruelas, M., González-Royo, E., Kontoudakis, N., Orte, A., Cantos, A., Canals, J. M., & Zamora, F. (2015). Influence of grape maturity on the foaming properties of base wines and sparkling wines (Cava). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(10), 2071–2080. DOI: 10.1002/jsfa.6922

Fernández-González, M., Di Stefano, R., & Briones, A. (2003). Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food Microbiology*, 20(1), 35–41. DOI: 10.1016/S0740-0020(02)00105-3

Ferreira-Lima, N. E., Burin, V. M., Caliar, V., & Bordignon-Luiz, M. T. (2016). Impact of Pressing Conditions on the Phenolic Composition, Radical Scavenging Activity and Glutathione Content of Brazilian *Vitis vinifera* White Wines and Evolution During Bottle Ageing. *Food and Bioprocess Technology*, 9(6), 944–957. DOI: 10.1007/s11947-016-1680-7

Feuillat, M., & Charpentier, C. (1982). Autolysis of yeasts in Champagne. *American Journal of Enology and Viticulture*, 33(1), 6-13.

Feuillat, M., & Guereau, J. (1996). Les nouveaux activateurs de la fermentation alcoolique. *Bulletin de l'O.I.V.*, 69(789–790), 987–998.

Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., & Ribéreau-Gayon, P. (1984) Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux Wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(5), 1034–1038.

Fleet, G. H. (1993). The microorganisms of winemaking-isolation, enumeration and identification. *Wine Microbiology and Biotechnology*, pp. 1–25. Switzerland: Harwood Academic Publishers.

Fleet, G. H., & Heard, G. M. (1993). Yeasts—growth during fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*, pp. 27– 55. Switzerland: Harwood Academic Publishers.

Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 979–995. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x

Gallart, M., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (1997). Foam measurements in wines: Comparison of parameters obtained by gas sparging method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4687–4690. DOI: 10.1021/jf9701244

Gallart, M., López-Tamames, E., Suberbiola, G., & Buxaderas, S. (2002). Influence of fatty acids on wine foaming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 7042–7045. DOI: 10.1021/jf0204452

García Gallego, J. (2008). *Maridaje, Enología y Cata de Vinos*. (1ª ed.). Málaga: Innovación y Cualificación.

## INTRODUCCIÓN

---

Gawel, R., Smith, P. A., & Waters, E. J. (2016). Influence of polysaccharides on the taste and mouthfeel of white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(3), 350–357. DOI: 10.1111/ajgw.12222

Girbau-Solà, T., López-Tamames, E., Buján, J., & Buxaderas, S. (2002). Foam aptitude of Trepát and Monastrell red varieties in Cava elaboration. 1. Base wine characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5596–5599. DOI: 10.1021/jf020375z

Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, 33(2), 271–281. DOI: 10.1016/j.fm.2012.10.004

González-Royo, E., Urtasun, A., Gil, M., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2013). Effect of yeast strain and supplementation with inactive yeast during alcoholic fermentation on wine polysaccharides. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64(2), 268–273. DOI: 10.5344/ajev.2012.12071

González-Royo, E. (2015). Aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas para compensar los efectos negativos del cambio climático sobre vinos espumosos (Cava) y vinos tintos. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.

González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zaroso, B., Mas, A., Canals, J. M., & Zamora, F. (2015). Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology*, 240(5), 999–1012. DOI: 10.1007/s00217-014-2404-8

González-Royo, E., Esteruelas, M., Kontoudakis, N., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2017). The effect of supplementation with three commercial inactive dry yeasts on the colour, phenolic compounds, polysaccharides and astringency of a model wine solution and red wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), 172–181. DOI: 10.1002/jsfa.7706

Guadalupe, Z., Palacios, A., & Ayestarán, B. (2007). Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4854–4862. DOI: 10.1021/jf063585a

Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2008). Effect of commercial mannoprotein addition on polysaccharide, polyphenolic, and color composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9022–9029. DOI: 10.1021/jf801535k

Guilloux-Benatier, M., Guerreau, J., & Feuillat, M. (1995). Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 486–492.

Guilloux-Benatier, M., & Chassagne, D. (2003). Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 746–751. DOI: 10.1021/jf020135j

Hardy, G. (1992). Défauts et anomalies rencontrés au cours de l'élaboration des vins effervescents. Le travail des vins en bouteilles. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques*, 63, 15-21.

Heard, G. M., & Fleet, G. H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(3), 727–728.

Hernández, T., Estrella, I., Carlavilla, D., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2006). Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Analytica Chimica Acta*, 563, 116–125. DOI: 10.1016/j.aca.2005.10.061

Hidalgo, J. (2011). Tratado de Enología. Volumen I y II. (2ª ed.). Madrid: Mundi Prensa.

Hong, Y. S., Cilindre, C., Liger-Belair, G., Jeandet, P., Hertkorn, N., & Schmitt-Kopplin, P. (2011). Metabolic influence of *botrytis cinerea* infection in champagne base wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7237–7245. DOI: 10.1021/jf200664t

<http://www.docava.es/>

Izquierdo Cañas, P. M., García-Romero, E., Heras Manso, J. M., & Fernández-González, M. (2014). Influence of sequential inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* in the quality of red wines. *European Food Research and Technology*, 239(2), 279–286. DOI: 10.1007/s00217-014-2220-1

Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2003). The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24, 55–62.

Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14(2), 215–237. DOI: 10.1111/1567-1364.12111

Kemp, B., Alexandre, H., Robillard, B., & Marchal, R. (2015). Effect of Production Phase on Bottle-Fermented Sparkling Wine Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(1), 19–38. DOI: 10.1021/jf504268u

Kruglyakov, P. M., Karakashev, S. I., Nguyen, A. V., & Vilкова, N. G. (2008). Foam drainage. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(3), 163-170. DOI: 10.1016/j.cocis.2007.11.003

Kunkee, R. E. (1991). Relationship between nitrogen content of must and sluggish fermentation. In Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wine, pp. 148–155. June 18-19, Seattle, Washington, USA.



## INTRODUCCIÓN

---

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). Definition, classification and nomenclature of the yeasts. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Vol. 1. (5th ed.), pp. 3-5. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C., & Ribéreau-Gayon, P. (1984). Ways of initiating the action of yeast ghosts during winemaking. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18, 111–125.

Ledoux, V., Dulau, L., & Dubourdieu, D. (1992). Interprétation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 26, 239-251.

Liger-Belair, G., Marchal, R., Robillard, B., Vignes-Adler, M., Maujean, A., & Jeandet, P. (1999). Study of effervescence in a glass of champagne: Frequencies of bubble formation, growth rates, and velocities of rising bubbles. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(3), 317–323.

Liger-Belair, G., Lemaesquier, H., Robillard, B., Duteurtre, B., & Jeandet, P. (2001). The secrets of fizz in champagne wines: A phenomenological study. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 88–92.

Liger-Belair, G. (2005). The physics and chemistry behind the bubbling properties of Champagne and sparkling wines: A state-of-the-art review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2788–2802. DOI: 10.1021/jf048259e

Liger-Belair, G. (2012). The physics behind the fizz in champagne and sparkling wines. *European Physical Journal-Special Topics*, 201(1), 1–88. DOI: 10.1140/epjst/e2012-01528-0

Liger-Belair, G. (2016). Modeling the Losses of Dissolved CO<sub>2</sub> from Laser-Etched Champagne Glasses. *Journal of Physical Chemistry B*, 120(15), 3724–3734. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01421

Liu, P.-T., Lu, L., Duan, C.-Q., & Yan, G.-L. (2016). The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 356-363. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.04.031

Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., & Villa, T.G. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(2), 141–144.

Lonvaud-Funel, A. (1996). Microorganisms of winemaking. *Cerevisia: Belgian journal of brewing and biotechnology*, 21, 55–58.

López-Barajas, M., Viu-Marco, A., López-Tamames, E., Buxaderas, S., & De La Torre-Boronat, M. C. (1997). Foaming in Grape Juices of White Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2526–2529.

López-Barajas, M., López-Tamames, E., Buxaderas, S., & De La Torre-Boronat, M. C. (1998). Effect of vinification and variety on foam capacity of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(4), 397–402.

López-Barajas, M., López-Tamames, E., Buxaderas, S., Tomás, X., & De La Torre, M. C. (1999). Prediction of wine foaming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3743–3748. DOI: 10.1021/jf981201d

López-Barajas, M., López-Tamames, E., Buxaderas, S., Suberbiola, G., & la Torre-Boronat, M. C. (2001). Influence of wine polysaccharides of different molecular mass on wine foaming. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 146–150.

Lorenzini, F. (1999). Spontaneous fermentation on red vintage: example with Pinot noir. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 31, 191–195.

Machet, F., Robillard, B., & Duteurtre, B. (1993). Application of image analysis to foam stability of sparkling wines. *Sciences des aliments*, 13(1), 73–87.

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

Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Robinson, E. M. C., Muhlack, R. A., Holt, H. E., Haynes, P. A., Godden, P. W., Smith, P. A., & Waters, E. J. (2012). Degradation of white wine haze proteins by Aspergillopepsin I and II during juice flash pasteurization. *Food Chemistry*, 135(3), 1157–1165. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.05.042

Marchal, R., Tabary, I., Valade, M., Moncomble, D., Viaux, L., Robillard, B., & Jeandet, P. (2001). Effects of *Botrytis cinerea* infection on champagne wine foaming properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(14), 1371–1378. DOI: 10.1002/jsfa.941

Marchal, A., Marullo, P., Moine, V., & Dubourdiou, D. (2011). Influence of yeast macromolecules on sweetness in dry wines: Role of the *Saccharomyces cerevisiae* protein Hsp12. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 2004–2010. DOI: 10.1021/jf103710x

Martí-Raga, M., Martín, V., Gil, M., Sancho, M., Zamora, F., Mas, A., & Beltran, G. (2016). Contribution of yeast and base wine supplementation to sparkling wine composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(15), 4962–4972. DOI: 10.1002/jsfa.7905

Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Ortega-Heras, M., & Pérez-Magariño, S. (2013). Changes in polysaccharide composition during sparkling wine making and aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), 12362–12373. DOI: 10.1021/jf403059p

Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., & Pérez-Magarino, S. (2015). Role of major wine constituents in the foam properties of white and rose sparkling wines. *Food Chemistry*, 174, 330-338. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.080

## INTRODUCCIÓN

---

Martínez-Rodríguez, A. J., & Polo, M. C. (2003). Effect of the addition of bentonite to the tirage solution on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chemistry*, 81(3), 383–388. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00455-7

Maujean, A., Gomerieux, T., & Garnier, J. M. (1988). Étude de la tenue et de la qualité d mousse des vins effervescents – I. Mise au point d’une technique de mesure des effervescences spontanées et provoquées des boissons moussantes. *Bulletin de l’O.I.V.*, 61(683-684), 25-35.

Maujean, A., Poinaut, P., Dantan, H., Brissonet, F., & Cossiez, E. (1990). Étude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents – II. Mise au point d’une technique de mesure de la moussabilité, de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bulletin de l’O.I.V.*, 63(711-712), 405-427.

Mekoue Nguela, J., Sieczkowski, N., Roi, S., & Vernhet, A. (2015). Sorption of grape proanthocyanidins and wine polyphenols by yeasts, inactivated yeasts, and yeast cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 660–670. DOI: 10.1021/jf504494m

Moine-Ledoux, V., & Dubourdiou, D. (1999). An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(4), 537–543.

Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2005). Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 103(3), 285–294. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.029

Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 231-238. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.025

Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Nieto, F. J., Martín-Álvarez, P. J., & Polo, M. C. (2000). Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chemistry*, 70(3), 309–317. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00088-1

Moreno-Arribas, V., & Polo, M. C. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer Science+Business Media, LLC.

Mylona, A. E., Del Fresno, J. M., Palomero, F., Loira, I., Bañuelos, M. A., Morata, A., Calderón, F., Benito, S., & Suárez-Lepe, J. A. (2016). Use of *Schizosaccharomyces* strains for wine fermentation-Effect on the wine composition and food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 63-72. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.023

Nikfardjam, M. S., & Pickering, G. J. (2008). Influence of variety and commercial yeast preparation on red wine made from autochthonous Hungarian and Canadian grapes.

Part I: Phenolic composition. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1077-1083. DOI: 10.1007/s00217-008-0822-1

Núñez-Guerrero, M. E., Páez-Lerma, J. B., Rutiaga-Quiñones, O. M., González-Herrera, S. M., & Soto-Cruz, N. O. (2016). Performance of mixtures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts during alcoholic fermentation of Agave duranguensis juice. *Food Microbiology*, 54, 91–97. DOI: 10.1016/j.fm.2015.10.011

Núñez, Y. P., Carrascosa, A. V., González, R., Polo, M. C., & Martínez-Rodríguez, A. J. (2005). Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7232–7237. DOI: 10.1021/jf050191v

Núñez, Y. P., Carrascosa, A. V., González, R., Polo, M. C., & Martínez-Rodríguez, A. (2006). Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7898–7903. DOI: 10.1021/jf0615496

Páez-Lerma, J. B., Arias-García, A., Rutiaga-Quiñones, O. M., Barrio, E., & Soto-Cruz, N. O. (2013). Yeasts Isolated from the Alcoholic Fermentation of Agave duranguensis During Mezcal Production. *Food Biotechnology*, 27(4), 342–356. DOI: 10.1080/08905436.2013.840788

Papadopoulou, D., & Roussis, I. G. (2008). Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetylcysteine. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(6), 1053–1057. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2007.01562.x

Pérez-Magariño, S., Martínez-Lapuente, L., Bueno-Herrera, M., Ortega-Heras, M., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2015). Use of Commercial Dry Yeast Products Rich in Mannoproteins for White and Rosé Sparkling Wine Elaboration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5670–5681. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01336

Péron, N., Cagna, A., Valade, M., Marchal, R., Maujean, A., Robillard, B., Aguié-Béghin, V., & Douillard, R. (2000). Characterization by drop tensiometry and by ellipsometry of the adsorption layer formed at the air/champagne wine interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 88(1–2), 19–36. DOI: 10.1016/S0001-8686(00)00039-7

Pickering, G. J., & Pour Nikfardjam, M. S. (2008). Influence of variety and commercial yeast preparation on red wine made from autochthonous Hungarian and Canadian grapes. Part II. Oral sensations and sensory : iinstrumental relationships. *European Food Research and Technology*, 227(3), 925–931. DOI: 10.1007/s00217-007-0807-5

Plata, C., Millán, C., Mauricio, J. C., & Ortega, J. M. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*, 20, 217-224.

Poinsaut, P. (1991). Le Mosalux, appareil de mesure du pouvoir moussant d'un vin. *Revue des OEnologues*, 59, 35-43.

## INTRODUCCIÓN

---

Pozo-Bayón, M. A., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., Martínez-Rodríguez, A. J., & Polo, M. C. (2003). Influence of Yeast Strain, Bentonite Addition, and Aging Time on Volatile Compounds of Sparkling Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(4), 273–278.

Pozo-Bayón, M. A., Andújar-Ortiz, I., & Moreno-Arribas, M. V. (2009). Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Research International*, 42(7), 754–761. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.03.004

Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., & Polo, M. C. (1995). Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cavas (sparkling wines). *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(4), 518–524.

Pueyo, E., Martínez-Rodríguez, A., Polo, M. C., Santa-María, G., & Bartolomé, B. (2000). Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(1), 116–122. DOI: 10.1021/jf990036e

Querol, A., Jiménez, M., & Huerta, T. (1990). Microbiological and Enological Parameters during Fermentation of Musts from Poor and Normal Grape-Harvests in the Region of Alicante (Spain). *Journal of Food Science*, 55(6), 1603–1606. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1990.tb03580.x

Robillard, B., Viaux, L., & Duteurtre, B. (1995). Medición de la espuma por visión artificial. *Semana Vitivinícola*, 2567–2568, 3656–3659.

Robillard, B. (2002). Plus de dix ans de recherche sur les bulles et la mousse en Champagne. *Revue française d'oenologie*, 193, 49-52.

Rodríguez-Bencomo, J. J., Andújar-Ortiz, I., Moreno-Arribas, M. V., Simó, C., González, J., Chana, A., Dávalos, J., & Pozo-Bayón, M. A. (2014). Impact of glutathione-enriched inactive dry yeast preparations on the stability of terpenes during model wine aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(6), 1373–1383. DOI: 10.1021/jf402866q

Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., & Vila-Crespo, J. (2012). Effect of the addition of  $\beta$ -glucanases and commercial yeast preparations on the chemical and sensorial characteristics of traditional sparkling wine. *European Food Research and Technology*, 235(4), 729–744. DOI: 10.1007/s00217-012-1801-0

Rojas, V., Gil, J., Piñaga, F., & Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), 283–289. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00552-9

Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., & Manzanares, P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 181–188. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00255-1

Romani, C., Domizio, P., Lencioni, L., Gobbi, M., Comitini, F., Ciani, M., & Mannazzu, I. (2010). Polysaccharides and glycerol production by non-*Saccharomyces* wine yeasts in mixed fermentation. *Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino*, 31, 185-189.

Rosi, I., Vinella, M., & Domizio, P. (1994). Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(5), 519–527. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb04396.x

Rudin, A. D. (1957). Measurement of the foam stability of beers. *Journal of Institute of Brewing*, 63, 506-509.

Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., & Guillamón, J. M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research*, 157(4), 267–274.

Sadineni, V., Kondapalli, N., & Reddy Obulam, V. S. (2012). Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1353-1360. DOI: 10.1007/s13213-011-0383-6

Salazar, F. N., Achaerandio, I., Labbé, M. A., Güell, C., & López, F. (2006). Comparative study of protein stabilization in white wine using zirconia and bentonite: Physicochemical and wine sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9955–9958. DOI: 10.1021/jf062632w

Saldaña, E., Siche, R., Luján, M., & Quevedo, R. (2013). Review: computer vision applied to the inspection and quality control of fruits and vegetables. *Brazilian Journal of Food Technology*, 16(4), 254-272. DOI: 10.1590/S1981-67232013005000031

Schramm, L. L. (2005). Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Senée, J., Viaux, L., Robillard, B., Duteurtre, B., & Vignes-Adler, M. (1998). The endogenous particles of a sparkling wine and their influence on the foaming behaviour. *Food Hydrocolloids*, 12(2), 217-226.

Senée, J., Robillard, B., & Vignes-Adler, M. (1999). Films and foams of Champagne wines. *Food Hydrocolloids*, 13(1), 15–26.

Shekhawat, K., Bauer, F. F., & Setati, M. E. (2017). Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(6), 2479–2491. DOI: 10.1007/s00253-016-8001-y

Stefani, A. (2015). Desarrollo de Vino espumante de naranja (var. Valencia). Estudio de su fracción aromática libre y caracterización sensorial con consumidores. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., & Van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 91(1), 182–190. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x

## INTRODUCCIÓN

---

Suomalainen, H., & Lehtonen, M. (1979). The production of aroma compounds by yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 85(3), 149–156. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1979.tb06846.x

Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., & Dubourdieu, D. (1998). Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(3), 159–162. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(199805/06)13:3<159::AID-FFJ709>3.0.CO;2-7

Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 79(3–4), 345–352. DOI: 10.1023/A:1012027718701

Tristezza, M., Tufariello, M., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., & Grieco, F. (2016). The oenological potential of *hanseniaspora uvarum* in simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY). DOI: 10.3389/fmicb.2016.00670

Valero, E., Millan, M. C., Mauricio, J. C., & Ortega, J. M. (1998). Effect of grape skin maceration on sterol, phospholipid, and fatty acid contents of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(2), 119–124.

Vanrell, G. (2002). Estudi de l'evolució del comportament escumant i de la fracció col·loidal del Cava durant la seva elaboració; efecte de diferents tractaments. Tesis Doctoral. Universitat Rovira y Virgili, Tarragona, España.

Vanrell, G., Cabanillas, P., Albet, S., Canals, J. M., Arola, L., & Zamora, F. (2002). Étude des composés influençant la mousse des cavas. *Revue Française d'Oenologie*, 196, 30-36.

Vanrell, G., Esteruelas, M., Canals, J. M., Zamora, F., Poinset, P., Sieczkowski, N., & Lebouef, D. (2005). Influence du type de clarification du vin de base et des adjuvants de tirage sur la qualité de la mousse des vins effervescents. *Revue des Oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques*, 114(32), 28-30.

Vanrell, G., Canals, R., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2007). Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chemistry*, 104(1), 148–155. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.11.014

Varela, C., Siebert, T., Cozzolino, D., Rose, L., McLean, H., & Henschke, P. A. (2009). Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with “wild” indigenous and inoculated yeasts: Role of yeast volatile compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(3), 238–248. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2009.00054.x

Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry*, *85*(4), 519–525. DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00084-0

Vincenzi, S., Crapisi, A., & Curioni, A. (2014). Foamability of Prosecco wine: Cooperative effects of high molecular weight glycoconpounds and wine PR-proteins. *Food Hydrocolloids*, *34*(1), 202–207. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.09.016

Weaire, D., & Hutzler, S. (1999). *The Physics of Foams*. Oxford: Oxford University Press.

Webber, V., Dutra, S. V., Spinelli, F. R., Carnieli, G. J., Cardozo, A., & Vanderlinde, R. (2017). Effect of glutathione during bottle storage of sparkling wine. *Food Chemistry*, *216*, 254–259. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.042

Zamora, F. (2005). Las manoproteínas; origen e interés enológico. *Enólogos*, *36*, 26-29.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

El principal objetivo de este trabajo fue estudiar los factores que determinan la espumabilidad y la permanencia de la espuma de los vinos base y los vinos espumosos elaborados mediante el método tradicional. Por esta razón nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

“La capacidad de un vino espumoso para producir una espuma estable depende de su composición química, la cual a su vez depende de las condiciones de elaboración del vino base y su posterior toma de espuma y crianza”

Con este propósito nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la influencia de los diferentes componentes del vino base sobre sus propiedades espumantes, mediante el análisis comparativo entre el vino original con la fracción de vino obtenida por desbordamiento con dióxido de carbono (vino de espuma) y con la fracción de vino que no es desbordada (vino remanente).
2. Determinar la influencia de la inoculación secuenciada con *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* en la primera fermentación sobre la composición y propiedades espumantes del vino base y de su correspondiente vino espumoso.
3. Determinar la influencia de la suplementación durante el tiraje con levaduras secas inactivadas de *Saccharomyces cerevisiae* o de *Torulaspora delbrueckii* sobre la composición y propiedades espumantes del vino espumoso.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

## **RESULTADOS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

## Capítulo 1. Caracterización físico-química de la espuma de vinos base blanco y rosado para la elaboración de vino espumoso (AOC Cava)

La calidad de un vino espumoso está condicionada en gran medida por sus propiedades espumantes. Sin embargo, la formación de espuma no solo es debida al desprendimiento de CO<sub>2</sub> en el seno del líquido, sino también a la presencia de ciertos componentes en el vino que influyen en mayor o menor medida en la formación y/o estabilidad de las burbujas. Aunque existen diversas investigaciones sobre la incidencia de diversos componentes del vino sobre sus propiedades espumantes, estas no enfocan el estudio de los componentes de una manera global. Por ello, en este trabajo se planteó la experiencia con dos vinos base, uno blanco y otro rosado, obteniendo los vinos de espuma (por desbordamiento con CO<sub>2</sub>), y comparándolos con el vino original y el vino remanente (fracción no desbordada). Los resultados confirman que el etanol, los alcoholes superiores y los ácidos grasos influyen negativamente sobre las propiedades espumantes, mientras que las proteínas juegan un papel positivo. Estos resultados permiten obtener una visión más completa de los componentes del vino que inciden en la calidad de su espuma.

Los análisis de los vinos obtenidos fueron realizados en los laboratorios de la Universitat Rovira i Virgili (Departamento de Bioquímica y Biotecnología; Departamento de Química Analítica y Química Orgánica y Departamento de Ingeniería Química), así como en el Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada de la Universidad Castilla La-Mancha (Ciudad Real). Los resultados del ensayo han sido enviados a la revista *American Journal of Enology and Viticulture* con el título **“Physicochemical characterization of the foam of white and rosé base wines for sparkling wine production (AOC Cava)”**. Estado actual: Moderate Revisions.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

## **Physicochemical characterization of the foam of white and rosé base wines for sparkling wine production (AOC Cava)**

Laura Medina-Trujillo<sup>a</sup>, Pau Matias-Guiu<sup>b</sup>, Francisco López-Bonillo<sup>b</sup>, Joan Miquel Canals<sup>a</sup>  
and Fernando Zamora<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, C/Marcel·li Domingo 1, 43007 Tarragona, Spain

<sup>b</sup> Departament d'Enginyeria Química, Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, C/Marcel·li Domingo 1, 43007 Tarragona, Spain

### **Abstract**

The foam of two base wines was overflowed by carbon dioxide sparging and the foam wine was recovered. Foam wine (FW) as well as the original wine (CW) and the remainder fraction (RW) were analyzed to determine the foam properties, chemical composition and some physical properties. In general, FW showed better foam parameters, higher density and lower surface tension and viscosity than CW and RW. FW wines also tended to have higher proteins and lower ethanol, higher alcohols, titratable acidity and esters concentrations. The improved foam properties of FW wines are most likely due to their impoverishment in foam-negative factors (ethanol and fatty acids) and to their enrichment in foam-positive factors (proteins).

**Key words:** Foam; wine; fractionation; foam wine; proteins; physicochemical characterization.

## RESULTADOS-CAPÍTULO 1

---

### Introduction

The appearance of foam is obviously one of the most important organoleptic characteristics of sparkling wines. The spectacle generated by effervescence and foam is the first characteristic observed by the consumer after a sparkling wine is poured into the glass (Liger-Belair 2012). The carbon dioxide originating from the second fermentation is released from the liquid in the form of bubbles and by diffusion through the free air/liquid interface, resulting in the formation of foam (Cilindre et al. 2010).

The effervescence is made possible by the generation of bubbles in the irregularities of the glass surface, a phenomenon known as heterogeneous nucleation (Liger-Belair et al. 2012, Beaumont et al. 2016). The regular and repetitive birth of the bubbles and their migration to the surface generate the much-appreciated bubble trains (Senée et al. 1999). Once on the top surface of the glass, bubbles migrate to the peripheral sides to form the collar. The length of time between the emergence of the bubbles and their destruction conditions the persistence of the foam and consequently the ability of sparkling wines to form a stable collar, which is considered by consumers to be a criterion of quality (Brissonet and Maujean 1993).

However, these bubbles are ephemeral and are destroyed in the course of three physical processes: Ostwald ripening, coalescence and drainage (Schramm 2005). Ostwald ripening occurs when the carbon dioxide contained in a small bubble diffuses into an adjacent larger bubble in such a way that the small bubble disappears (Dressaire et al. 2008). The second mechanism, coalescence, comes about due to the rupturing of the thin liquid film that separates two small adjacent bubbles, forming a single larger one (Langevin et al. 2015). Finally, drainage occurs because the emerged part of the bubble, the bubble cap, is affected by gravitation causing the bubble film to become thinner until it is so thin it cannot support the internal CO<sub>2</sub> pressure and explodes (Bhakta et al. 1997).

In the light of the foregoing considerations it seems clear that the persistence of the foam is an important factor conditioning the quality of sparkling wines. Knowledge of the factors that play a role in foamability and the persistence of foam is therefore a subject of great interest in oenological science. The foaming properties of sparkling wines depend largely on their chemical composition (Vanrell et al. 2002, Coelho et al. 2011), which is closely related to grape variety, maturity and winemaking conditions (Cilindre et al. 2010). Although the existing literature is abundant, current

knowledge has not comprehensively resolved this question. However, it seems clear that surface-active substances can stabilize foam by settling at the bubble's film, with their hydrophobic head towards the gas and their hydrophilic tail towards the aqueous phase (Bamforth 1985, Schramm 2005).

Of the different compounds with surfactant properties, proteins are the most interesting candidates (Brissonet and Maujean 1993). Indeed some authors have found a close relationship between protein concentration and foam quality in sparkling wines (Pueyo et al. 1995, Vanrell et al. 2007, Esteruelas et al. 2015). Proteins act as tensoactive substances, enhancing foam stability. They also seem to play a role in the elasticity and strength of the film (Dambrouck et al. 2005).

Not much is known about the influence of polysaccharides on foaming properties. However, positive effects have been attributed to the mannoproteins released by yeasts during alcoholic fermentation and especially during the autolysis that occurs in the bottle during the ageing of sparkling wines (Moreno-Arribas et al. 2000, Martínez-Lapuente et al. 2013). More recently, Martínez-Lapuente et al. (2015) have reported that mannoproteins and polysaccharides rich in arabinose and galactose were poor foam formers but good foam stabilizers.

Ethanol also influences foaming properties because it participates in the gas-liquid interface and acts on the adsorption of the surfactant compounds (Péron et al. 2000). High ethanol concentrations are generally considered to have a negative effect on the foamability of sparkling wines (Dussaud et al. 1994, Girbau-Sola et al. 2002, Esteruelas et al. 2015).

The influence of other wine components such as amino acids, higher alcohols, esters, phenolic compounds and fatty acids on wine foam characteristics has been also studied (Pueyo et al. 1995, Gallart et al. 2002). Mathematical models have even been proposed to predict foaming properties from the chemical composition of wine (López-Barajas et al. 1999). However, although the literature on the subject is extensive, the published data are inconclusive and sometimes contradictory (Esteruelas et al. 2015).

Brissonet and Maujean (1991) used an original strategy for studying the foam-active compounds in Champagne base wines. This strategy consisted of bubbling carbon dioxide in base wines and recovering the overflowed foam. Once the foam was collected, the liquid recovered (foam wine) was analyzed for comparison with the original wine and also with the remainder wine. The foam parameters

---

## RESULTADOS-CAPÍTULO 1

---

of the foam wines, measured by the Mosalux procedure (Maujean et al. 1990), were significantly higher than those of the original wines, whereas those of the remainder wines were significantly lower. The authors also found that foam wines were somewhat enriched in proteins and came to the conclusion that proteins can stabilize foams by settling at the bubble's edge, their hydrophobic side towards the gas and their hydrophilic side towards the aqueous phase. Some other analyses such as total nitrogen, metals, alcohol-precipitable colloids, polysaccharides and organic acids were also carried out but no clear results were found, probably because the usual analytical techniques of the time were not performant enough.

Some years later Gallart et al. (2002) repeated this experience for Cava wines in order to study the influence of fatty acids and their ethylic esters on the foam properties of sparkling wine. They found that foam wines were somewhat enriched in fatty acids, but no conclusive results for ethylic esters were found. The chemical components of foam wines, remainder wines and original wines as well as other compounds such as ethanol, acids, glycerol, higher alcohols, amino acids, biogenic amines, phenolic compounds, proteins and polysaccharides were not reported.

For all these reasons, the aim of this article is to study how the chemical composition and certain physical properties such as density, surface tension and viscosity change between the original wine and the two fractions separated by bubbling (foam wine and remainder wine) in order to study which are the main physicochemical factors affecting the foaming properties of the wine.

### Materials and methods

**Chemicals.** All solvents were of HPLC quality and all chemicals used were of analytical grade (> 99%). Ammonium formate and ammonium acetate were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Absolute ethanol and dichloromethane were supplied by VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Hydrochloric acid, sodium hydroxide and ammonium sulfate were provided by Panreac (Barcelona, Spain). Pure water was obtained from a Milli-Q purification system (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Amino acids, biogenic amines, volatile standards and the corresponding internal patterns were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and were of the maximum purity available. Sodium azide and diethylethoxymethylenemalonate (DEEMM) were from Aldrich Chemie (Steinheim, Germany). Solutions of amino acids and biogenic amines were prepared with HCl 0.1 N. For identification of the phenolic

compounds, the following commercial standards from Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany) were used: caftaric acid, trans-coutaric acid and trans-fertaric acid. The following commercial standards from Extrasynthese (Genay, France) were also used: caffeic acid, quercetin 3-glucuronide and syringetin 3-glucoside. All standards were used for identification and quantitation through calibration curves covering the expected concentration ranges. For non-available standards, quantitation was carried out using the calibration curve of the most similar compound: caftaric acid for the hydroxycinnamic acid derivatives and quercetin 3-glucoside for the flavonol 3-glycosides.

**Base wines.** Two AOC Cava base wines from the 2015 vintage were used. One was a blend of the three traditional white cultivars of the AOC Cava - Macabeo, Xarel·lo and Parellada - while the other was a rosé base wine made with Pinot noir. The standard analytical parameters of both wines are shown in Table 1.

**Wine fractionation.** The fractionation of the wine was performed following the procedure described by Brissonet and Maujean (1991). The foam was overflowed by injection of CO<sub>2</sub> with a constant gas flow of 115 mL/min under a constant pressure of 100 kPa using a

Mosalux device (Maujean et al. 1990). The foam was recovered with a suction pump. Three fractions were obtained from each wine: the original wine which was considered as control (CW), the foam wine (FW) and the remainder wine (RW). The FW fraction represented around 15% of the volume of the original wine, whereas the RW fraction represented around 85%. This fractionation was done in triplicate in both samples.

**Standard wine analysis.** The titratable acidity (TA) was measured by acid–base titration using 0.1N NaOH and bromothymol blue as indicator. The pH values were determined by a pH-meter Basic-20 (CRISON, Barcelona, Spain). The CIELab coordinates were determined following Ayala et al. (1997) and the data were processed using MSCV® software (Ayala et al. 2014). Glycerol, L-malic acid and L-lactic acid were measured using enzymatic kits (R-Biopharm AG., Darmstadt, Germany). Ethanol contents (% v/v) were measured by FTIR (Kupina and Shrikhande 2003) using Bacchus 3 MultiSpec equipment (TDI, Gava, Barcelona, Spain) and tartaric acid was determined by the colorimetric method in accordance with Trossais and Asselin (1965).

**Measurement of the foaming properties.** The samples were tempered at 18°C for 24 h before analysis. Foamability and foam stability

## RESULTADOS-CAPÍTULO 1

---

were measured using the Mosalux method (Maujean et al. 1990). A glass cylinder placed on a glass frit was filled with 100 mL of the sample. Carbon dioxide was then injected into the glass cylinder through the glass frit, with a constant gas flow of 115 mL/min under a constant pressure of 1 bar. Two parameters were measured using a Mosalux device (Station Oenotechnique de Champagne, Epernay, France): HM, which is the maximum height reached by the foam after CO<sub>2</sub> injection through the glass frit, and HS, which is the stable height during CO<sub>2</sub> injection. HM represents foamability (the wine's ability to foam) while HS represents foam stability (the persistence of the foam collar or the wine's ability to produce a stable foam). HM and HS are expressed in millimeters. All measures were determined in triplicate.

**Physical parameters.** Density was measured with a portable densimeter 30PX (Mettler-Toledo S.A.E, Barcelona, Spain). Viscosity was measured using an Ubbelohde 532 03/0c capillary viscometer (SI Analytics GmbH, Hattenbergstraße 10, D-55122 Mainz, Alemania) immersed in a 30°C water bath (Schott-Gerate CT-050, Elmsford, NY) (Yanniotis et al. 2007). Surface tension was determined with Traube's stalagmometer glass (Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Germany) using distilled water as reference liquid (Lao

et al. 1999). A correction factor (0.0728 N/m at 20°C) to determine the experimental surface tension of distilled water was used. The surface tension values of the samples were calculated by applying Tate's law.

**Analysis of amino acids and biogenic amines by RP-HPLC.** The amino acid and biogenic amine contents were determined simultaneously using the method described by Gómez-Alonso et al. (2007). A Varian ProStar HPLC (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) was used, equipped with a ProStar 240 ternary pump, a ProStar 410 autosampler and a ProStar 330 photodiode array detector. The compounds analysed were identified on the basis of the aminoenone derivative retention times of the corresponding patterns (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) and were quantified using the internal pattern method.

**Polysaccharide extraction and determination by HRSEC/RID.** The samples were processed using the methodology described by Ayestarán et al. (2004). Briefly, 10 mL of sample in duplicate were concentrated to a final volume of 2 mL using a vacuum evaporator (Univap 148 100ECH; Progen Scientific, London, UK). Total soluble polysaccharides were precipitated by adding 10 mL of cold acidified ethanol (hydrochloric acid 0.3 M in absolute ethanol) and kept for 24

h at 4°C. The samples were then centrifuged (10,000 × g for 15 min) and the supernatants discarded. Finally, the precipitates were dissolved in 1 mL of ultra-pure water, frozen to -20°C and freeze-dried using a lyophilizer (Telstar LyoQuest HT40, Barcelona, Spain). The soluble fractions were analysed by high-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC) in order to determine molecular distribution and quantify the polysaccharides obtained from the samples (Ayestarán et al. 2004). The lyophilized samples were resuspended in 1 mL of 50 mM ammonium formate and filtered through 0.22 µm acetate cellulose filters (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Then 100 µL were injected into the chromatographic system. The analyses were carried out in an HPLC Agilent 1200 Series system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) with a refractive index detector. Separation was carried out at 20°C using two Shodex gel permeation HPLC columns (OHpak SB-803 HQ and SB-804 HQ, 300 mm × 8 mm I.D.; Showa Denko, Japan). The mobile phase consisted of an aqueous solution of 50 mM ammonium formate applied with a constant flow of 0.6 mL/min for 60 min, and the cell RID temperature was 35°C. The molecular weight distribution of the wine fractions was followed by calibration with a Shodex P-82 pullulan calibration kit (P-5, MW

= 5.9 kDa; P-10, MW = 11.8 kDa; P-20, MW = 22.8 kDa; P-50, MW = 47.5 kDa; P-100, MW = 112 kDa; P-200, MW = 212 kDa; P-400, MW = 404 kDa; and P-800, MW = 788 kDa) purchased from Waters (Barcelona, Spain) and four dextrans (BioChemika; 12, 25, 50 and 80 kDa) purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA). The polysaccharides were quantified according to the peak area for each fraction using the external standard method with pectin and dextran commercial standards (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in a range between 0 and 2 g/L ( $r^2 > 0.99$ ).

**Preparation of sample proteins.** 15 mL of each sample were dialyzed in duplicate in tubes with a molecular weight cutoff of 3.5 kDa (Membrane Filtration Products Inc., San Antonio, TX, USA). The dialyzed samples were lyophilized and preserved at -20°C.

**Determination of proteins by HRSEC-DAD.** The soluble fractions were analysed by high-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC) in order to determine molecular distribution and quantify the proteins obtained from the samples (Canals et al. 1998). The lyophilized samples were resuspended in 0.6 µL of 300 mmol/L ammonium acetate and centrifuged (12 000 × g for 5 min). The supernatant was filtered through 0.22 µm acetate cellulose filters (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and then 100 µL of



---

## RESULTADOS-CAPÍTULO 1

---

supernatant was injected into the chromatographic system. The analyses were carried out in an HPLC Agilent 1200 Series system (Agilent Technologies, Barcelona, Spain) with a diode array detector (DAD) to monitor output at 230 and 320 nm. Separation was carried out at 20°C using an S 165 Shodex gel permeation HPLC column (OHpak 166 SB-803 HQ, 300mm× 8mm i.d.; Showa Denko, Tokyo, Japan). The mobile phase consisted of an aqueous solution of 300 mmol/L ammonium acetate applied at a constant flow of 0.6 mL/min for 70 min. The proteins were quantified according to the peak area for each fraction using the external standard method with bovine serum albumin (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) in a range between 0 and 1 mg/mL ( $r^2 > 0.99$ ).

**Volatile compounds analysis.** The volatile compounds of the wines were extracted with dichloromethane and analysed by gas chromatography, using a methodology adapted from Ferreira et al. (1998). For the extraction, in a 12 mL glass tube, 10 mL of wine were added with 2.5 g of ammonium sulfate and 0.5 mL of dichloromethane. As internal standards, 75 µL of a solution of heptanoic acid (672 mg/L) and 4-methyl-2-pentanol (784 mg/L) were added. The extraction was carried out for 1 h in an orbital shaker at 110 rpm. Chromatographic analysis

was carried out using a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID) (Agilent 6890) and an automatic sampler (Agilent 7683). The capillary chromatographic column was a Meta.WAX polar column (60 m in length, 0.25 mm ID and 0.5 µm of phase thickness) from Teknokroma (Barcelona, Spain). The temperatures of the injector and detector were 250°C and 260°C respectively. 2 µL were injected in split mode (1:5) and the oven temperature program was 40°C (5 min), 7°C/min up to 100°C (15 min), 3°C/min up to 140°C and 2°C/min up to 200°C (15 min). The carrier gas was helium with a column-head flow ramp of 0.5 mL/min (28 min) and 5 mL/min up to 1.1 mL/min (77 min). Quantification was performed by interpolation into calibrations built by extraction of synthetic solutions doped with all the analytes at different levels.

**Analysis of individual low-molecular-mass phenolic substances in wine.** The flavonols and hydroxycinnamic acid derivatives in the rosé wines were analyzed after removal of interfering anthocyanins by solid-phase extraction (Lago-Vanzela et al. 2013), while no removal step was necessary for the white wines. All the previously cited phenolic compounds were analysed by the reversed-phase HPLC–diode array detector–electrospray ionization–tandem mass

spectrometry system (RP-HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>) following previously described methods (Blanco-Vega et al. 2011, Lago-Vanzela et al. 2013). This comprised an Agilent 1100 series HPLC (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with a DAD (G1315B) and an LC/MSD Trap VL (G2445C VL) ESI-MS<sup>n</sup>, coupled to an Agilent ChemStation (version B.01.03) data processing station. The mass spectral data were processed using Agilent LC/MS Trap software (version 5.3).

**Statistics.** All physical and chemical data are expressed as the arithmetic average  $\pm$  the standard deviation from three replicates. One-factor analysis of variance (ANOVA), Turkey comparison tests, Pearson's correlation of data and principal component analysis were carried out using IBM SPSS Statistics 19 software (International Business Machines S.A., Madrid, Spain).

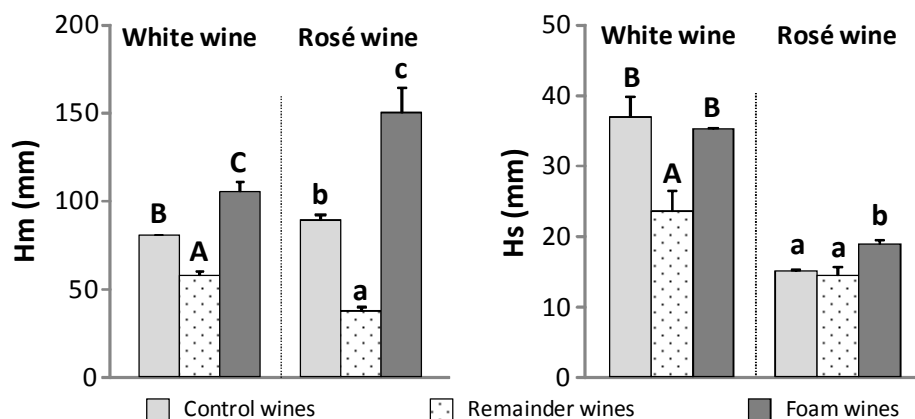
## Results and discussion

Figure 1 shows the foam properties of the three fractions of base wines: control wines (CW), remainder wines (RW) and foam wines (FW). In both wines, white and rosé, the maximal height of the foam (HM) increased in

FW and decreased in RW in respect to their corresponding CW. This behaviour was significant in both wines but it was more accentuated in the case of rosé wine. The behaviour of the stable height of the foam (HS) was not as clear as in the case of HM but it did show some interesting differences. No significant differences in HS were found between CW and FW in the case of the white wine, but the HS of the remainder wine was significantly lower than in CW and FW. In contrast, the HS of the foam wine was significantly higher than in CW and RW in the case of rosé wine. These results are very similar to those obtained by Bissonet and Maujean (1991) and Gallart et al. (2002) and confirm that overflowing foam leads to wines with improved foam parameters, especially HM. In contrast, the foam properties of the remainder wines are worsened. The fact that there are differences in the foam properties of FW, RW and CW suggests that some changes in the chemical composition took place during the process of wine fractionation by CO<sub>2</sub> sparging.

## RESULTADOS-CAPÍTULO 1

Figure 1. Foam properties of control wines, remainder wines and foam wines



All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates  $\pm$  standard deviation. Hm: maximal height of the foam; Hs: stable height of the foam. Different Capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of white wines. Different Lowercase letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of rosé wines.

In synthesis, this seems to indicate that the foam wine was enriched in positive substances (or impoverished in negative substances) for the foam and that the opposite happened with the remainder wine. Gallart et al. (2002) reported that FW were enriched and RW impoverished in fatty acids in respect to the original wine. However, they also reported a negative correlation between fatty acid concentrations and HM, which appears to be somewhat contradictory. Since Gallart et al. (2002) provided no complementary information on other possible differences in the chemical composition of FW and RW in respect to the control wine, we decided to carry out a more complete chemical and physical analysis of the different wine fractions.

Table 1 shows the standard parameters, CIElab coordinates and physical parameters of the control wines, remainder wines and foam wines. The ethanol content of FW of both base wines was significantly lower than in CW and RW. This lower ethanol concentration is probably due to the evaporation generated by CO<sub>2</sub> sparging during the fractionation process. This lower ethanol concentration observed in the FW may be one of the main reasons for the observed improvement in foam properties, since it has been reported that ethanol exerts a negative effect (Dussaud et al. 1994, Girbau-Sola et al. 2002, Esteruelas et al. 2015). However, the observed increase in HM in the foam wines cannot be explained by this slight but significant ethanol reduction alone. The

titratable acidity of RW in both base wines was significantly higher than in FW, with the values of CW generally being at an intermediate level. Tartaric acid concentration of RW was significantly higher than FW and CW in the case of white base wine, but this trend was not observed in the case of rosé. The pH of RW was significantly higher than in FW in the case of rosé wine, but this trend was not detected in the case of white wine. No significant differences were found in lactic acid, malic acid or glycerol levels in the different fractions of both base wines.

The CIELab coordinates of the three fractions of the white base wine were similar in all cases. In contrast, the  $C^*$ ,  $h^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  of FW in the rosé base wine were significantly higher than in CW and RW. This indicates that foam wine from rosé wine has a slightly deeper colour than the other fractions.

The density of FW was significantly higher in both base wines than in their corresponding CW. In the case of rosé wine, the density of the FW fraction was also significantly higher than in RW, but this difference was not detected in the white base wine. This higher density may be related to the observed lower ethanol concentration of FW.

The viscosity of FW was significantly lower in both base wines than in their corresponding

CW. The viscosity of FW was also significantly lower than RW in the case of white base wine but not in the case of rosé. These changes in viscosity may also be related to the lower ethanol content of the FW fraction, since the higher the ethanol content the higher the viscosity (Yanniotis et al. 2007).

The surface tension of the original wines was significantly higher than in their corresponding FW and RW fractions. The fact that both fractions have lower surface tension than the original wine seems somewhat surprising. Surface tension is lower when the ethanol content is higher (Glampedaki et al. 2010). In the case of the RW fractions, which have a similar ethanol content to their corresponding original wines, this lower surface tension may simply be related to the loss of some substances that enhance this physical property during the CO<sub>2</sub> sparging process. However, FW has lower surface tension than CW even though its ethanol concentration is lower. The only possible explanation is that FW was enriched in other surface tension agents, such as proteins, that compensate for the lower ethanol content of this fraction.

Tables 2 and 3 show the amino acid and biogenic amine contents of the three fractions of both base wines. No significant differences

RESULTADOS-CAPÍTULO 1

Table 1. Standard parameters, CIELab coordinates and physical parameters of control wines, remainder wines and foam wines

Parameter	White Wine			Rosé Wine		
	Control Wine	Remainder Wine	Foam Wine	Control Wine	Remainder Wine	Foam Wine
<i>Standard parameters</i>						
Tartaric acid (g/L)	2.62 ± 0.06 <b>A</b>	2.76 ± 0.05 <b>B</b>	2.65 ± 0.01 <b>A</b>	1.88 ± 0.04 <b>a</b>	1.87 ± 0.06 <b>a</b>	1.89 ± 0.06 <b>a</b>
Malic acid (g/L)	ND	ND	ND	0.78 ± 0.01 <b>a</b>	0.75 ± 0.01 <b>a</b>	0.78 ± 0.02 <b>a</b>
Lactic acid (g/L)	1.90 ± 0.09 <b>A</b>	1.91 ± 0.06 <b>A</b>	1.87 ± 0.02 <b>A</b>	1.64 ± 0.02 <b>a</b>	1.62 ± 0.02 <b>a</b>	1.63 ± 0.02 <b>a</b>
Ethanol (% v/v)	10.96 ± 0.04 <b>B</b>	10.95 ± 0.02 <b>B</b>	10.51 ± 0.01 <b>A</b>	11.05 ± 0.07 <b>b</b>	10.85 ± 0.02 <b>b</b>	10.27 ± 0.25 <b>a</b>
pH	2.99 ± 0.04 <b>A</b>	2.99 ± 0.01 <b>A</b>	2.97 ± 0.01 <b>A</b>	3.13 ± 0.02 <b>ab</b>	3.17 ± 0.03 <b>b</b>	3.11 ± 0.02 <b>a</b>
Glycerol (g/L)	4.80 ± 0.21 <b>A</b>	4.81 ± 0.08 <b>A</b>	5.04 ± 0.25 <b>A</b>	5.35 ± 0.09 <b>a</b>	5.40 ± 0.27 <b>a</b>	5.28 ± 0.07 <b>a</b>
TA (g/L)	5.27 ± 0.09 <b>A</b>	5.52 ± 0.01 <b>B</b>	5.22 ± 0.01 <b>A</b>	5.27 ± 0.11 <b>ab</b>	5.44 ± 0.07 <b>b</b>	5.14 ± 0.00 <b>a</b>
<i>CIELab coordinates</i>						
L*	98.20 ± 0.00 <b>A</b>	98.20 ± 0.00 <b>A</b>	98.13 ± 0.06 <b>A</b>	95.4 ± 0.1 <b>a</b>	95.3 ± 0.1 <b>a</b>	95.3 ± 0.1 <b>a</b>
C*	6.08 ± 0.04 <b>A</b>	6.16 ± 0.11 <b>A</b>	6.25 ± 0.07 <b>A</b>	6.35 ± 0.01 <b>a</b>	6.35 ± 0.01 <b>a</b>	6.46 ± 0.05 <b>b</b>
h*	96.89 ± 0.56 <b>A</b>	96.05 ± 0.29 <b>A</b>	96.02 ± 0.21 <b>A</b>	8.95 ± 0.01 <b>a</b>	8.94 ± 0.01 <b>a</b>	9.67 ± 0.08 <b>b</b>
a*	-0.73 ± 0.06 <b>A</b>	-0.65 ± 0.02 <b>A</b>	-0.66 ± 0.03 <b>A</b>	6.27 ± 0.02 <b>a</b>	6.28 ± 0.00 <b>a</b>	6.36 ± 0.04 <b>b</b>
b*	6.04 ± 0.04 <b>A</b>	6.12 ± 0.11 <b>A</b>	6.21 ± 0.07 <b>A</b>	0.99 ± 0.01 <b>a</b>	0.99 ± 0.00 <b>a</b>	1.09 ± 0.01 <b>b</b>
<i>Physical parameters</i>						
Density (g/mL)	0.9909 ± 0.0001 <b>A</b>	0.9912 ± 0.0002 <b>AB</b>	0.9913 ± 0.0001 <b>B</b>	0.9914 ± 0.0001 <b>a</b>	0.9916 ± 0.0002 <b>a</b>	0.9920 ± 0.0002 <b>b</b>
Viscosity (mPa/s)	1.13 ± 0.01 <b>B</b>	1.13 ± 0.01 <b>B</b>	1.11 ± 0.01 <b>A</b>	1.11 ± 0.01 <b>b</b>	1.09 ± 0.01 <b>ab</b>	1.07 ± 0.01 <b>a</b>
Surface Tension (N/m)	67.59 ± 0.01 <b>B</b>	65.73 ± 0.01 <b>A</b>	65.74 ± 0.01 <b>A</b>	57.22 ± 0.00 <b>b</b>	55.50 ± 0.01 <b>a</b>	55.52 ± 0.01 <b>a</b>

All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates ± standard deviation. TA, titratable acidity expressed as g of tartaric acid/L; CIELab coordinates, Lightness (L\*), Chroma (C\*), Hue (h\*), red-greenness component (a\*), and yellow-blueness component (b\*). ND: Non-detected. Different Capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of white wines. Different Lowercase letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of rosé wines.

were found in ammonium, in any of the 24 amino acids analysed or in any of the 5 biogenic amines in the three fractions of the white base wine, and only slight but significant differences in hydroxyproline concentrations were observed in the rosé base wine. Some authors have reported the existence of a significant correlation between free amino acids and biogenic amines with foamability parameters (Moreno-Arribas et al. 2000, Martínez-Lapiente et al. 2015). However, these studies were carried out by analysing several samples without comparing the possible differences between the foam and the original wine. According to our results, no differences were observed and therefore it could be considered that there is neither enrichment nor impoverishment of amino acids in the foam formed by bubbling.

Table 4 shows the volatile compounds (esters, higher alcohols and fatty acids) of the three fractions of both base wines. In general the total volatile compounds of FW wines tended to be lower than in their corresponding CW in both base wines, whereas RW tended to have intermediate values. Indeed, significant decreases were observed in the concentrations of total esters, higher alcohols and fatty acids of both FW in respect to their corresponding CW, the only exception being the higher alcohols of white base wine.

Specifically, the total ester concentration of the FW was 14.6% lower than its corresponding CW in the case of white base wine and 7.3% in the case of the rosé wine. This decrease in both base wines was mainly due to ethyl lactate. The total higher alcohol concentration of FW was 4.4% in white wine and 12.2% in rosé wine. Finally, the decrease in the total fatty acids in the FW was 47.9% in the white wine and 11.4% in the rosé. This is not in agreement with the results described by Gallart et al. (2002), who found a higher fatty acid content in foam wines. Additionally, the levels of the different families of volatile compounds of the RW wines tended to be similar or somewhat lower than in their corresponding CW.

The lower concentration of these volatile compounds may be partly due to an uncontrolled evaporation caused by the CO<sub>2</sub> sparging process used to fraction the base wines. However, the intensity of the decrease varies depending on each volatile compound and also in function of the matrix, white or rosé wine. This may be related to the interactions between the non-volatile wine matrix and each of the aroma volatile compounds (Rodríguez-Bencomo et al. 2011) that could prevent (or enhance) the transport of the compounds to the foam.

## RESULTADOS-CAPÍTULO 1

Table 2. Amino acid content of control wines, remainder wines and foam wines

Amino acid composition (mg/L)	White Wine			Rosé Wine		
	Control Wine	Remainder Wine	Foam Wine	Control Wine	Remainder Wine	Foam Wine
Ammonium	1.84 ± 0.41 A	1.87 ± 0.49 A	1.66 ± 0.05 A	1.90 ± 0.33 a	1.73 ± 0.06 a	1.63 ± 0.24 a
Aspartic acid	8.03 ± 0.84 A	7.98 ± 1.01 A	8.28 ± 0.18 A	10.43 ± 0.87 a	9.78 ± 0.22 a	9.71 ± 0.38 a
Glutamic acid	17.96 ± 2.25 A	17.61 ± 2.69 A	19.91 ± 0.32 A	18.73 ± 1.00 a	18.30 ± 0.20 a	18.13 ± 0.34 a
Asparagine	5.76 ± 0.67 A	5.66 ± 0.81 A	6.32 ± 0.12 A	7.67 ± 0.54 a	7.32 ± 0.07 a	7.41 ± 0.26 a
Serine	3.84 ± 0.44 A	3.80 ± 0.53 A	4.04 ± 0.09 A	5.39 ± 0.48 a	5.00 ± 0.08 a	5.03 ± 0.24 a
HO-Proline	5.83 ± 0.72 A	5.75 ± 0.88 A	6.23 ± 0.19 A	4.25 ± 0.29 ab	3.95 ± 0.08 a	4.65 ± 0.20 b
Glutamine	5.60 ± 0.78 A	5.50 ± 0.93 A	6.20 ± 0.12 A	6.77 ± 0.52 a	6.28 ± 0.09 a	6.49 ± 0.17 a
Histidine	1.59 ± 0.22 A	1.56 ± 0.26 A	1.75 ± 0.03 A	1.36 ± 0.14 a	1.28 ± 0.03 a	1.42 ± 0.04 a
Glycine	4.78 ± 0.62 A	4.71 ± 0.73 A	5.22 ± 0.10 A	5.85 ± 0.26 a	5.76 ± 0.05 a	5.71 ± 0.08 a
Threonine	3.42 ± 0.26 A	3.38 ± 0.30 A	3.64 ± 0.09 A	4.47 ± 0.29 a	4.92 ± 0.15 a	4.72 ± 0.22 a
β-alanine	3.69 ± 0.44 A	3.65 ± 0.53 A	3.93 ± 0.09 A	3.87 ± 0.32 a	3.67 ± 0.01 a	3.63 ± 0.23 a
Arginine	8.97 ± 1.25 A	8.75 ± 1.55 A	10.20 ± 0.62 A	14.11 ± 1.12 a	13.61 ± 0.25 a	12.88 ± 0.59 a
GABA	6.09 ± 0.77 A	5.98 ± 0.91 A	6.70 ± 0.08 A	7.28 ± 0.35 a	7.24 ± 0.09 a	7.21 ± 0.20 a
α-alanine	5.86 ± 0.73 A	5.72 ± 0.90 A	6.67 ± 0.28 A	8.51 ± 0.28 a	8.51 ± 0.08 a	8.12 ± 0.78 a
Proline	301.8 ± 35.4 A	300.0 ± 42.6 A	312.1 ± 5.6 A	228.2 ± 14.6 a	237.2 ± 4.8 a	229.6 ± 6.4 a
Tyrosine	4.02 ± 0.37 A	3.96 ± 0.44 A	4.38 ± 0.04 A	8.29 ± 0.37 a	8.11 ± 0.09 a	8.17 ± 0.19 a
Valine	6.81 ± 0.54 A	6.79 ± 0.64 A	6.93 ± 0.08 A	7.24 ± 0.63 a	7.52 ± 0.21 a	7.96 ± 0.59 a
Methionine	0.87 ± 0.15 A	0.87 ± 0.19 A	0.90 ± 0.12 A	1.47 ± 0.20 a	1.51 ± 0.03 a	1.42 ± 0.04 a
Cysteine	16.40 ± 2.05 A	16.39 ± 2.51 A	16.45 ± 0.56 A	20.18 ± 2.07 a	20.29 ± 2.90 a	18.16 ± 1.02 a
Isoleucine	3.88 ± 0.54 A	3.85 ± 0.65 A	4.08 ± 0.06 A	4.87 ± 0.34 a	4.68 ± 0.08 a	4.64 ± 0.21 a
Tryptophan	1.18 ± 0.15 A	1.19 ± 0.17 A	1.13 ± 0.04 A	1.25 ± 0.12 a	1.10 ± 0.04 a	1.15 ± 0.14 a
Leucine	12.45 ± 1.51 A	12.26 ± 1.82 A	13.52 ± 0.23 A	15.17 ± 1.12 a	14.56 ± 0.29 a	14.50 ± 0.66 a
Phenylalanine	9.87 ± 1.21 A	9.73 ± 1.45 A	10.70 ± 0.14 A	11.46 ± 0.61 a	11.12 ± 0.14 a	11.05 ± 0.42 a
Ornithine	3.79 ± 0.37 A	3.74 ± 0.43 A	4.03 ± 0.07 A	1.65 ± 0.10 a	1.70 ± 0.02 a	1.68 ± 0.07 a
Lysine	16.98 ± 2.16 A	16.73 ± 2.59 A	18.42 ± 0.30 A	20.01 ± 1.27 a	19.13 ± 0.28 a	19.03 ± 0.63 a
Total	461.34 ± 54.87 A	457.44 ± 66.02 A	483.44 ± 9.65 A	420.44 ± 28.23 a	424.24 ± 10.38 a	414.07 ± 14.37 a

All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates ± standard deviation. Different Capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of white wines. Different Lowercase letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of rosé wines.

Some information on the influence of esters and higher alcohols on wine foam properties have previously been reported but it seems to be rather inconclusive (Gallart et al. 2002). In contrast, fatty acids seem to have a negative effect on beer foam (Bravi et al. 2017) and in

sparkling wines (Vanrell et al. 2002). The decrease in the total content of fatty acids observed in the FW could therefore be one of the possible reasons why the foam parameters are higher than in RW and CW.

Table 3. Biogenic amine content of control wines, remainder wines and foam wines

Biogenic amines composition (mg/L)	White Wine			Rosé Wine		
	Control Wine	Remainder Wine	Foam Wine	Control Wine	Remainder Wine	Foam Wine
Histamine	0.88 ± 0.06 A	0.88 ± 0.07 A	0.89 ± 0.03 A	1.19 ± 0.12 a	1.10 ± 0.01 a	1.19 ± 0.08 a
Agmatine	2.22 ± 0.38 A	2.19 ± 0.47 A	2.44 ± 0.11 A	2.99 ± 0.33 a	2.65 ± 0.10 a	2.62 ± 0.06 a
Tyramine	0.27 ± 0.02 A	0.27 ± 0.03 A	0.28 ± 0.01 A	0.27 ± 0.03 a	0.23 ± 0.08 a	0.29 ± 0.03 a
Putrescine	5.40 ± 0.71 A	5.31 ± 0.85 A	5.93 ± 0.07 A	4.33 ± 0.14 a	4.36 ± 0.06 a	4.35 ± 0.09 a
Cadaverine	0.27 ± 0.02 A	0.27 ± 0.03 A	0.28 ± 0.01 A	0.18 ± 0.02 a	0.17 ± 0.01 a	0.17 ± 0.01 a
Total	9.04 ± 1.20 A	8.90 ± 1.44 A	9.81 ± 0.22 A	8.95 ± 0.63 a	8.52 ± 0.27 a	8.62 ± 0.28 a

All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates ± standard deviation. Different Capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of white wines. Different Lowercase letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of rosé wines.

Table 5 shows the phenolic compounds of the three fractions of both base wines. No significant differences were found between FW, RW and CW in any of the base wines. Other authors have found no clear correlation between phenolic compounds and foam properties (Girbau-Sola et al. 2002, Martínez-Lapiente et al. 2015).

Figure 2 shows the results of protein analysis by HRSEC-DAD of the control, remainder and foam wines. In the case of rosé wine, three fractions were obtained. The high molecular weight fraction (HMW) has a molecular weight (MW) higher than 80 kDa, the intermediate molecular weight fraction (IMW) has an MW

between 80 and 60 kDa and the low molecular weight fraction (LMW) has an MW below 60 kDa. However, in the case of white wine only two fractions were detected: HMW and IMW. The lack of an LMW fraction in the white wine was probably because this wine was previously treated with bentonite to eliminate the risk of protein haze

No significant differences were found in the total protein concentration of CW and FW in the case of white wine. However, FW showed a significantly higher total protein concentration than RW, and this behaviour was found in the two detected molecular weight fractions. In contrast, the rosé wine FW



RESULTADOS-CAPÍTULO 1

Table 4. Volatile compounds of control wines, remainder wines and foam wines

Compound	White Wine			Rosé Wine								
	Control Wine	Remainder Wine	Foam Wine	Control Wine	Remainder Wine	Foam Wine						
<i>Esters (mg/L)</i>												
Ethyl butyrate	0.28 ± 0.02	<b>B</b>	0.24 ± 0.01	<b>B</b>	0.1 ± 0.01	<b>A</b>	0.32 ± 0.02	<b>c</b>	0.25 ± 0.01	<b>b</b>	0.12 ± 0.02	<b>a</b>
Ethyl hexanoate	0.41 ± 0.02	<b>B</b>	0.56 ± 0.03	<b>C</b>	0.2 ± 0.04	<b>A</b>	0.60 ± 0.04	<b>c</b>	0.34 ± 0.02	<b>b</b>	0.20 ± 0.06	<b>a</b>
Ethyl lactate	152.3 ± 8.1	<b>B</b>	136.3 ± 0.6	<b>A</b>	129.9 ± 3.2	<b>A</b>	132.2 ± 1.4	<b>b</b>	132.6 ± 5.0	<b>ab</b>	123.3 ± 3.3	<b>a</b>
Ethyl octanoate	1.31 ± 0.06	<b>B</b>	1.41 ± 0.11	<b>B</b>	0.73 ± 0.11	<b>A</b>	1.22 ± 0.16	<b>b</b>	0.73 ± 0.01	<b>a</b>	0.92 ± 0.10	<b>a</b>
Ethyl decanoate	0.83 ± 0.01	<b>A</b>	0.71 ± 0.25	<b>A</b>	0.89 ± 0.04	<b>A</b>	ND	-	ND	-	ND	-
Diethyl succinate	3.41 ± 0.01	<b>A</b>	3.40 ± 0.04	<b>A</b>	3.44 ± 0.31	<b>A</b>	0.49 ± 0.03	<b>a</b>	0.51 ± 0.03	<b>a</b>	0.47 ± 0.03	<b>a</b>
Ethyl dodecanoate	0.77 ± 0.06	<b>A</b>	0.86 ± 0.02	<b>A</b>	0.82 ± 0.06	<b>A</b>	ND	-	ND	-	ND	-
2-Phenylethyl acetate	0.10 ± 0.01	<b>B</b>	0.09 ± 0.00	<b>B</b>	0.05 ± 0.00	<b>A</b>	0.18 ± 0.01	<b>b</b>	0.17 ± 0.01	<b>b</b>	0.13 ± 0.02	<b>a</b>
<b>Total</b>	159.4 ± 8.2	<b>B</b>	143.5 ± 0.5	<b>A</b>	136.2 ± 3.0	<b>A</b>	135.0 ± 1.1	<b>b</b>	134.6 ± 5.5	<b>b</b>	125.1 ± 3.2	<b>a</b>
<i>Higher alcohols (mg/L)</i>												
1-propanol	16.84 ± 0.91	<b>B</b>	14.24 ± 0.52	<b>A</b>	13.12 ± 0.81	<b>A</b>	19.83 ± 0.76	<b>a</b>	19.14 ± 1.64	<b>a</b>	16.86 ± 1.47	<b>a</b>
2-Methyl-1-propanol	18.39 ± 0.93	<b>A</b>	21.75 ± 0.59	<b>B</b>	18.27 ± 0.62	<b>A</b>	18.97 ± 0.25	<b>b</b>	19.11 ± 1.02	<b>b</b>	14.06 ± 0.50	<b>a</b>
1-butanol	0.38 ± 0.02	<b>B</b>	0.29 ± 0.01	<b>A</b>	0.28 ± 0.01	<b>A</b>	0.42 ± 0.00	<b>b</b>	0.41 ± 0.03	<b>b</b>	0.35 ± 0.02	<b>a</b>
2-Methyl-1-butanol	27.45 ± 1.19	<b>A</b>	33.38 ± 1.09	<b>B</b>	28.96 ± 1.27	<b>A</b>	23.75 ± 0.33	<b>b</b>	23.38 ± 0.79	<b>b</b>	20.56 ± 0.56	<b>a</b>
3-Methyl-1-butanol	152.0 ± 6.8	<b>AB</b>	168.3 ± 3.0	<b>B</b>	151.1 ± 7.7	<b>A</b>	143.7 ± 1.8	<b>b</b>	144.1 ± 3.7	<b>b</b>	126.5 ± 3.5	<b>a</b>
1-Hexanol	1.28 ± 0.05	<b>B</b>	1.30 ± 0.01	<b>B</b>	1.13 ± 0.05	<b>A</b>	1.21 ± 0.06	<b>b</b>	1.16 ± 0.02	<b>ab</b>	1.04 ± 0.08	<b>a</b>
β-Phenylethanol	36.09 ± 2.34	<b>A</b>	37.56 ± 0.36	<b>A</b>	38.45 ± 1.37	<b>A</b>	26.19 ± 0.51	<b>a</b>	26.56 ± 0.47	<b>a</b>	26.28 ± 0.79	<b>a</b>
<b>Total</b>	252.4 ± 12.2	<b>AB</b>	276.8 ± 5.3	<b>B</b>	241.2 ± 7.3	<b>A</b>	234.1 ± 3.7	<b>b</b>	233.9 ± 3.7	<b>b</b>	205.6 ± 4.6	<b>a</b>
<i>Fatty acids (mg/L)</i>												
C4	1.34 ± 0.05	<b>B</b>	0.93 ± 0.03	<b>A</b>	0.87 ± 0.06	<b>A</b>	1.14 ± 0.02	<b>a</b>	1.12 ± 0.11	<b>a</b>	0.99 ± 0.10	<b>a</b>
C6	5.17 ± 0.15	<b>B</b>	4.35 ± 0.10	<b>A</b>	4.32 ± 0.02	<b>A</b>	4.72 ± 0.19	<b>a</b>	4.58 ± 0.05	<b>a</b>	4.60 ± 0.12	<b>a</b>
C8	8.64 ± 0.33	<b>C</b>	6.97 ± 0.27	<b>B</b>	3.09 ± 0.32	<b>A</b>	7.83 ± 0.35	<b>a</b>	5.84 ± 0.40	<b>b</b>	6.36 ± 0.27	<b>b</b>
C10	0.90 ± 0.04	<b>B</b>	1.12 ± 0.02	<b>C</b>	0.10 ± 0.03	<b>A</b>	1.72 ± 0.13	<b>b</b>	1.71 ± 0.21	<b>b</b>	1.38 ± 0.17	<b>a</b>
<b>Total</b>	16.05 ± 0.56	<b>C</b>	13.37 ± 0.40	<b>B</b>	8.37 ± 0.38	<b>A</b>	15.41 ± 0.65	<b>b</b>	13.33 ± 0.41	<b>a</b>	13.32 ± 0.23	<b>a</b>

All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates ± standard deviation. ND: Non-detected. Different Capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of white wines. Different Lowercase letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of rosé wines.

Table 5. Phenolic compounds of control wines, remainder wines and foam wines

Phenolic composition (mg/L)	White Wine			Rosé Wine		
	Control Wine	Remainder Wine	Foam Wine	Control Wine	Remainder Wine	Foam Wine
Caftaric acid	6,80 ± 0,19 A	6,82 ± 0,15 A	6,69 ± 0,52 A	6,01 ± 0,02 a	5,95 ± 0,05 a	6,00 ± 0,08 a
Coutaric acid	12,61 ± 0,28 A	11,88 ± 0,13 A	12,97 ± 1,30 A	4,65 ± 0,06 a	4,61 ± 0,03 a	4,65 ± 0,04 a
Caffeic acid	ND	ND	ND	4,92 ± 0,03 a	4,83 ± 0,09 a	4,87 ± 0,03 a
Fertaric acid	2,01 ± 0,08 A	1,75 ± 0,30 A	1,50 ± 0,34 A	1,06 ± 0,06 a	0,96 ± 0,06 a	0,97 ± 0,04 a
Quercetin-3-glucuronide	0,10 ± 0,01 B	0,08 ± 0,01 A	0,07 ± 0,01 A	0,44 ± 0,06 a	0,41 ± 0,06 a	0,38 ± 0,01 a
Syringetin-3-glucoside	ND	ND	ND	0,45 ± 0,02 a	0,44 ± 0,02 a	0,42 ± 0,03 a
Total	21,53 ± 0,57 A	20,54 ± 0,59 A	21,24 ± 2,18 A	17,53 ± 0,24 a	17,20 ± 0,32 a	17,29 ± 0,23 a

All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates ± standard deviation. ND: Non-detected. Different Capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of white wines. Different Lowercase letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of rosé wines.

had a significantly higher total protein concentration than CW and RW. This behaviour was also found in the HMW and IMW fractions. The IMW fraction of FW was also significantly higher than in CW, but this difference was not significant in the case of RW. This indicates that the FW were enriched and the RW impoverished in proteins, which confirms the important role that proteins exert on the film composition of the foam. Brissonet and Maujean (1991) reported similar results using the Bradford method for protein estimation (Bradford 1976). Our data confirm this using a more specific procedure.

Figure 3 shows the results of polysaccharide analysis by HRSEC-RID. In both the wines studied, three fractions were obtained. The high molecular weight fraction (HMW) had an MW higher than 53 kDa, the intermediate molecular weight fraction (IMW) had an MW between 5 and 53 kDa and the low molecular

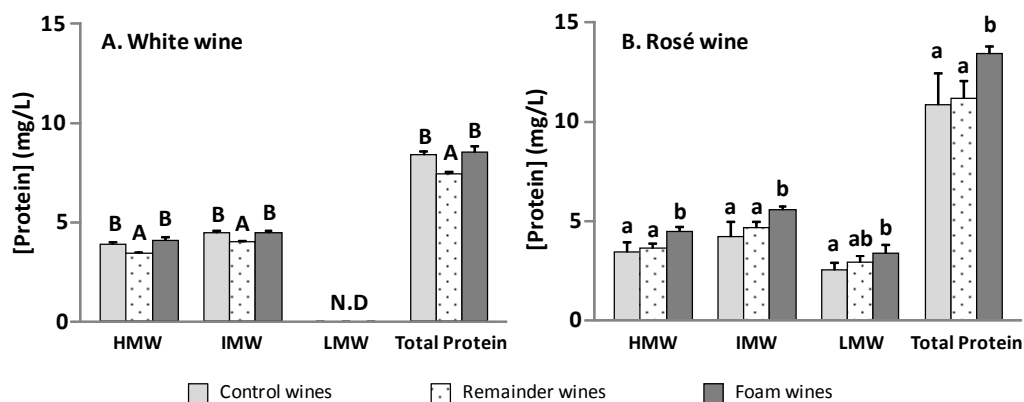
weight fraction (LMW) had an MW lower than 5 kDa.

In the case of white wine, no significant differences were found in the total polysaccharide concentration between FW and the other wine fractions. This behaviour was similar in the three MW fractions. In the case of rosé wine, the total polysaccharide concentration of RW was slight but significantly lower than in FW and CW. This difference was due only to the HMW fraction, since no significant differences were detected in the other polysaccharide fractions. The participation of manoproteins and polysaccharides in the film composition of the foam has been suggested by some authors (Martínez-Lapuente et al. 2013). However, most of these studies were carried out using the Dubois method (Dubois et al. 1956) for polysaccharide estimation (Brissonet and

RESULTADOS-CAPÍTULO 1

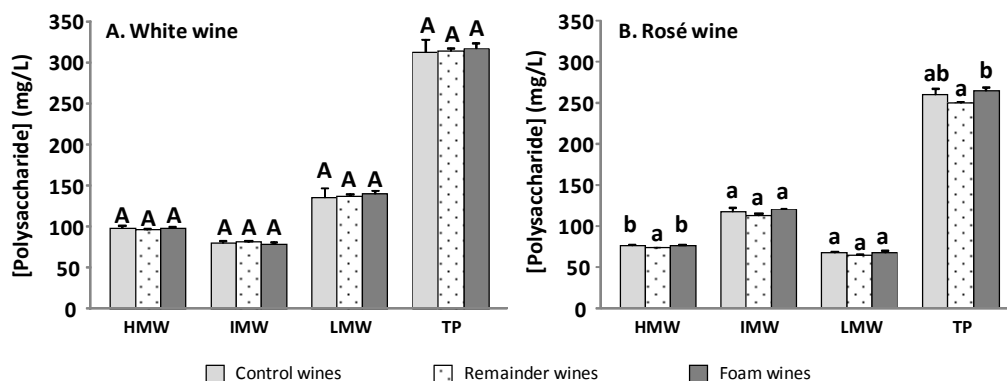
Maujean 1991), which is neither very specific nor accurate.

Figure 2. Protein fraction of control wines, remainder wines and foam wines



All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates  $\pm$  standard deviation. HMW: High molecular weight protein fraction (MW > 80 kDa); IMW: Intermediate molecular weight protein fraction (80 kDa > MW > 60 kDa); LMW: Low molecular weight protein fraction (MW < 60 kDa); N.D: Non-detected. Different Capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of white wines. Different Lowercase letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of rosé wines.

Figure 3. Polysaccharide fraction of control wines, remainder wines and foam wines



All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates  $\pm$  standard deviation. HMW: High molecular weight polysaccharide fraction (709-53 kDa); IMW: Intermediate molecular weight polysaccharide fraction (53-5 kDa); LMW: Low molecular weight polysaccharide fraction (5-0 kDa); TP: Total polysaccharides. Different Capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of white wines. Different Lowercase letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples of rosé wines.

More recently, Martínez-Lapuente et al. (2015) found no significant correlation between

polysaccharides and foamability using more appropriate analytical techniques. Our results

show that foam wines have a very similar polysaccharide composition to their corresponding remainder and control wines, which suggests that polysaccharides are not key compounds for the film composition of the foam.

In order to better understand which factors determine wine foaming properties, a statistical correlation was performed. Table 6 shows the Pearson correlation coefficients and  $p$  values obtained for foamability (Hm) and foam persistence (Hs) in relation to the different parameters analysed of white and rosé wines.

In the case of white wine, Hm showed a significant ( $p < 0.05$ ) positive correlation only with proteins (total and HMW and IMW fractions), whereas it showed a significant negative correlation with ethanol, titratable acidity, total higher alcohols and viscosity. Hm also showed a high negative correlation with total fatty acids, being not significant by a very small margin ( $p = 0.051$ ). Meanwhile Hs showed a significant positive correlation with proteins (total and HMW and IMW fractions) and total phenols, whereas it correlated negatively with tartaric acid, titratable acidity and total higher alcohols.

In the case of rosé wine, Hm correlated ( $p < 0.05$ ) positively with proteins (total and the

three MW fractions), polysaccharides (total and the three MW fractions), malic acid and some of the CIELab coordinates ( $C^*$ ,  $h^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ), whereas it correlated negatively with ethanol, titratable acidity, pH, total higher alcohols and total esters. Meanwhile Hs correlated positively with proteins (total and the three MW fractions), polysaccharides (total and IMW fraction), CIELab coordinates ( $C^*$ ,  $h^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ) and density, whereas it correlated negatively with ethanol, titratable acidity, pH, total higher alcohols, total esters and viscosity.

The correlation analysis enables some obvious conclusions to be drawn which confirm previous reported data, such as proteins being a positive factor for wine foam (Coelho et al. 2011, Esteruelas et al. 2015) but ethanol being the opposite (Dussaud et al. 1994, Girbau-Sola et al. 2002, Esteruelas et al. 2015). However, it seems that other factors do or do not have an effect on wine foam depending on the wine, white or rosé, which makes it very difficult to draw conclusions about their influence on wine foam. For that reason principal component analysis (PCA) was carried out using those parameters, as this enables better separation between the three wine fractions.

Figures 4 and 5 show the plot of varimax-rotated principal component analysis for white and rosé wine. In both cases PCA enables

## RESULTADOS-CAPÍTULO 1

---

separation of the three fractions of the wine with an explained aggregate variance for the two components of over 80%. The loadings are presented as arrows, the length and direction of which indicate the contribution made by both components. In the case of white wine, the three fractions were separated perfectly through PC1, placing FW at the right, RW at the left and CW in the centre. PC2, meanwhile, only separated CW from the other two fractions, with CW being placed at the top of the graphic and FW and RW in the lower part.

The results obtained for rosé wine showed a generally similar trend to the PCA obtained for white wine, although with certain differences. In this case FW was separated from CW and RW through PC1, placing FW to the right and CW and RW to the left. Meanwhile PC2 enabled RW to be separated from CW, placing CW above RW.

The arrows corresponding to both foam parameters, Hm and Hs, were directed towards the right in both PCAs, indicating that samples placed more to the right have better foam properties. This is why PC1 perfectly separated FW from CW and RW, since this fraction has significantly higher foam parameters. The total protein arrow in both PCAs was directed towards the right, whereas ethanol, higher alcohols and titratable acidity

were directed more or less to the left. The fatty acids arrow is also directed towards the left-hand side, but upwards as well. This indicates that the FW fraction was enriched in proteins and impoverished in ethanol, higher alcohols, titratable acidity and fatty acids. Since proteins have been described as positive factors for foam (Pueyo et al. 1995, Vanrell et al. 2007, Esteruelas et al. 2015), and ethanol (Dussaud et al. 1994, Girbau-Sola et al. 2002, Esteruelas et al. 2015) and fatty acids (Bravi et al. 2017) as negative factors, these changes perfectly explain why the FW fraction has higher foam parameters than CW and RW.

The arrow corresponding to ethanol, esters and fatty acids are directed towards the opposite side of the FW fraction in both PCAs. This only confirms that their concentration was lower in FW than in the other two fractions, probably because the CO<sub>2</sub> sparging process used to fraction the base wines caused a partial evaporation.

Table 6. Pearson's correlation coefficients between maximal (Hm) and stable (Hs) heights of the foam and the analyzed wine components

Parameter	White Base Wine				Rosé Base Wine				
	Hm		Hs		Hm		Hs		
	PCC	<i>p</i>	PCC	<i>p</i>	PCC	<i>p</i>	PCC	<i>p</i>	
Ethanol	<b>-0.8555</b>	<b>0.003</b>	-0.3637	0.336	<b>-0.7290</b>	<b>0.026</b>	<b>-0.8616</b>	<b>0.003</b>	
Malic acid	-	-	-	-	<b>0.7599</b>	<b>0.017</b>	0.5151	0.156	
Lactic acid	-0.3325	0.382	-0.2231	0.564	0.0444	0.910	-0.2132	0.582	
Tartaric acid	-0.6189	0.076	<b>-0.8635</b>	<b>0.003</b>	0.3573	0.345	0.4313	0.246	
Titrateable acidity	<b>-0.8731</b>	<b>0.002</b>	<b>-0.9075</b>	<b>0.001</b>	<b>-0.8581</b>	<b>0.003</b>	<b>-0.8097</b>	<b>0.008</b>	
pH	-0.3513	0.354	-0.0609	0.876	<b>-0.7520</b>	<b>0.019</b>	<b>-0.6910</b>	<b>0.039</b>	
Glycerol	0.3949	0.293	0.1227	0.753	-0.3891	0.301	-0.1744	0.654	
Total aminoacids	0.2765	0.471	0.1267	0.745	-0.1966	0.612	-0.1460	0.708	
Total biogenic amines	0.4055	0.279	0.1940	0.617	0.1666	0.668	-0.0063	0.987	
Total Phenols	0.5355	0.137	<b>0.6982</b>	<b>0.036</b>	0.0208	0.958	-0.0229	0.953	
Total Higher Alcohols	<b>-0.9257</b>	<b>0.001</b>	<b>-0.8192</b>	<b>0.007</b>	<b>-0.8736</b>	<b>0.002</b>	<b>-0.9694</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	
Total Fatty acids	-0.6635	0.051	-0.0551	0.888	-0.0273	0.944	-0.2906	0.448	
Total Esters	-0.3307	0.385	0.2414	0.532	<b>-0.7182</b>	<b>0.029</b>	<b>-0.7943</b>	<b>0.011</b>	
Polysaccharides	HMW	0.0353	0.928	0.0256	0.948	<b>0.8291</b>	<b>0.006</b>	0.5941	0.092
	IMW	-0.5672	0.111	-0.4731	0.198	<b>0.7958</b>	<b>0.010</b>	<b>0.7314</b>	<b>0.025</b>
	LMW	-0.0318	0.935	-0.3004	0.432	<b>0.6841</b>	<b>0.042</b>	0.5005	0.170
	Total	-0.1493	0.701	-0.2937	0.443	<b>0.8464</b>	<b>0.004</b>	<b>0.6898</b>	<b>0.040</b>
Proteins	HMW	<b>0.9471</b>	<b>0.000</b>	<b>0.8236</b>	<b>0.006</b>	<b>0.8591</b>	<b>0.003</b>	<b>0.9416</b>	<b>0.001</b>
	IMW	<b>0.8215</b>	<b>0.007</b>	<b>0.8479</b>	<b>0.004</b>	<b>0.7969</b>	<b>0.010</b>	<b>0.9098</b>	<b>0.001</b>
	LMW	-	-	-	-	<b>0.7062</b>	<b>0.033</b>	<b>0.8847</b>	<b>0.002</b>
	Total	<b>0.9048</b>	<b>0.001</b>	<b>0.8451</b>	<b>0.004</b>	<b>0.8022</b>	<b>0.009</b>	<b>0.9206</b>	<b>0.000</b>
CIELab Coordinates	L*	-0.5910	0.094	-0.2857	0.456	-0.2542	0.509	-0.4056	0.279
	C*	0.4823	0.189	-0.1182	0.762	<b>0.8380</b>	<b>0.005</b>	<b>0.8897</b>	<b>0.001</b>
	h*	-0.0465	0.905	0.5750	0.105	<b>0.8913</b>	<b>0.001</b>	<b>0.9489</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	a*	-0.0746	0.849	-0.6212	0.074	<b>0.7690</b>	<b>0.015</b>	<b>0.8436</b>	<b>0.004</b>
	b*	0.4669	0.205	-0.1608	0.679	<b>0.8846</b>	<b>0.002</b>	<b>0.9442</b>	<b>0.001</b>
Density	0.2564	0.505	-0.3149	0.409	0.6467	0.060	<b>0.7180</b>	<b>0.029</b>	
Surface Tension	-0.0248	0.949	0.5691	0.110	-0.0375	0.924	-0.3447	0.364	
Viscosity	<b>-0.7319</b>	<b>0.025</b>	-0.1492	0.702	-0.4809	0.190	<b>-0.6719</b>	<b>0.047</b>	

PCC: Pearson's correlation coefficient; HMW, high molecular weight; IMW, intermediate molecular weight; LMW, low molecular weight. CIELab coordinates, Lightness (L\*), Chroma (C\*), Hue (h\*), red-greenness component (a\*), and yellow-blueness component (b\*). Numbers in bold indicates the existence of significant correlation ( $p < 0.05$ ).

RESULTADOS-CAPÍTULO 1

Figure 4. Plot of varimax-rotated principal components analysis for white control wine and its corresponding remainder wine and foam wine

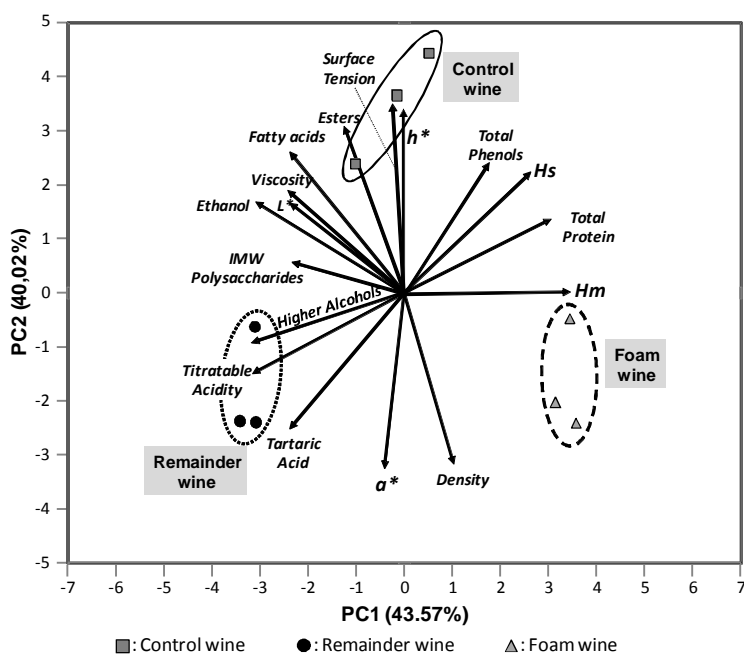
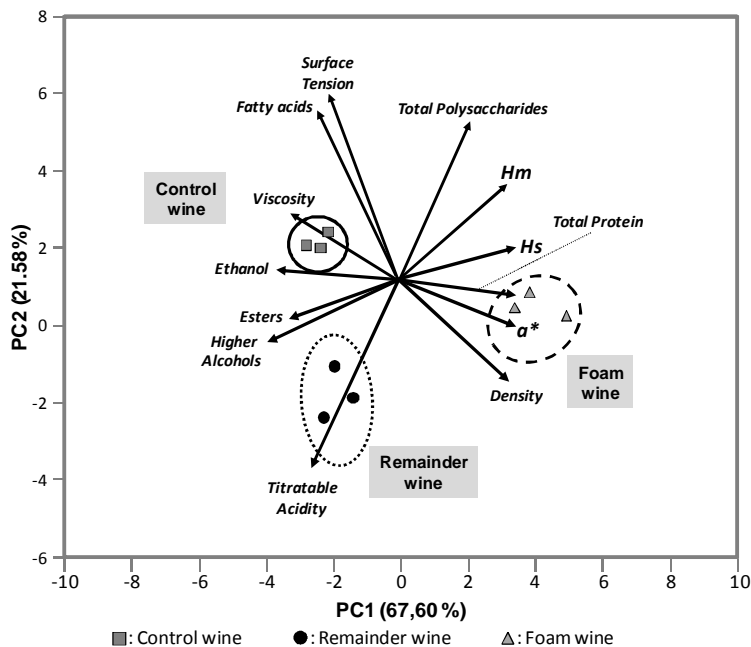


Figure 5. Plot of varimax-rotated principal components analysis for rosé control wine and its corresponding remainder wine and foam wine



The arrows corresponding to the physical parameters of the wines also showed similar behaviour in both PCAs. Surface tension was directed upwards whereas density was directed downwards. This means that CW has higher surface tension and lower density than the other two fractions. The lower density of CW is simply explained by its higher ethanol content. However, the higher surface tension must be due to other factors, since a higher ethanol content implies lower surface tension (Glampedaki et al. 2010). In any case, surface tension does not seem to have any relation to Hm or Hs. Viscosity was directed towards the left-hand side of the graphic in both PCAs. This means that FW is less viscous than CW and RW. Since the higher the ethanol content the higher the viscosity (Yanniotis et al. 2007), this is explained by the lower ethanol concentration of FW.

In the case of the white wine PCA, the CIELab coordinate  $h^*$  was directed upwards whereas  $a^*$  was directed downwards practically in parallel with PC2. In contrast,  $L^*$  is directed towards the upper left-hand side of the graphic. These data may be related to the total phenols, since  $h^*$  is more or less aligned with the total phenol arrow and  $a^*$  and  $L^*$  go more or less in the opposite direction. In the case of rosé wine, the CIELab coordinate  $a^*$  was directed to the right nearly in parallel with PC1.

This indicates that FW has a deeper red colour than the other fraction, probably because it has been enriched in anthocyanins. Martínez-Lapuente et al. (2015) have reported that anthocyanins have a positive effect on wine foam properties, which would also help to explain, in the case of the rosé wine, why FW has higher Hm and Hs than the other fractions. Evidently this behaviour was not detected in the white wine PCA because no anthocyanins were present.

### Conclusion

It can be concluded that the wines obtained from the overflowed foam (FW) have more enhanced foam parameters than their corresponding original wine (CW) and the remainder wine (RW). This improvement is probably because FW is enriched in proteins and impoverished in ethanol and fatty acids. The foam wine is also impoverished in esters and titratable acidity and has higher density and lower surface tension and viscosity. Some of these changes, those associated with volatile compounds, can be attributed to the partial evaporation caused by the CO<sub>2</sub> sparging process used to fraction the base wines. However, the enrichment in non-volatile compounds, especially proteins, must be associated with the fact that these tensoactive substances participate in the structure of the bubble's film, which implies a higher



## RESULTADOS-CAPÍTULO 1

---

concentration in the wine obtained after they collapse.

### Acknowledgments

This work has been funded by CDTI (Program CIEN) "Nuevas estrategias vitivinícolas para la sostenibilidad y el incremento de la competitividad del sector en el mercado internacional (VINySOST 2014)." Authors also want to thank Juvé & Camps SA winery for providing the wines.

### Literature cited

Ayala F, Echávarri JF and Negueruela AI. 1997. A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rosé wines. *Am J Enol Vitic* 48:357–363.

Ayala F, Echávarri JF and Negueruela A.I. 2014. MSCV®. <http://www.unirioja.es/color/descargas.shtml> [accessed August 2014].

Ayestarán B, Guadalupe Z and León D. 2004. Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo V.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal Chim Acta* 513:29–39.

Bamforth CW. 1985. The foaming properties of beer. *J I Brewing* 91:370–383.

Beaumont F, Liger-Belair G and Polidori G. 2016. Unveiling self-organized two-dimensional (2D) convective cells in champagne glasses. *J Food Eng* 188:58–65.

Bhakta A and Ruckenstein E. 1997. Decay of standing foams: drainage, coalescence and collapse. *Adv Colloid Interface Sci* 70:1–124.

Blanco-Vega D, López-Bellido FJ, Alía-Robledo JM and Hermosín-Gutiérrez I. 2011. HPLC-DAD-ESI-MS/MS characterization of pyranoanthocyanins pigments formed in model wine. *J Agric Food Chem* 59:9523–9531.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 72: 248–245.

Bravi E, Marconi O, Sileoni V and Perretti G. 2017. Determination of free fatty acids in beer. *Food Chem* 215:341–346.

Brissonet F and Maujean A. 1991. Identification of some foam-active compounds in Champagne base wines. *Am J Enol Vitic* 42:97–102.

Brissonet F and Maujean A. 1993. Characterization of foaming proteins in a Champagne base wine. *Am J Enol Vitic* 44:297–301.

Canals JM, Arola L and Zamora F. 1998. Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *Am J Enol Vitic* 49:383–388.

Cilindre C, Liger-Belair G, Villaume S, Jeandet P and Marchal R. 2010. Foaming properties of various Champagne wines depending on several parameters: grape variety, aging, protein and CO<sub>2</sub> content. *Anal Chim Acta* 660:164–170.

Coelho E, Reis A, Domingues MR, Rocha SM and Coimbra MA. 2011. Synergistic Effect of High and Low Molecular Weight Molecules in the Foamability and Foam Stability of Sparkling Wines. *J Agric Food Chem* 59:3168–3179.

Dambrouck T, Marchal R, Cilindre C, Parmentier M and Jeandet P. 2005. Determination of the grape invertase content (using PTA-ELISA) following various fining treatments versus changes in the total protein content of wine. Relationships with wine foamability. *J Agric Food Chem* 53:8782–8789.

Dressaire E, Bee R, Bell DC, Lips A and Stone HA. 2008. Interfacial Polygonal Nanopatterning of Stable Microbubbles. *Science* 320:1198–1200.

DuBois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P and Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28(3):350–356.

Dussaud A, Robillard B, Carles B, Duteurtre B and Vignes-Adler M. 1994. Exogenous lipids and ethanol influences on the foam behaviour of sparkling base wines. *J Food Sci* 59:148–151.

- Esteruelas M, González-Royo E, Kontoudakis N, Orte A, Cantos A, Canals JM and Zamora F. 2015. Influence of grape maturity on the foaming properties of base wines and sparkling wines (Cava). *J Sci Food Agric* 95: 2071–2080.
- Ferreira V, López R, Escudero A and Cacho JF. 1998. Quantitative determination of trace and ultratrace flavour active compounds in red wines through gas chromatographic-ion trap mass spectrometric analysis of microextracts. *J Chromatogr A* 806(2): 349–354.
- Gallart M, López-Tamames E, Suberbiola G and Buxaderas S. 2002. Influence of Fatty Acids on Wine Foaming. *J Agric Food Chem* 50 (24):7042–7045.
- Girbau-Sola T, López-Tamames E, Bujan J and Buxaderas S. 2002. Foam Aptitude of Trepat and Monastrell Red Varieties in Cava Elaboration. 1. Base Wine Characteristics. *J Agric Food Chem* 50: 5596–5599.
- Glampedaki P, Hatzidimitriou E, Paraskevopoulou A and Pegiadou-Koemtzopoulou S. 2010. Surface tension of still wines in relation to some of their constituents: A simple determination of ethanol content. *J Food Comp Anal* 23:373–381.
- Gómez-Alonso S, Hermosín-Gutiérrez I and García-Romero E. 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *J Agric Food Chem* 55:608–613.
- Kupina SA and Shrikhande AJ. 2003. Evaluation of a Fourier Transform Infrared Instrument for Rapid Quality-Control Wine Analyses. *Am J Enol Vitic* 54:131–134.
- Lago-Vanzela ES, Rebello LPG, Ramos AM, Stringheta PC, Da-Silva R, García-Romero E, Gómez-Alonso S and Hermosín-Gutiérrez I. 2013. Chromatic characteristics and color-related phenolic composition of Brazilian young red wines made from the hybrid grape cultivar BRS Violeta ('BRS Rúbea' × 'IAC 1398-21'). *Food Res Int* 54:33–43.
- Langevin D. 2015. Bubble coalescence in pure liquids and in surfactant solutions. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 20:92–97.
- Lao C, Santamaria A, López-Tamames E, Bujanc J, Buxaderas S and De la Torre-Boronat MC. 1999. Effect of grape pectic enzyme treatment on foaming properties of white musts and wines. *Food Chem* 65:169–173.
- Liger-Belair G. 2012. The physics behind the fizz in champagne and sparkling wines. A review. *Eur Phys J Special Topics* 201:1–88.
- López-Barajas M, López-Tamames E, Buxaderas S, Tomas X and De La Torre-Boronat MC. 1999. Prediction of wine foaming. *J Agric Food Chem* 47:3743–3748.
- Maujean A, Poinaut P, Dantan H, Brissonet F and Cossiez E. 1990. Étude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents II. Mise au point d'une technique de mesure de la moussabilité, de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bulletin de l'OIV* 711–712:405–426.
- Martínez-Lapuente L, Guadalupe Z, Ayestarán B, Ortega-Heras M and Pérez-Magariño S. 2013. Changes in polysaccharide composition during the sparkling winemaking and aging. *J Agric Food Chem* 61:12362–12373.
- Martínez-Lapuente L, Guadalupe Z, Ayestarán B and Pérez-Magariño S. 2015. Role of major wine constituents in the foam properties of white and rosé sparkling wines. *Food Chem* 174:330–338.
- Moreno-Arribas V, Pueyo E, Nieto FJ, Martín-Alvarez PJ and Polo MC. 2000. Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chem* 70:309–317.
- Péron N, Cagna A, Valade M, Marchal R, Maujean A, Robillard B, Aguié-Béghin V and Douillard R. 2000. Characterisation by drop tensiometry and by ellipsometry of the adsorption layer formed at the air/Champagne wine interface. *Adv Colloid Interface Sci* 88:19–36.
- Pueyo E, Martín-Álvarez PJ and Polo MC. 1995. Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cavas (sparkling wines). *Am J Enol Vitic* 46:518–524.
- Rodríguez-Bencomo JJ, Muñoz-González C, Andújar-Ortiz I, Martín-Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV and Pozo-Bayón MÁ. 2011. Assessment of the effect of the non-volatile wine matrix on the

---

**RESULTADOS-CAPÍTULO 1**

---

volatility of typical wine aroma compounds by headspace solid phase microextraction/gas chromatography analysis. *J Sci Food Agric* 91: 2484–2494.

Schramm LL. 2005. *Emulsions, Foams and Suspensions: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

Senée J, Robillard B and Vignes-Adler M. 1999. Films and foams of Champagne wines. *Food Hydrocoll* 13:15-26.

Trossais J and Asselin C. 1965. Influence de teneurs en acide Malique des mouts sur le dosage de l'acide tartrique par colorimétrie avec le metavanadate. *Vigne Vin* 19 (4):249-259.

Vanrell G, Cabanillas P, Albet S, Canals JM, Arola L and Zamora F. 2002. Étude des composés influençant la mousse des cavas. *Rev Fr OEnol* 196:30-36.

Vanrell G, Canals R, Esteruelas M, Fort F, Canals JM and Zamora F. 2007. Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chem* 104:148-155.

Yanniotis S, Kotseridis G, Orfanidou A and Petraki A. 2007. Effect of ethanol, dry extract and glycerol on the viscosity of wine. *J Food Process Eng* 81:399-403

## Capítulo 2. Efecto de la inoculación secuencial (*Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae*) en la primera fermentación sobre las propiedades espumantes del vino espumoso

La utilización de inóculos de levaduras No-*Saccharomyces* en fermentaciones mixtas (co-inoculación o inoculación secuenciada), con el objetivo de mejorar la calidad y complejidad de los vinos, es una tendencia que en los últimos años está ganando interés.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación, se comprobó que la inoculación secuencial de *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* durante la primera fermentación, producía vinos base con mejores propiedades espumantes (HM y HS) que las del vino base obtenido mediante inoculación convencional, probablemente debido a que estos vinos presentaban una mayor concentración de proteínas. Por este motivo nos planteamos estudiar si las propiedades espumantes de los Cavas producidos a partir de los vinos base obtenidos por inoculación secuenciada, conservaban esas mejores características espumantes. Los resultados muestran que efectivamente la inoculación secuenciada con *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* permite obtener vinos espumosos con mejores propiedades espumantes.

Los análisis de los vinos fueron llevados a cabo en el laboratorio de Tecnología Enológica (TECNENOL) de la Universitat Rovira i Virgili. Los resultados del estudio fueron publicados en la revista *European Food Research and Technology*.

Medina-Trujillo, L., González-Royo, E., Sieczkowski, N., Heras, J., Canals, J.M., & Zamora, F. (2017). **Effect of sequential inoculation (*Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the foaming properties of sparkling wine.** *European Food Research and Technology*, 243, 681-688. DOI: 10.1007/s00217-016-2781-2.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

## Effect of sequential inoculation (*Torulaspota delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the foaming properties of sparkling wine

Laura Medina-Trujillo<sup>a</sup>, Elena González-Royo<sup>a</sup>, Nathalie Sieczkowski<sup>b</sup>, José Heras<sup>b</sup>, Joan

Miquel Canals<sup>a</sup> and Fernando Zamora<sup>a</sup>,

<sup>a</sup> Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, C/Marcel·li Domingo, 1. 43007 Tarragona, Spain

<sup>b</sup> Lallemand BIO S.L., C/ Galileu 303, 1<sup>a</sup> planta. 08028 Barcelona, Spain

### Abstract

In a previous study we reported that sequential inoculation of *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* during the first fermentation increased the protein concentration and improved the foaming properties of a base wine. Since effervescence and foam of sparkling wines are key quality factors, the interest of this practice for sparkling wine industry is obvious. In this paper we study whether the foaming properties of the sparkling wines produced from the base wines obtained by sequential inoculation with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* remains better than those of their controls produced from base wines fermented only with *S. cerevisiae*. The obtained results confirmed that sequential inoculation in the production of the base wine originated sparkling wines with significantly higher maximum heights of foam than conventional inoculation, probably because autolysis of the *T. delbrueckii* cells in the base wine released higher amounts of proteins, especially of the low molecular weight fraction.

**Keywords** *Torulaspota delbrueckii* · *Saccharomyces cerevisiae* · Sequential inoculation · Sparkling wine · Foam

## RESULTADOS-CAPÍTULO 2

---

### Introduction

The quality of sparkling wines depends on several factors, including effervescence and foam [1]. One of the main concerns of the sparkling wine industry is therefore to find new ways of improving foamability and foam persistence. The foaming properties of sparkling wines depend largely on their chemical composition [2], which is closely related to grape variety and maturity and the winemaking conditions [3]. It has been reported that foam stability is favored by the presence of surfactant agents such as proteins, mannoproteins and polysaccharides, whose surface properties stabilize the interface of the bubbles [4]. In fact, it has been reported that all winemaking treatments that decrease the protein concentration dramatically affect the wine's foaming properties [5, 6]. The sparkling wine industry is therefore usually extremely careful with every factor that affect the protein levels of musts, base wines and sparkling wines, such as the maturity level [7], the pressing process [3], discoloration with charcoal [8], bentonite fining [9, 10], and the use of certain riddling agents [11]. Several strategies for improving foam properties have also been proposed. These include supplementation with inactive dried yeasts [12] and the selection of different

strains of *Saccharomyces cerevisiae* with higher autolytic capacities [13].

It is well known that the development of some non-*Saccharomyces* yeasts such as *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora spp* and *Pichia kluyveri* during alcoholic fermentation can improve the quality and complexity of wine [14, 15]. Specifically, positive effects have been reported on aroma, glycerol, polysaccharides, mannoproteins and volatile acidity either by using mixed cultures or through the sequential inoculation of different species of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* [16, 17, 18, 19]. Some strains of these non-*Saccharomyces* yeasts are available in the market in the form of Active Dry Yeast and the International Organization of Vine and Wine (OIV) is currently updating its information on non-*Saccharomyces* yeasts.

*T. delbrueckii* is one of the most promising non-*Saccharomyces* yeasts because it increases glycerol concentration, reduces the content of acetic acid and acetaldehyde, and enhances total acidity of wines [20, 14]. It has also been reported that *T. delbrueckii* increases the presence of certain volatile compounds [21] because of its higher  $\beta$ -glucosidase activity. Some strains of *T. delbrueckii* also appear to have a greater polysaccharide production capacity than *S.*

*cerevisiae* [22, 23]. More recently, our research group has proposed using *T. delbrueckii* to improve the foaming properties of sparkling wines [24]. A sequential inoculation of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* during the first fermentation increased the protein concentration and both the maximal (HM) and stable height (HS) of the foam of the base wine by the Mosalux method. However, it has not yet been verified whether this effect remains in sparkling wine after the second fermentation. In this paper we study whether sparkling wines produced from the base wines obtained by sequential inoculation with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* present better foaming properties than their controls produced from base wines fermented only with *S. cerevisiae*.

## Material and methods

### Chemicals

All products were of high purity and suitable for high-performance liquid chromatography (HPLC). Ammonium formate and ammonium acetate with grade purity  $\geq 99.0\%$  were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Absolute ethanol was supplied by VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Hydrochloric acid and sodium hydroxide were provided by Panreac (Barcelona, Spain). Pure

water was obtained from a Milli-Q purification system (EMD Millipore, Billerica, MA, USA).

### Base wines

White monovarietal base wines were produced in the experimental winery of the Oenology Faculty of the Rovira i Virgili University in Constantí (Tarragona, Spain) with Macabeo grapes from vineyards belonging to Juve & Camps SL in Espiells [AOC Cava; 41°27' 1.8972" (N) and 1°49' 6.6216" (E)] during the 2013 vintage and as described in a previous study [24]. The grapes were picked manually, crushed and pressed to obtain a yield of 0.6 L/kg of grapes. The must was sulphited immediately (30 mg/L of potassium disulphite) and filtered with a rotary vacuum filter. The grape juice was then poured into six stainless steel tanks each with a capacity of 100 L. Three tanks were conventionally inoculated with 250 mg/L of a commercial *S. cerevisiae* yeast strain (QA23®, Lallemand Inc., Montreal, Canada) and the other three tanks were initially inoculated with 250 mg/L of commercial *T. delbrueckii* (Biodiva™, Lallemand Inc., Montreal, QC, Canada). Twenty-four hours later, when the density had fallen to around ten units, the tanks were re-inoculated with 250 mg/L of the control *S. cerevisiae* yeast strain (QA23®, Lallemand Inc., Montreal, QC, Canada). As shown in a previous study [24],



---

## RESULTADOS-CAPÍTULO 2

---

the imposition of the commercial strains of *T. delbruekii* and *S. cerevisiae* was verified.

All microvinifications were performed at  $18 \pm 1$  °C. Once the alcoholic fermentations had finished, the wines were racked and sulphited (40 mg/L of potassium disulphite). All wines were maintained in airtight vessels at 4 °C. Samples of the base wines were analyzed three months later.

### Sparkling winemaking

Sparkling wine (Cava) production was carried out by the traditional method with both base wines six months after the end of alcoholic fermentation. Both base wines were supplemented with 22 g L<sup>-1</sup> of sucrose, 30 mg L<sup>-1</sup> of bentonite as the riddling agent (Adjuvant 83; Station Oenotechnique du Champagne, Epernay, France) and  $2 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> of a pre-adapted yeast culture ((EC1118, Lallemand Inc., Montreal, QC, Canada). Twelve bottles of each base wine were prepared. The wines were then bottled and crown-corked. Nine months later, all the sparkling wines were disgorged, analyzed and tasted.

### Preparation of samples for analysis

The sparkling wines were centrifuged at 12,000 x g at 4 °C for 15 min (Sorvall RC-5C, Heraeus, Hanau, Germany). The supernatant was used directly to measure the foaming

properties and for chemical analysis (pH and ethanol content). For other analyses and to isolate the macromolecular fraction, the samples were previously degassed by magnetic stirring in an Erlenmeyer flask for 15 min.

### Standard wine analysis

The analytical methods recommended by the OIV were used to determine titratable acidity and volatile acidity [25]. Ethanol contents (% v/v) were measured using an ebullioscope (GAB systematic analytical, Barcelona, Spain) and pH was measured using a pH-meter Basic-20 (CRISON, Barcelona, Spain). Glycerol and sugars (D-glucose and D-fructose) were measured using enzymatic kits (R-Biopharm AG., Darmstadt, Germany).

### Supplementation of a still wine with macromolecular fraction from different sparkling wines

Aliquots of 300 mL of both previously degassed sparkling wines were dialyzed in tubes with a molecular weight cut-off of 3.5 kDa (Membrane Filtration Products Inc., San Antonio, TX, USA). The dialyzed samples were lyophilized and preserved at -20 °C. All the macromolecules contained in 300 mL of each of the two sparkling wines were dissolved in 450 mL of a still white wine in order to enrich it in the colloids. The original

wine and the enriched wines were used to analyze the foaming properties, the polysaccharides and the proteins.

### Measurement of the foaming properties

The samples were tempered at 18 °C for 24 h before analysis. Foamability and foam stability were measured using the Mosalux method [26]. A glass cylinder placed on a glass frit was filled with 100 mL of the sample. Carbon dioxide was then injected into the glass cylinder through the glass frit, with a constant gas flow of 115 mL/min under a constant pressure of 2 bars.

Two parameters were measured using a Mosalux apparatus (Station Oenotechnique de Champagne, Cormontreuil, France): HM, which is the maximum height reached by the foam after CO<sub>2</sub> injection through the glass frit; and HS, which is the stable height during CO<sub>2</sub> injection. HM represents foamability (the wine's ability to foam) and HS represents foam stability (the persistence of the foam collar, or the wine's ability to have a stable foam). Both of these parameters are expressed in mm. The Mosalux parameters were determined three times for each bottle of sparkling wine, which was analyzed in triplicate (3 bottles x 3 replicates per bottle).

### Preparation of sample proteins and determination by HRSEC DAD

Aliquots of sparkling wines (20 mL) were dialyzed in tubes with a molecular weight cut-off of 3.5 kDa (Membrane Filtration Products Inc., San Antonio, TX, USA). The dialyzed samples were lyophilized and preserved at -20 °C. The soluble fractions were analyzed by high-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC) in order to determine the molecular distribution and to quantify the proteins obtained from samples [27]. The lyophilized samples were resuspended in 0.4 µL of 300 mM ammonium acetate and centrifuged (12 000 × g for 5 min). The supernatant was filtered through 0.22 µm acetate cellulose filters (Millipore GSE) and 100 µL of supernatant was then injected into the chromatographic system. The analyses were carried out in an HPLC Agilent 1200 Series system (Agilent Technologies) with a diode array detector (DAD) to monitor output at 230 and 320 nm. Separation was carried out at 20 °C using a S 165 Shodex gel permeation HPLC column (OHpak 166 SB-803 HQ, 300mm× 8mm i.d.; Showa Denko). The mobile phase consisted of an aqueous solution of 300 mM ammonium acetate applied at a constant flow of 0.6 mL/min for 70 min. The proteins were quantified according to the peak area for each fraction using the

## RESULTADOS-CAPÍTULO 2

---

external standard method with bovine serum albumin between 0 and 1 mg/mL.

### **Polysaccharide extraction and determination by HRSEC-RID**

The samples were processed using the methodology described by [28]. Briefly, 10 mL of sample was concentrated to a final volume of 2 mL using a vacuum evaporator (Univap 148 100ECH; Progen Scientific, London, UK). Total soluble polysaccharides were precipitated by adding 10 mL of cold acidified ethanol (hydrochloric acid 0.3 M in absolute ethanol) and kept for 24 h at 4 °C. The samples were then centrifuged (10000 × g for 15 min) and the supernatants discarded. Finally, the precipitates were dissolved in 1 mL of ultra-pure water, frozen to -20 °C and freeze-dried using a lyophiliser (Telstar LyoQuest HT40 Beijer Electronics). The soluble fractions were analyzed by high-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC) in order to determine the molecular distribution and quantify the polysaccharides obtained from the samples [28]. The lyophilised samples were resuspended in 1 mL of 50 mM ammonium formate and filtered through 0.22 µm acetate cellulose filters (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Then, 100 µL was injected into the chromatographic system. The analyses were carried out in an HPLC Agilent 1200 Series system (Agilent

Technologies Inc., Santa Clara, USA) with a refractive index detector. Separation was carried out at 20 °C using two Shodex gel permeation HPLC columns (OHpak SB-803 HQ and SB-804 HQ, 300 mm × 8 mm I.D.; Showa Denko, Japan). The mobile phase consisted of an aqueous solution of 50 mM ammonium formate applied with a constant flow of 0.6 mL/min for 60 min, and the cell RID temperature was 35 °C. The molecular weight distribution of the wine fractions was followed by calibration with a pullulan calibration kit Shodex P-82 (P-5, MW=5.9 kDa; P-10, MW=11.8 kDa; P-20, MW=22.8 kDa; P-50, MW=47.5 kDa; P-100, MW=112 kDa; P-200, MW=212 kDa; P-400, MW=404 kDa; P-800, MW=788 kDa) purchased from Waters (Barcelona, Spain) and four dextrans (BioChemika; 12, 25, 50 and 80 kDa) purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA). The polysaccharides were quantified according to the peak area for each fraction using the external standard method with pectin and dextran commercial standards (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in the range between 0 and 2 g/L ( $r^2 > 0.99$ ).

### **Sensory analyses**

All sensory analyses were performed in the tasting room of the Faculty of Enology in Tarragona (Universitat Rovira i Virgili), which was designed according to UNE 87004.197.

Tasting was carried out with the ISO official tasting glasses (ISO 3591.1977). To evaluate the organoleptic characteristics of the various samples, all the sparkling wines were tasted by a group of twelve expert enologists from the Rovira i Virgili University. A sensory triangle test was conducted according to UNE ISO 4120.1983 in order to compare sparkling wine from conventional inoculation with sparkling wine from sequential inoculation.

The main objective was to determine whether the tasters were able to recognize which sparkling wine was different. The second objective was to determine which sparkling wine was preferred by the panelists who had correctly identified the various wines.

### Statistics

All physical and chemical data are expressed as the arithmetic average  $\pm$  the standard deviation from three replicates. One-factor analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test were carried out with SPSS software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). The level of significance of the sensory triangle test was determined by Jackson's method [29].

### Results and discussion

Table 1 shows the general parameters of the base wines and the sparkling wines. As expected, the ethanol content of the sparkling wines was around 1.3 % greater than that of

the base wines. This increase corresponds to the transformation of the added sugar (22 g/L) into ethanol with a transformation ratio of 16.9 g/L by ethanol degree. Since both base wines had similar ethanol contents, their corresponding sparkling wines also had similar values. In general, the titratable acidity of sparkling wines was significantly lower than in the base wines and their pH were significantly higher. These data are also logical because the increase in ethanol causes a decrease in hydrogen tartrate solubility [30]. Volatile acidity and glycerol concentration increased after the second fermentation and were significantly higher in the sparkling wines. In general, these changes between base wines and sparkling wines are in agreement with previously published data [31, 7].

In our previous study we observed that sequential inoculation with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* produced base wines with significantly higher glycerol contents and significantly lower volatile acidities than those obtained by conventional inoculation. These data are in agreement with those of other studies that showed that sequential inoculation with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* produced more glycerol and less acetic acid than conventional inoculation with *S. cerevisiae* [20, 14]. However, after the

## RESULTADOS-CAPÍTULO 2

second fermentation, the volatile acidity was identical in both sparkling wines. The glycerol concentration of the sparkling wine from sequential inoculation tended to be higher than that of the sparkling wine from

conventional inoculation, though this difference was not significant. It appears that the *prise de mousse* cushioned these effects.

Table 1. Influence of sequential inoculation (*Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the general parameters of base wine and sparkling wine

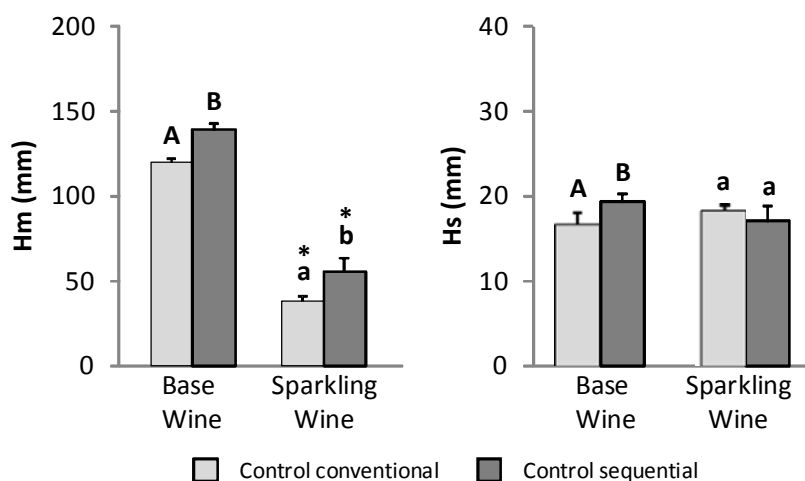
Parameter	Base Wine		Sparkling Wine	
	Conventional	Sequential	Conventional	Sequential
<b>Ethanol (%)</b>	10.7 ± 0.1 <b>A</b> $\alpha$	10.7 ± 0.1 <b>A</b> $\alpha$	12.0 ± 0.1 <b>A</b> $\beta$	11.9 ± 0.1 <b>A</b> $\beta$
<b>TA (g/L)</b>	5.68 ± 0.01 <b>A</b> $\beta$	5.60 ± 0.02 <b>A</b> $\beta$	5.25 ± 0.06 <b>A</b> $\alpha$	5.15 ± 0.06 <b>A</b> $\alpha$
<b>pH</b>	2.81 ± 0.01 <b>A</b> $\alpha$	2.80 ± 0.01 <b>A</b> $\alpha$	3.03 ± 0.01 <b>A</b> $\beta$	3.02 ± 0.01 <b>A</b> $\beta$
<b>VA (g/L)</b>	0.18 ± 0.01 <b>B</b> $\alpha$	0.12 ± 0.02 <b>A</b> $\alpha$	0.22 ± 0.02 <b>A</b> $\beta$	0.22 ± 0.04 <b>A</b> $\beta$
<b>Glycerol (g/L)</b>	4.70 ± 0.30 <b>A</b> $\alpha$	5.30 ± 0.14 <b>B</b> $\alpha$	5.80 ± 0.36 <b>A</b> $\beta$	6.37 ± 0.54 <b>A</b> $\beta$

All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates ± standard deviation. TA, titratable acidity expressed as g of tartaric acid/L; VA: volatile acidity expressed as g of acetic acid/L. Different Latin capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between conventional and sequential inoculations. Different Greek letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between base wines and its corresponding sparkling wines.

Figure 1 shows the foam properties of the base and sparkling wines. As expected, the maximal height of the foam (HM) was significantly lower in both sparkling wines than in their corresponding base wines. This diminution, which has previously been reported [31, 7], can be attributed to the increase in ethanol content, which exerts a negative effect on wine foamability [32], and to the absorption of proteins by bentonite added

as a riddling agent [11]. In contrast, the second fermentation did not lead to any difference in the stable height of the foam (HS). Our data therefore confirm that the *prise de mousse* decreases the maximal height of the foam.

Figure 1. Influence of sequential inoculation (*Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the foam properties of base wine and sparkling wine



All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates  $\pm$  standard deviation. Hm: maximal height of the foam; Hs: stable height of the foam. Different capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between base wines. Different lowercase letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between sparkling wines. \*: indicates the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between base wines and sparkling wines

In our previous study [24], we reported that sequential inoculation produced base wines with better foaming characteristics than conventional inoculation (significantly higher HM and HS values). Our present results confirm that HM is significantly higher in the sequential inoculation of sparkling wines than in conventional inoculation. However, we found no differences in HS. We may therefore assert that the positive effect on HM of sequential inoculation with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* observed in the base wines is maintained in the sparkling wines.

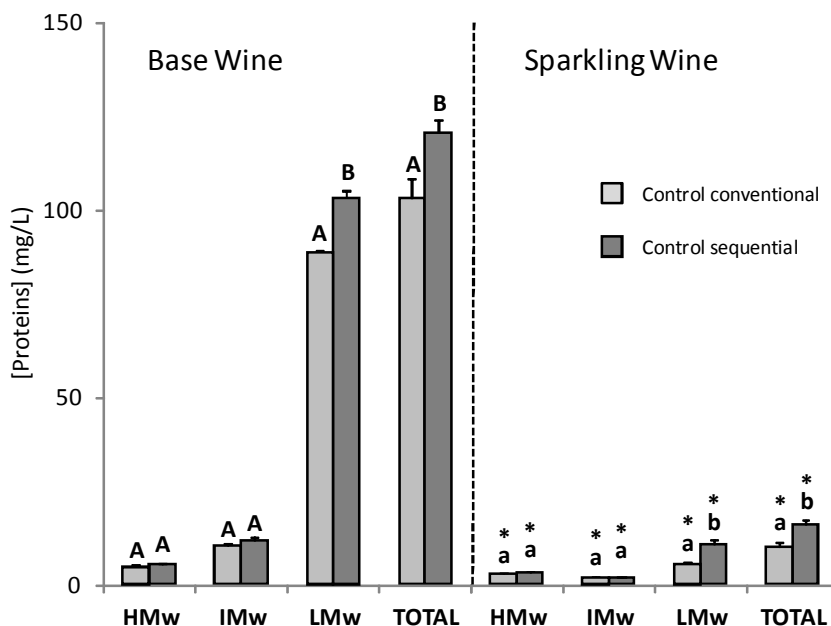
Figure 2 shows the protein fractions of the base wines and the sparkling wines. As expected, the total protein contents of the base wines were far higher than those of the sparkling wines. This sharp decrease in the total protein content of the sparkling wines was significant in both (conventional and sequential) wines and all molecular weight fractions, especially the low molecular weight fraction (LMW). It has previously been reported and largely attributed to the absorption of proteins by the bentonite used as a riddling agent [11]. Also, it is probably

## RESULTADOS-CAPÍTULO 2

one of the main reasons why HM is lower in sparkling wines than in their corresponding base wines. In our previous study [24], we showed that a base wine obtained by sequential inoculation with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* had a significantly higher protein concentration, especially of the Low Molecular Weight fraction (LMW), than its corresponding control obtained by conventional inoculation with *S. cerevisiae*. After the second fermentation and nine months of ageing, the

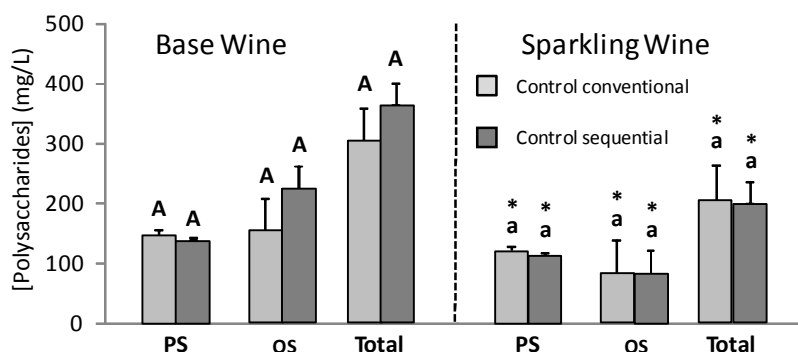
total protein of sparkling wines produced by sequential inoculation was still higher than that of conventional wines despite the decrease described above. This difference was again due to the LMW fraction. Since it has been reported that proteins have clear positive effects on foam [33], this greater concentration of the LMW protein fraction may be why sequential inoculation generates better foam properties than conventional inoculation in base wines and sparkling wines.

Figure 2. Influence of sequential inoculation (*Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the protein fraction of base wines and sparkling wines



All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates  $\pm$  standard deviation. HMw: High molecular weight protein fraction ( $M_w > 80$  kDa); IMw: Intermediate molecular weight protein fraction ( $80 \text{ kDa} > M_w > 60$  kDa); LMw: Low molecular weight protein fraction ( $M_w < 60$  kDa). Different capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between base wines. Different lowercase letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between sparkling wines. \*: indicates the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between base wines and sparkling wines

Figure 3. Influence of sequential inoculation (*Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the polysaccharides and oligosaccharides of base wine and sparkling wine



All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates  $\pm$  standard deviation. PS: Polysaccharides (MW > 5 kDa); OS: Oligosaccharides (MW: < 5 kDa). Different capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between base wines. Different lowercase letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between sparkling wines. \*: indicates the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between base wines and sparkling wines

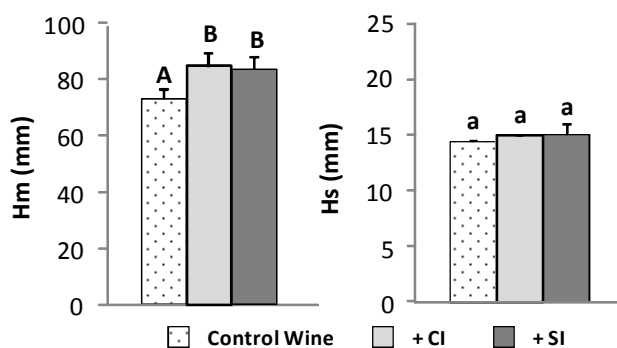
Figure 3 shows the polysaccharide fraction of base wines and sparkling wines. Again the concentration of polysaccharides in sparkling wines was significantly lower than in their corresponding base wines and this was true in all molecular weight fractions. Similar results have been reported by other authors [34, 35], who have attributed this decrease to precipitation. Since ethanol decreases the solubility of some polysaccharides, the increase in ethanol concentration caused by the second fermentation may explain this phenomenon. Another possible explanation is the absorption of some polysaccharides by the bentonite used as riddling agent or even by the dead yeast cells. No significant differences were found in total

polysaccharides of base wines between conventional and sequential inoculation [24], and similar results were observed in sparkling wines. In fact, all the molecular weight fractions of the base wines and sparkling wines were similar. Some strains of *T. delbrueckii* are reported to have a greater polysaccharide production capacity than *S. cerevisiae* [22, 23] but our results do not confirm this, probably because the strain of *T. delbrueckii* we used was different.



## RESULTADOS-CAPÍTULO 2

Figure 4. Influence of supplementation with the macromolecular fraction from the different sparkling wines on the wine foam parameters



All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates  $\pm$  standard deviation. Hm: maximal height of the foam; Hs: stable height of the foam. + : indicates supplementation with sparkling wine macromolecular fraction; CI: conventional inoculation; SI: Sequential inoculation. Different letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between base wines.

Table 2 shows the results of the sensory triangle test. Nine tasters out of twelve were able to distinguish the sparkling wine from sequential inoculation with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* from the sparkling wine from conventional inoculation with *S. cerevisiae*. These data are statistically significant ( $p = 0.01$ ) and indicate the existence of sensory differences between the two sparkling wines. Moreover, six of the nine tasters who correctly identified the different sample preferred the sparkling wine from sequential inoculation because its effervescence was more integrated and because it was generally less aggressive in the mouth. It seems, therefore, that the better foam properties measured are

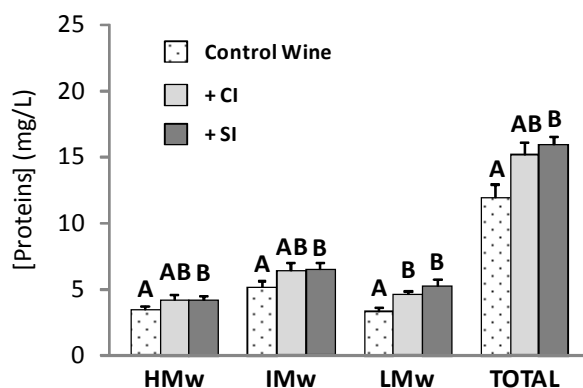
reflected in the sensory perception of effervescence.

Figure 4 shows the foam properties of a white wine in comparison with the same wine enriched with the macromolecular fractions of both sparkling wines – conventional (+ CI) and sequential (+ SI) – in order to determine how these colloids influence foamability. Our results indicate that supplementation with the macromolecular fraction of both sparkling wines significantly increased HM in comparison with the control wine. However, no differences were observed between the + SI and + CI wines. Moreover, enriching the wine with the macromolecular fraction of any of the sparkling wines did not affect HS.

Table 2. Sensorial analysis results for sparkling wines

Triangular test	Positive identifications	$p$	Preferences	
<i>Control vs Sequential</i>	9/12	0.01	<i>Control</i> 3	<i>Sequential</i> 6

Figure 5. Influence of supplementation with the macromolecular fraction from the different sparkling wines on the protein fraction



All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates  $\pm$  standard deviation. HMw: High molecular weight protein fraction ( $M_w > 80$  kDa); Imw: Intermediate molecular weight protein fraction ( $80$  kDa  $> M_w > 60$  kDa); LMw: Low molecular weight protein fraction ( $M_w < 60$  kDa). Different letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between base wines.

The protein fractions of the control wine and the enriched wines were analyzed (see Figure 5). The total protein concentration tended to be higher in the enriched wines but this increase was only significant in the case of the + SI wine. This behavior was also observed for the HMW and IMW protein fractions. However, the increase in LMW fraction was significant in both enriched wines. In general, these data are in agreement with the protein

concentrations observed in the different sparkling wines. Since sparkling wine from sequential inoculation was richer in proteins than the sparkling wine from conventional inoculation, it is logical that the protein concentration of the wine enriched with its colloids should also be richer. However, the increase in total protein concentration in both enriched wines was lower than expected considering the protein concentration of the

## RESULTADOS-CAPÍTULO 2

---

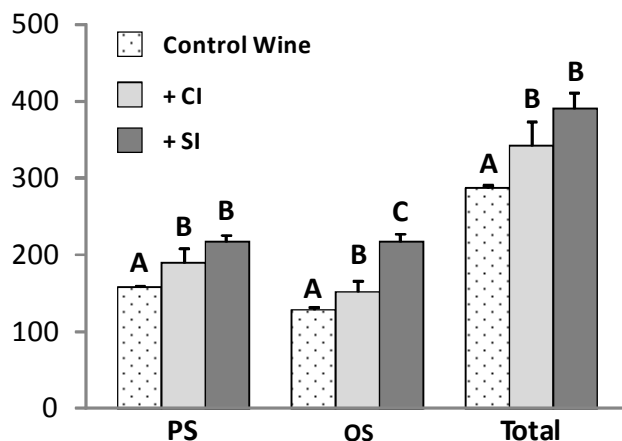
sparkling wines used to obtain the protein fraction for the enrichment. In fact, the recoveries were  $47.5 \pm 2.7$  % for + CI wine and  $37.0 \pm 3.7$  % for the + SI wine. This lower recovery, probably due to denaturation of proteins during the isolation process of the macromolecular fraction, may be the reason because the protein content of + SI wine was not significant for the + CI wine and was not reflected in its foam properties, which were similar to those of the + CI wine.

Figure 6 shows the polysaccharide fraction of the control wine and the enriched wines. In general, the total polysaccharide concentrations of both enriched wines were significantly higher than that of the control wine. These differences were found both in the polysaccharide fraction (PS) and in the oligosaccharide fraction (OS). However as it happens with proteins, the increase in total polysaccharide concentration in both enriched wines was lower than expected considering their concentration in the original sparkling wines. Specifically the recovery was  $39.3 \pm 9.3$  % for + CI wine and  $78.7 \pm 4.9$  % for + SI wine. The higher recovery observed in the isolation process of the macromolecular fraction of + SI wine is difficult to be explained but it might be related with differences in the composition of the polysaccharides released by *T. delbrueckii* during the first fermentation.

This is only an hypothesis but a different composition of the polysaccharides released by *T. delbrueckii* in the sparkling wine obtained from sequential inoculation would justify why it was felt to be less aggressive in the sensory tasting since it has been reported that polysaccharides, oligosaccharides and mannoproteins contribute to the sensation of sweetness [36, 23]. In any case, this different recovery is probably the reason because the PS, OS and total polysaccharide concentrations tended to be higher in the + SI wine than in the + CI wine, though the concentration was only statistically significant in the case of oligosaccharides.

It can therefore be concluded that sequential inoculation with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* may be useful for obtaining sparkling wines with better foaming properties. Specifically, sequential inoculation produced base wines with significantly higher maximum heights of foam (HM) than conventional inoculation, probably because autolysis of the *T. delbrueckii* cells in the base wine released higher amounts of proteins, especially of the low molecular weight fraction. This trend of higher protein concentration and better HM was maintained in the sparkling wines from sequential inoculation though, logically, both values were reduced by the *prise de mousse*.

Figure 6. Influence of supplementation with the macromolecular fraction from the different sparkling wines on the polysaccharide fraction



All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates  $\pm$  standard deviation. PS: Polysaccharides ( $M_w > 5$  kDa); OS: Oligosaccharides ( $M_w < 5$  kDa). + : indicates supplementation with sparkling wine macromolecular fraction; CI: conventional inoculation; SI: Sequential inoculation; Different letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between base wines.

**Acknowledgments** This work has been funded by CDTI (Program CIEN) “Nuevas estrategias vitivinícolas para la sostenibilidad y el incremento de la competitividad del sector en el mercado internacional (VINySOST 2014)”. Authors also want to thank Juvé & Camps SA winery for providing the grapes and wines.

**Conflict of interest** Two of the authors work for the company which commercializes the yeasts strains used in this article.

### Compliance with Ethics Requirements

This article does not contain any studies with human or animal subjects.

### References

1. Cilindre C, Liger-Belair G, Villaume S, Jeandet P, Marchal R (2010) Foaming properties of various Champagne wines depending on several parameters: Grape variety, aging, protein and  $\text{CO}_2$  content. *Anal Chim Acta* 660: 164–170.
2. Coelho E, Reis A, Domingues, M.R.M, Rocha S.M, Coimbra M.A (2011) Synergistic Effect of High and Low Molecular Weight Molecules in the Foamability and Foam Stability of Sparkling Wines. *J Agric Food Chem* 59: 3168–3179.
3. Kemp B, Alexandre H, Robillard B, Marchal R (2015) Effect of Production Phase on Bottle-Fermented Sparkling Wine Quality. *J Agric Food Chem* 63: 19–38.

## RESULTADOS-CAPÍTULO 2

4. Junker B (2007) Foam and Its Mitigation in Fermentation Systems. *Biotechnol Prog* 23: 767-784.
5. Brissonnet F, Maujean A (1993) Characterization of foaming proteins in a Champagne base wine. *Am J Enol Vitic* 44:297-301.
6. Vanrell G, Esteruelas M, Canals JM, Zamora F (2005) Influence du type de clarification du vin de base et des adjuvants de tirage sur la qualité de la mousse des vins effervescents. *Revue des Oenologues* 114:28-30.
7. Esteruelas M, González-Royo E, Kontoudakis N, Orte A, Cantos A, Canals JM, Zamora F (2015) Influence of grape maturity on the foaming properties of base wines and sparkling wines (Cava). *J Sci Food Agric* 95: 2071-2080.
8. Marchal R, Chaboche D, Douillard R, Jeandet P (2002) Influence of Lysozyme Treatments on Champagne Base Wine Foaming Properties. *J Agric Food Chem* 50: 1420-1428.
9. Pocock K.F, Salazar F.N, Waters E.J (2011) The effect of bentonite fining at different stages of white winemaking on protein stability. *Aust J Grape Wine Res*: 17, 280-284.
10. Lira E, Rodríguez-Bencomo J.J, Salazar F.N, Orriols I, Fornos D, Lopez F (2015) Impact of Bentonite Additions during Vinification on Protein Stability and Volatile Compounds of Albarino Wines. *J Agric Food Chem* 63: 3004-3011.
11. Vanrell G, Canals R, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, Zamora F (2007) Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chem* 104:148-155.
12. Perez-Magarino S, Martínez-Lapuente L, Bueno-Herrera M, Ortega-Heras M, Guadalupe Z, Ayestaran B (2015) Use of Commercial Dry Yeast Products Rich in Mannoproteins for White and Rose Sparkling Wine Elaboration. *J Agric Food Chem* 63: 5670-5681.
13. Martínez-Rodríguez A, Carrascosa A.V, Barcenilla J.M, Pozo-Bayón M.A, Polo M.C (2001) Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. *Food Microbiol* 18:183-191.
14. Jolly N.P, Varela C, Pretorius I.S (2014) Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res* 14:215-237.
15. Benito S, Hofmann T, Laier M, Lochbühler B, Schüttler A, Ebert K, Fritsch S, Röcker J, Rauhut D (2015) Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur Food Res Technol* 241:707-717.
16. Ciani M, Comitini F (2011) Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann Microbiol* 61:25-32.
17. Zara G, Mannazzu I, Del Caro A, Budroni M, Pinna M.B, Murru M, Farris G.A, Zara S (2014) Wine quality improvement through the combined utilisation of yeast hulls and *Candida zemplinina/Saccharomyces cerevisiae* mixed starter cultures. *Aust J Grape Wine R* 20:199-207.
18. Loira I, Vejarano R, Bañuelos M. A, Morata A, Tesfaye W, Uthurry C, Villa A, Cintora I, Suárez-Lepe, J.A (2014) Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Sci Technol* 59: 915-922.
19. Nuñez-Guerrero M.A, Paez-Lerma J.B, Rutiaga-Quiñones O.M, González-Herrera S.M, Soto-Cruz N.O (2016) Performance of mixtures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts during alcoholic fermentation of *Agave duranguensis* juice. *Food Microbiology* 54:91-97.
20. Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdieu D (2008) Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol* 122:312-320.
21. Azzolini M, Fedrizzi B, Tosi E, Finato F, Vagnoli P, Scrinzi Ch, Zapparoli G (2012) Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *Eur Food Res Technol* 235:303-313.
22. Giovani G, Rosi I, Bertuccioli M (2012) Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-*Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation. *Int J Food Microbiol* 160:113-118.

23. Domizio P, Liu Y, Bisson LF, Barile D (2014) Use of non-*Saccharomyces* wine yeast as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiol* 43:5–15.
24. González-Royo E, Pascual O, Kontoudakis N, Esteruelas M, Esteve-Zaroso B, Mas A, Canals JM, Zamora F (2015) Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur Food Res Technol* 240:999–1012.
25. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2014) Methods of analysis of wines and must. <http://www.oiv.int/oiv/info/enmethodesinternationalesvin>
26. Maujean A, Poinaut P, Dantan H, Brissonet F, Cossiez E (1990) Étude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents II. Mise au point d'une technique de mesure de la moussabilité, de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bulletin de l'OIV* 711–712:405–426.
27. Canals JM, Arola L, Zamora F (1998) Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *Am J Enol Vitic* 49:383–388.
28. Ayestarán B, Guadalupe Z, León D (2004) Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo V.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal Chim Acta* 513:29–39.
29. Jackson RS (2002) Quantitative (technical) wine assessment. In: Taylor SL (ed) *Wine tasting. A professional handbook*, 1st ed. Academic Press, Hong Kong.
30. Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE (1996) Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, New York.
31. Pueyo E, Martín-Alvarez PJ, Polo MC (1995) Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cavas (sparkling wines). *Am J Enol Vitic* 46:518–524.
32. Girbau-Sola T, Lopez-Tamames E, Bujan J, Buxaderas S (2002). Foam Aptitude of Trepát and Monastrell Red Varieties in Cava Elaboration. 1. Base Wine Characteristics. *J Agric Food Chem* 50: 5596-5599.
33. Jose Garcia M, Alexandre J.L, Álvarez I, Lizama V (2009). Foam aptitude of Bobal variety in white sparkling wine elaboration and study of volatile compounds. *Eur Food Res Technol* 229:133–139.
34. Moreno-Arribas V, Pueyo E, Nieto F.J, Martín-Alvarez P.J, Polo M.C (2000). Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chem* 70:309-317.
35. Martínez-Lapuente L, Guadalupe Z, Ayestarán B, Ortega-Heras M, Perez-Magarino S (2013). Changes in polysaccharide composition during sparkling wine making and aging. *J Agric Food Chem* 61: 12362–12373.
36. Guadalupe Z, Palacios A, Ayestarán B (2007). Maceration enzymes and mannoproteins: a possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *J Agric Food Chem* 55: 4854-4862.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

### **Capítulo 3. Influencia de la suplementación con levaduras secas inactivadas durante el tiraje sobre la composición, las propiedades espumantes y la calidad sensorial de los vinos espumosos (Cava)**

Actualmente, el empleo de derivados de levaduras secas inactivadas (LSI) en vinificación está muy extendido, debido a que permiten enriquecer mostos y vinos en compuestos que mejoran la fermentación y/o sus propiedades organolépticas. Estos productos ceden nutrientes y otros compuestos (polisacáridos, manoproteínas, etc.) al medio de forma similar a lo que ocurre cuando un vino es sometido a crianza sobre lías, gracias al proceso de autólisis.

La toma de espuma y posterior crianza ejercen una gran influencia sobre las características de la espuma de los Cavas. El objetivo de este capítulo fue determinar si la suplementación durante el tiraje con LSI, obtenidas a partir de *Saccharomyces cerevisiae* o *Torulaspora delbrueckii*, permitía mejorar las propiedades espumantes del Cava. Los resultados obtenidos indican que la suplementación con LSI de ambos tipos de levadura permite mejorar tanto la espumabilidad (HM) como la estabilidad de la espuma (HS). A su vez, los Cavas suplementados con LSI fueron distinguidos claramente en test triangular respecto del Cava control, y específicamente, el Cava suplementado con LSI de *T. delbrueckii* fue el preferido por la mayoría de catadores.

Los vinos obtenidos fueron analizados en el laboratorio de Tecnología Enológica (TECNENOL) de la Universitat Rovira i Virgili. Los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista *La Semana Vitivinícola*.

Medina-Trujillo, L., González-Royo, E., Sieczkowski, N., Heras, J., Canals, J.M., & Zamora, F. (2017). **“Influencia de la suplementación con levaduras secas inactivadas durante el tiraje sobre la composición, las propiedades espumantes y la calidad sensorial de los vinos espumosos (Cava)”**. *La Semana Vitivinícola*, 3.494, 13-05-2017.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

---

## **Influencia de la suplementación con levaduras secas inactivadas durante el tiraje sobre la composición, las propiedades espumantes y la calidad sensorial de los vinos espumosos (Cava)**

Laura Medina-Trujillo<sup>a</sup>, Elena González-Royo<sup>a</sup>, Nathalie Sieczkowski<sup>b</sup>, José M. Heras<sup>b</sup>,  
Joan Miquel Canals<sup>a</sup> y Fernando Zamora<sup>a</sup>,

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, Universidad Rovira i Virgili, C/Marcel·lí Domingo, 1. 43007 Tarragona, España

<sup>b</sup> Lallemand Bio S.L. C/ Galileu 303. 1<sup>a</sup> planta. 08028-Barcelona. España

### **Introducción**

Existen diversas bebidas efervescentes entre las cuales se incluyen las bebidas gasificadas, la cerveza y evidentemente los vinos espumosos. Su efervescencia y su espuma son muy distintas. Así, las bebidas gasificadas presentan generalmente una efervescencia muy tumultuosa, con burbujas groseras y una persistencia de la espuma relativamente corta. En el lado opuesto encontramos la cerveza, con una efervescencia débil, burbujas muy finas y una espuma extremadamente persistente. Pues bien, los vinos efervescentes presentan propiedades intermedias, lo cual es muy importante para garantizar sus características organolépticas.

Debemos tener en cuenta que la efervescencia y la espuma no son únicamente

atributos visuales ligados a la belleza del vino, sino que influyen de manera significativa en las sensaciones que se perciben en el paladar (Vanrell et al., 2002). Una bebida gasificada con una efervescencia tumultuosa y de burbujas grandes dará lugar a una sensación de agresividad en la boca. De la misma manera, perderá rápidamente su efervescencia, dado el rápido desprendimiento de gas observado en este tipo de producto. Por el contrario, un vino efervescente de calidad, presentará en boca un agradable cosquilleo acompañado por la sensación de cremosidad que genera su espuma. Por estas razones, la efervescencia deberá ser suficientemente persistente para mantener estas sensaciones, el tiempo necesario para que el consumidor disfrute de su degustación.

### RESULTADOS-CAPÍTULO 3

---

Resulta por tanto evidente que la calidad de un vino espumoso está fuertemente condicionada por sus características espumantes (Maujean, 1989; Ligier-Belair, 2001; Zamora, 2003). Por esta razón, los elaboradores de vinos espumosos están especialmente interesados en entender de qué dependen las propiedades espumantes de sus vinos y en cómo pueden incidir para mejorarlas. De hecho, la bibliografía al respecto es abundante, pero los conocimientos actuales no han permitido todavía resolver completamente el problema. Así sabemos que algunos componentes del vino como el etanol (Girbau-Sola et al., 2002; Esteruelas et al., 2015) y los lípidos (Dussaud et al., 1994; Gallart et al., 2002) ejercen un efecto negativo sobre sus características espumantes, mientras que las proteínas (Cilindre et al., 2010; Esteruelas et al., 2015) y las manoproteínas (Moreno-Arribas et al., 2000, Martínez-Lapuente et al., 2013) favorecen la estabilidad de la espuma. En concreto, proteínas y manoproteínas, al ser sustancias anfipáticas, estabilizarían el film de las burbujas gracias a que orientarían su parte hidrófila hacia el exterior del líquido y su parte hidrófoba hacia el gas interior (Bamforth, 1985; Schramm, 2005).

Por todos es sabido que los vinos espumosos elaborados mediante el método tradicional

desarrollan la segunda fermentación o toma de espuma dentro de la botella y que se mantienen en crianza en rima, en contacto con las lías, un tiempo mínimo que depende de la reglamentación de su denominación de origen. La razón es bien simple, el contacto de las lías con el vino espumoso conlleva un enriquecimiento de sustancias liberadas por las levaduras gracias al proceso de autólisis. Entre las sustancias que se liberan destacan las proteínas, las manoproteínas y los polisacáridos, que como se ha comentado parecen ejercer un efecto muy positivo sobre la estabilidad de la espuma (Cilindre et al., 2010; Esteruelas et al., 2015).

En los vinos espumosos amparados por la denominación de origen Cava, el tiempo mínimo de crianza establecido es de 9 meses si bien los Cavas de gran calidad acostumbran a mantenerse sobre lías mucho más tiempo. De hecho la DO Cava establece los términos de Reserva y Gran Reserva para los Cavas que han sido criados un mínimo de 15 o 30 meses respectivamente. Es también un hecho constatable que en la actualidad los Cavas de larga crianza están siendo muy valorados por la crítica y el mercado. La razón es bien simple, el contacto prolongado del Cava con las lías le otorga una mayor complejidad aromática y gustativa, y sobretodo logra una perfecta integración del gas carbónico

logrando una magnífica textura y cremosidad en boca.

El proceso natural de autólisis de las levaduras es el principal responsable de todos estos cambios. Sin embargo, las largas crianzas son laboriosas y muy costosas para los elaboradores y por esta razón existe un interés en técnicas que permitan obtener una mejor espuma en menor tiempo. Dentro de las diferentes posibilidades existentes destaca la utilización de levaduras secas inactivadas como fuente suplementaria de proteínas, manoproteínas y polisacáridos (Vanrell et al., 2002; Martínez-Lapuente et al., 2013). De hecho en el mercado existen numerosos productos a base de levaduras que se comercializan para tal objetivo. Sin embargo, no existen apenas estudios científicos sobre este tema que avalen su verdadera utilidad. Por esta razón el objetivo de este estudio fue el de determinar si la suplementación con levaduras secas inactivadas durante el tiraje permite verdaderamente mejorar las propiedades espumantes del Cava.

### **Materiales y métodos**

**Elaboración del vino base:** El vino base fue elaborado en la bodega experimental de la Facultad de Enología de la Universidad Rovira i Virgili en Constantí (Tarragona) con uvas de la variedad Macabeo procedentes de los viñedos de Juvé & Camps SL en Espiells (DO

Cava; 41°27' 1.8972" (N) y 1°49' 6.6216" (E)] durante la vendimia 2013. Las uvas fueron vendimiadas a mano, estrujadas y prensadas con un rendimiento de 0.6 l/kg. El mosto fue sulfitado inmediatamente con 30 mg/l (3 g/hl) y filtrado por un filtro rotativo de vacío. La primera fermentación se realizó a temperatura controlada ( $18 \pm 1$  °C) en un tanque de 100 litros mediante la inoculación de 250 mg/l (25 g/hl) de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin QA23®, Lallemand Inc., Montreal, Canada). Una vez finalizada la fermentación alcohólica, el vino base fue sulfitado con 20 mg/l (2 g/hl) y trasegado a un tanque hermético donde se mantuvo a 4 °C.

**Elaboración del Cava:** La producción del vino espumoso (Cava) fue realizada mediante el método tradicional con el vino base seis meses después del final de la primera fermentación. Para ello, el vino base fue adicionado con 22 g/L de sacarosa, 30 mg/L de bentonita (3 g/hl) como coadyuvante para favorecer el removido (Adjuvant 83; Station Oenotechnique du Champagne, Epernay, France) y 2 millones de células/ml de levaduras previamente adaptadas al medio (Lalvin EC1118®, Lallemand Inc., Montreal, Canada). Se prepararon un total de 36 botellas. A 12 de ellas se les adicionó 30 mg/L (3 g/hl) de levaduras secas inactivadas (LSI) de *Saccharomyces cerevisiae*

### RESULTADOS-CAPÍTULO 3

---

(Optimumwhite™, Lallemand Inc., Montreal, Canada). A otras 12 botellas se les adicionó 30 mg/L (3 g/hl) de una LSI experimental de *Torulaspora delbrueckii* TD291 (Lallemand Inc., Montreal, Canada). A las 12 botellas restantes se les adicionó el volumen de agua equivalente al utilizado en la adición de las LSI y fue considerado como control de referencia. Las botellas fueron cerradas con chapa y obturador, tras lo cual se mantuvieron en posición horizontal a la temperatura de la cava de crianza ( $14 \pm 2$  °C). Tras 9 meses, las botellas fueron trasladadas a un pupitre donde se procedió a su removido y degüelle.

**Preparación de las muestras para los análisis:** Las muestras tanto de vino base como de Cava fueron centrifugadas a 12.000xg a 4 °C durante 15 minutos (Sorvall RC-5C, Heraeus, Hanau, Germany) para garantizar su limpidez y eliminar el gas carbónico disuelto.

**Parámetros estándar:** El grado alcohólico adquirido (% v/v) se determinó mediante ebullometría (GAB systematic analytical, Barcelona, España). La acidez total y la acidez volátil de determinaron mediante los métodos recomendados por la OIV [25]. El pH se midió con un pH meter Basic-20 (CRISON, Barcelona, España). El Glicerol y los azúcares fermentables (D-glucosa y D-fructosa) fueron determinados mediante el uso de kits

enzimáticos (R-Biopharm AG., Darmstadt, Germany).

**Determinación de las propiedades espumantes:** Las muestras de vino base o Cava se atemperaban a 18 °C durante 24 horas antes del análisis. Las propiedades espumantes se determinaron mediante el uso de equipo Mosalux (Station Oenotechnique de Champagne, Epernay, France). Brevemente, 100 ml de la muestra (vino base o cava) se introducía en una probeta provista de una cerámica porosa donde se inyectaba CO<sub>2</sub> a un flujo constante de 115 ml/min y a una presión constante de 2 bares. Se determinaron dos parámetros: la altura máxima (Hm) y la altura estable (Hs) de la espuma (Maujean et al. 1990). Hm representa la espumabilidad o capacidad del vino para producir espuma, mientras que Hs representa la estabilidad de la espuma. Ambos parámetros se expresan en mm. Todos los análisis se hicieron por triplicado.

**Análisis de proteínas mediante HRSEC-DAD.** El análisis de proteínas se realizó por exclusión molecular mediante cromatografía líquida de alta resolución (HRSEC) mediante la metodología previamente descrita por Canals et al. (1998). Las proteínas fueron cuantificadas con un matriz de diodos (diode array; DAD) como detector (230 nm) usando albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich,

Madrid, España) como patrón externo. Esta técnica permite determinar la concentración de proteínas y su distribución molecular.

**Análisis de Polisacáridos mediante HRSEC-RID.** El análisis de los polisacáridos se realizó por exclusión molecular mediante cromatografía líquida de alta resolución (HRSEC) con un detector de índice de refracción (RID) usando la metodología previamente descrita por Ayestarán et al. (2004). Al igual que ocurría con las proteínas, esta técnica permite determinar la concentración de polisacáridos y oligosacáridos.

**Análisis sensorial.** Todos los análisis sensoriales se llevaron a cabo en la sala de catas de la Facultad de Enología de Tarragona (Universidad Rovira i Virgili) la cual está diseñada de acuerdo con la norma UNE 87004.197. La cata se realizó con copas de degustación oficiales (ISO 3591.1977). Los vinos espumosos fueron catados por 12 expertos enólogos mediante test triangular de acuerdo con la norma UNE ISO 4120.1983. Se realizaron dos test triangulares en los que las muestras eran servidas en un orden al azar a los diferentes degustadores. El primer test triangular era para comparar el Cava control con el Cava suplementado con LSI de *S. cerevisiae* y el segundo para compararlo

con el Cava suplementado con LSI de *T. delbrueckii*. El principal objetivo era saber si los catadores eran o no capaces de distinguir cual era el Cava diferente. El segundo objetivo era determinar entre los catadores que habían acertado cual era la muestra que preferían.

**Estadística.** Todos los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas. Para la comparación entre valores se utilizó en análisis ANOVA de un factor y el test de Turkey usando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 19 software (International Business Machines S.A., Madrid, España). El nivel de significatividad de los test triangulares se determinó mediante el método de Jackson (2002).

### Resultados y discusión

La Tabla 1 muestra los parámetros convencionales del vino base y de los cavas obtenidos. Los niveles de glucosa + fructosa del vino base y de los diferentes Cavas fue en todos los casos inferior a 0,5 g/l lo que indicaría que la primera y en su caso la segunda fermentación fueron completadas con éxito. Como era de esperar, el grado alcohólico de los vinos espumosos fue alrededor de 1,3 % mayor que en el vino base. Este incremento correspondería a la transformación de los 22 g de azúcar/l que se

## RESULTADOS-CAPÍTULO 3

adicionaron con el licor de tiraje al vino base con una conversión de 16.9 g de azúcar/l por grado alcohólico adquirido. Asimismo, la concentración de glicerol, la acidez volátil y el pH aumentaron significativamente en los cavas mientras que la acidez total disminuyó

de forma ligera pero significativa. Estos cambios entre los cavas y el vino base pueden considerarse como lógicos y coincidentes con los descritos en la bibliografía (Pueyo et al., 1995; Esteruelas et al., 2015).

Tabla 1. Influencia de la suplementación con levaduras secas inactivas durante la segunda fermentación en los parámetros generales de los vinos espumosos

Parámetro	Vino Base	Vino Espumoso		
		Control	+ LSI Sc	+ LSI Td
<b>Glucosa + Fructosa (g/l)</b>	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
<b>Etanol (%)</b>	10,7 ± 0,11 <b>A</b>	12,0 ± 0,1 <b>B</b>	11,9 ± 0,33 <b>B</b>	12,0 ± 0,20 <b>B</b>
<b>AT (g/l)</b>	5,68 ± 0,01 <b>B</b>	5,25 ± 0,06 <b>A</b>	5,30 ± 0,04 <b>A</b>	5,20 ± 0,04 <b>A</b>
<b>pH</b>	2,81 ± 0,01 <b>A</b>	3,03 ± 0,01 <b>B</b>	3,02 ± 0,01 <b>B</b>	3,02 ± 0,01 <b>B</b>
<b>AV (g/L)</b>	0,18 ± 0,01 <b>A</b>	0,22 ± 0,02 <b>B</b>	0,22 ± 0,01 <b>B</b>	0,23 ± 0,02 <b>B</b>
<b>Glicerol (g/L)</b>	4,70 ± 0,30 <b>A</b>	5,80 ± 0,36 <b>B</b>	6,65 ± 0,22 <b>C</b>	6,84 ± 0,54 <b>C</b>

Todos los datos están expresados como la media aritmética de tres réplicas ± desviación estándar. + LSI-Sc: suplementado con levaduras secas inactivas de *Saccharomyces cerevisiae*; + LSI-Td: suplementado con levaduras secas inactivas de *Torulasporea delbrueckii*; AT: acidez total expresada como g de ácido tartárico/L; AV: acidez volátil expresada como g de ácido acético/L. Letras diferentes indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

No se detectaron diferencias significativas en los niveles de etanol, acidez total, acidez volátil ni pH entre los Cavas suplementados con LSI y el Cava control. Sin embargo, sí que se observó que los niveles de glicerol eran significativamente superiores en los Cavas suplementados con LSI, tanto de *S. cerevisiae* como de *T. delbrueckii*, que en el Cava control.

La Figura 1 muestra los resultados correspondientes a los parámetros de la

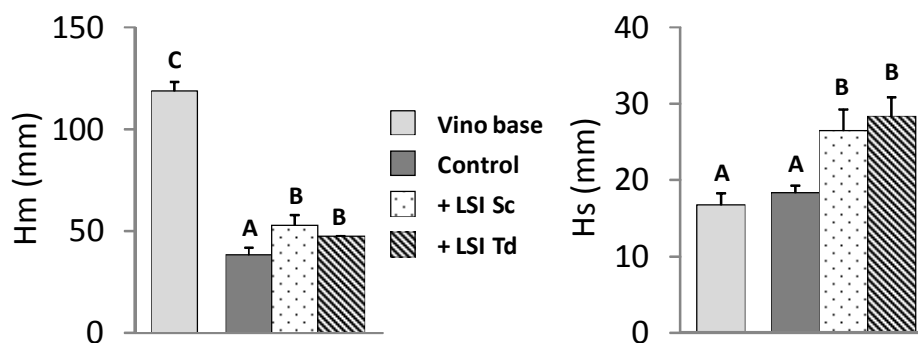
espuma del vino base y de los diferentes Cavas. Cómo era de esperar, la altura máxima de la espuma (Hm) de todos los Cavas era significativamente menor que la de su vino base. Esta drástica disminución de Hm, ya descrita en estudios previos (Pueyo et al., 1995; Esteruelas et al., 2015), ha sido atribuida al aumento del etanol producido durante la segunda fermentación y a la absorción de proteínas por la bentonita utilizada con coadyuvante de removido

(Vanrell et al., 2007). En cambio, la altura estable de la espuma (Hs) fue similar o superior en los Cavas que en el vino espumoso.

La suplementación con LSI, tanto de *S. cerevisiae* como de *T. delbrueckii*, originó Cavas con mejores propiedades espumantes que el Cava control. Así, tanto Hm como Hs fueron significativamente superiores en los vinos espumosos suplementados con ambas LSI que en su correspondiente control. Hay que señalar que el incremento tanto de Hm como de Hs fue similar en los cavas suplementados con LSI de *S. cerevisiae* y los suplementados con LSI de *T. delbrueckii*. Estos datos coinciden con los previamente observados por otros autores (Vanrell et al., 2005; Nuñez et al., 2006; Martí-Raga et al.,

2016) utilizando diversos derivados de levaduras de la especie *S. cerevisiae*. No obstante, otros autores (Pérez-Magariño et al., 2015) no obtuvieron resultados concluyentes por lo que existe una cierta discrepancia en la utilidad o no de las LSI para mejorar la espuma de los vinos espumosos. Estas discrepancias probablemente sean debidas a la gran variabilidad de derivados de levadura existentes en la actualidad (Pozo-Bayón et al., 2009) que presentan con diferentes aplicaciones y por tanto pueden ejercer efectos distintos en el vino. En ese sentido nuestros resultados son muy claros y muestran que la suplementación con las LSI específicas estudiadas en el tiraje produce una clara mejoría de las propiedades espumantes en los Cavas.

Figura 1. Influencia de la suplementación con levaduras secas inactivas durante la segunda fermentación sobre las propiedades de la espuma de los vinos espumosos



Todos los datos están expresados como la media aritmética de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar. Hm: altura máxima de la espuma; Hs: altura estable de la espuma. + LSI-Sc: suplementado con Levaduras secas inactivas de *Saccharomyces cerevisiae*; + LSI-Td: suplementado con Levaduras secas inactivas de *Torulaspora delbrueckii*. Letras diferentes indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

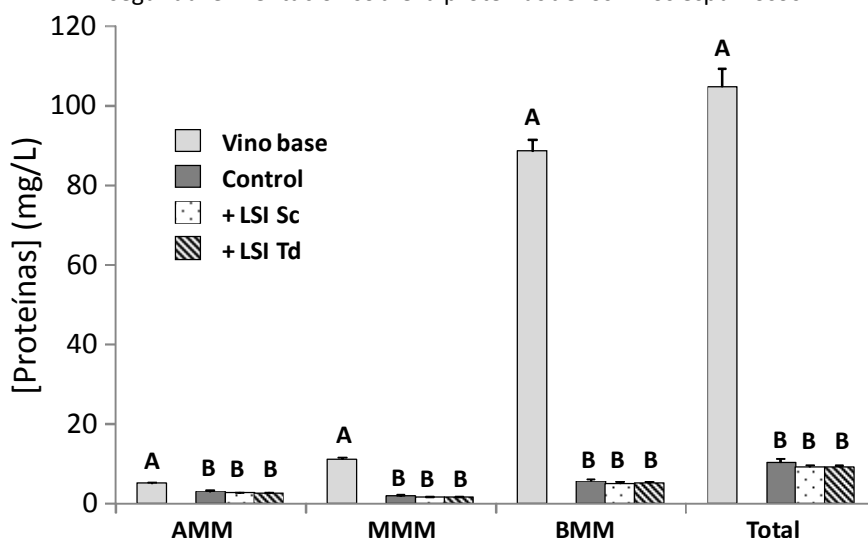


## RESULTADOS-CAPÍTULO 3

La Figura 2 muestra la concentración en proteínas del vino base y sus correspondientes Cavas. Los resultados muestran claramente que la concentración en proteínas totales disminuyó enormemente en todos los Cavas respecto del vino base. Esta disminución se observó en todas las fracciones de proteínas si bien fue

especialmente drástica en la fracción de baja masa molecular (BMM). Esta disminución de la concentración de proteínas ha sido atribuida al efecto desproteinizante de la bentonita usada como coadyuvante de removido y muy probablemente ésta sea también la causa de la disminución de Hm observada tras la toma de espuma (Vanrell et al., 2007).

Figura 2. Influencia de la suplementación con levaduras secas inactivas durante la segunda fermentación sobre la proteínas de los vinos espumosos.



Todos los datos están expresados como la media aritmética de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar. MM: Masa molecular; AMM: Fracción de alta masa molecular ( $MM > 80$  kDa); MMM: Fracción de masa molecular media ( $80 \text{ kDa} > MM > 60$  kDa); BMM: Fracción de baja masa molecular ( $MM < 60$  kDa). + LSI-Sc: suplementado con Levaduras secas inactivas de *Saccharomyces cerevisiae*; + LSI-Td: suplementado con Levaduras secas inactivas de *Torulasporea delbrueckii*. Letras diferentes indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

No se observaron diferencias significativas en la concentración de proteínas de los Cavas suplementados con ambas LSI. En este sentido hay que señalar que algunos estudios previos han mostrado que la suplementación

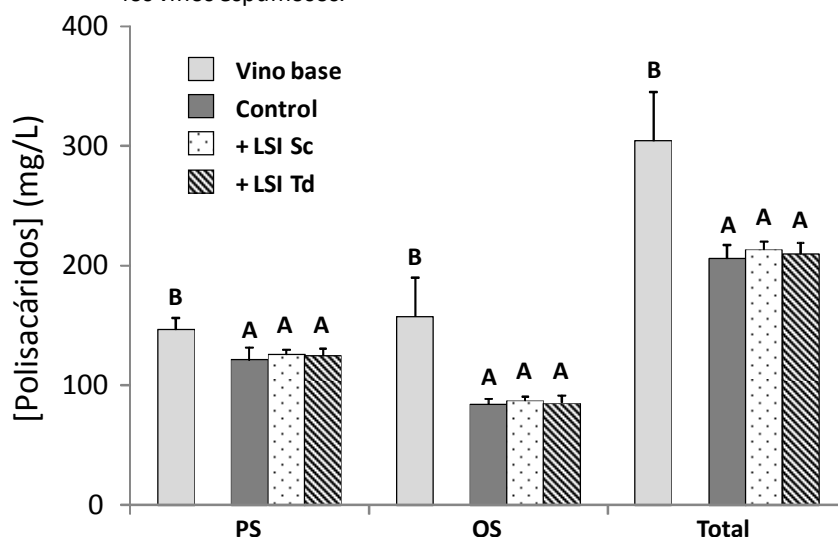
con LSI en el tiraje de los vinos espumosos condujo a un incremento de la concentración en proteínas (Vanrell et al., 2002), mientras que en otros este efecto no fue detectado (Pérez-Magariño et al., 2015). En nuestro

caso no se observaron diferencias entre el Cava control y los otros dos suplementados con las dos LSI probablemente debido a que la disminución de proteínas generada en los Cavas era tan elevada que rozaba el límite de sensibilidad del método analítico

La Figura 3 muestra la concentración en polisacáridos del vino base y los diferentes Cavas. Al igual que ocurría en el caso de las proteínas, los Cavas presentaban una concentración en polisacáridos y oligosacáridos significativamente menor que en su correspondiente vino base, si bien en

esta caso la caída no era tan drástica. Esta disminución fue similar en todos los Cavas fuesen o no suplementados con LSI. Otros autores (Moreno-Arribas et al., 2010; Martínez-Lapuente et al., 2013) observaron también un disminución en los polisacáridos tras la toma de espuma que podrían estar relacionados con una cierta precipitación causada por el incremento de alcohol originado en la segunda fermentación y/o a una absorción por parte de los coadyuvantes de removido.

Figura 3. Influencia de la suplementación con levaduras secas inactivas durante la segunda fermentación sobre los polisacáridos y oligosacáridos de los vinos espumosos.



Todos los datos están expresados como la media aritmética de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar. MM: masa molecular; PS: Polisacáridos (MM > 5 kDa); OS: Oligosacáridos (MM < 5 kDa). + LSI-Sc: suplementado con Levaduras secas inactivas de *Saccharomyces cerevisiae*; + LSI-Td: suplementado con Levaduras secas inactivas de *Torulaspota delbrueckii*. Letras diferentes indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS-CAPÍTULO 3

No se observaron tampoco diferencias en la composición en polisacáridos de los Cavas suplementados con LSI respecto del Cava control. En ese sentido otros estudios han mostrado un comportamiento errático en la concentración en polisacáridos de vinos tranquilos y espumosos suplementados con LSI (Martínez-Lapuente et al., 2013; Martí-Raga et al., 2016), si bien otros estudios han mostrado claramente que la suplementación con LSI enriquece los vinos en polisacáridos (González-Royo et al., 2013). Como ya se comentó anteriormente, estas diferencias pueden ser debidas a la gran diversidad de LSI presentes en el mercado (Pozo-Bayon et al., 2009).

Finalmente, la Tabla 2 muestra los resultados de la degustación de los diferentes vinos espumosos. Nueve de los 12 catadores fueron capaces distinguir entre el Cava suplementado con LSI de *S. cerevisiae* y el Cava control. Este resultado es significativo ( $p < 0,01$ ) y demuestra por tanto que los dos

Cavas eran diferentes bajo el punto de vista sensorial. De entre los catadores que fueron capaces de diferenciar cual era la muestra distinta 5 prefirieron el Cava control y 4 el Cava suplementado con LSI de *S. cerevisiae*, por lo que se puede hablar de un empate técnico en cuanto a sus preferencias ya que los degustadores no se decantaban por una de las muestra de forma clara.

Los resultados fueron mucho más claros al comparar el Cava control con el suplementado con LSI de *T. delbrueckii*. Concretamente 11 de los 12 catadores fueron capaces de distinguir entre ambos Cavas lo que permite afirmar que las muestras eran distinguidas de forma muy significativa ( $p < 0.001$ ). Además 8 de los 11 catadores que eran capaces de distinguir entre las muestras prefirieron el Cava suplementado con LSI de *T. delbrueckii* lo que indica claramente que este Cava era mejor valorado desde el punto de vista sensorial.

Tabla 2. Resultados del análisis sensorial comparativo (test triangular) entre los vinos espumosos suplementados con levadurassecas inactivas y el control.

Test Triangular	Identificaciones positivas	$p$	Preferencias		
			Control	+ LSI Sc	+ LSI Td
Control vs + LSI Sc	9/12	0.01	5	4	-
Control vs + LSI Td	11/12	<0,001	3	-	8

## Conclusiones.

La suplementación con LSI en el momento del tiraje permite obtener Cavas a los nueve meses de crianza con mejores características espumantes. Tanto las LSI de *S. cerevisiae* como las de *T. delbrueckii* mostraron prestaciones similares en cuanto a la mejoría de los parámetros espumantes. Un panel de cata entrenado fue capaz de distinguir de forma significativa los cavas suplementados con LSI respecto del Cava control y prefería de forma clara el Cava suplementado con LSI de *T. delbrueckii*. Se puede concluir por tanto que la suplementación con LSI en el momento del tiraje es una interesante herramienta para mejorar la espuma de los vinos espumosos y potencialmente la calidad sensorial.

## Agradecimientos.

Este estudio ha sido financiado por CDTI (Programa CIEN) mediante el proyecto "Nuevas estrategias vitivinícolas para la sostenibilidad y el incremento de la competitividad del sector en el mercado internacional (VINySOST 2014)". Los autores también desean agradecer a Juvé & Camps SA por proporcionar las uvas.

## Bibliografía

Ayestarán, B., Guadalupe, Z. & León, D. 2004. Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo V.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal Chim Acta*, **513**, 29–39.

Bamforth, C.W. 1985. The foaming properties of beer. *J. Inst. Brewing.*, **91**, 370–383.

Brissonnet, F. & Maujean, A. 1993. Characterization of foaming proteins in a Champagne base wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 297–301.

Canals, J.M., Arola, L. & Zamora, F. 1998. Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *Am. J. Enol. Vitic.*, **49**, 383–388.

Cilindre, C., Liger-Belair, G., Villaume, S., Jeandet, P. & Marchal, R. 2010. Foaming properties of various Champagne wines depending on several parameters: grape variety, aging, protein and CO<sub>2</sub> content. *Anal. Chim. Acta*, **660**, 164–170.

Dussaud, A., Robillard, B., Carles, B., Duteurtre, B. & Vignes-Adler, M. 1994. Exogenous lipids and ethanol influences on the foam behaviour of sparkling base wines. *J. Food Sci.*, **59**, 148–151.

Esteruelas, M., González-Royo, E., Kontoudakis, N., Orte, A., Cantos, A., Canals, J.M. & Zamora, F. 2015. Influence of grape maturity on the foaming properties of base wines and sparkling wines (Cava). *J. Sci. Food Agric.*, **95**, 2071–2080.

Gallart, M., López-Tamames, E., Suberbiola, G. & Buxaderas, S. 2002. Influence of Fatty Acids on Wine Foaming. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7042–7045.

Girbau-Sola, T., López-Tamames, E., Bujan, J. & Buxaderas, S. 2002. Foam Aptitude of Trepát and Monastrell Red Varieties in Cava Elaboration. 1. Base Wine Characteristics. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5596–5599.

González, E., Urtasun, A., Gil, M., Kontoudakis, K., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M. & Zamora, F. 2013. Effect of yeast strain and supplementation with inactive yeast during alcoholic fermentation on wine polysaccharides. *Am. J. Enol. Vitic.*, **64**, 268–273.

Jackson, R.S. 2002. Quantitative (technical) wine assessment. In: Taylor SL (ed) Wine tasting. A professional handbook, 1st ed. Academic Press, Hong Kong.

Liger-Belair, G. 2001. Histoire illustré d'une bulle de Champagne. *Bull. de la S.F.P.*, **127**, 9–11.

Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Ortega-Heras, M. & Pérez-Magariño, S. 2013. Changes in polysaccharide composition during the sparkling winemaking and aging. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 12362–12373.

## RESULTADOS-CAPÍTULO 3

- Marti-Raga, M., Martín, V., Gil, M., Sancho, M., Zamora, F., Mas, A. & Beltran, G. 2016. Contribution of yeast and base wine supplementation on sparkling wine composition. *J. Sci. Food Agric.*, **96**, 4962-4972.
- Maujean, A., Poinssaut, P., Dantan, H., Brissonet, F. & Cossiez, E. 1990. Étude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents II. Mise au point d'une technique de mesure de la moussabilité, de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bulletin de l'OIV* **711-712**, 405-426.
- Maujean, A. 1989. Histoire de bulles. *Rev. Fran. Œnol.*, **120**, 11-17.
- Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Nieto, F.J., Martín-Alvarez, P.J. & Polo, M.C. 2000. Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chem.*, **70**, 309-317.
- Núñez, Y.P., Carrascosa, A.V., González, R., Polo, M.C. & Martínez-Rodríguez, A. 2006. Isolation and Characterization of a Thermally Extracted Yeast Cell Wall Fraction Potentially Useful for Improving the Foaming Properties of Sparkling Wines. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 7898-7903.
- Pérez-Magariño, S., Martínez-Lapuente, L., Bueno-Herrera, M. & Ayestarán, B. 2015. Use of Commercial Dry Yeast Products Rich in Mannoproteins for White and Rosé Sparkling Wine Elaboration. *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 5670-5681.
- Pozo-Bayón, M. Á., Andujar-Ortiz, I., Alcaide-Hidalgo, J. M., Martín-Álvarez, P. J. & Moreno-Arribas, M. V. 2009. Characterization of commercial inactive dry yeast preparations for enological use based on their ability to release soluble compounds and their behavior toward aroma compounds in model wines. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 10784-10792.
- Pueyo, E., Martín-Alvarez, P.J. & Polo, M.C. 1995. Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cavas (sparkling wines). *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 518-524.
- Schramm, L.L. 2005. Emulsions, Foams and Suspensions: Fundamentals and Applications. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Vanrell, G., Cabanillas, P., Albet, S., Canals, J.M., Arola, L. & Zamora, F. 2002. Étude des composés influençant la mousse des cavas. *Rev. Fr. Œnol.*, **196**, 30-36.
- Vanrell, G., Esteruelas, M., Canals, J.M., Zamora, F., Poinssaut, P., Sieczkowski, N. & Leboeuf, D. 2005. Influence du type de clarification du vin de base et des adjuvants de tirage sur la qualité de la mousse des vins effervescents. *Rev. Œnol.*, **114**, 28-30.
- Vanrell, G., Canals, R., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M. & Zamora, F. 2007. Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chem.*, **104**, 148-155.
- Zamora F. 2003. La espuma del Cava; un delicado equilibrio. *Enólogos*, **23**, 28-32.

## **DISCUSIÓN GENERAL**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

## DISCUSIÓN GENERAL

Las propiedades espumantes son determinantes de la calidad de los vinos espumosos. Por esta razón, tanto investigadores como elaboradores de Cava consideran necesario profundizar en su estudio con el fin de mejorar esta importante característica de los vinos espumosos. En la presente memoria de Tesis se planteó como objetivo el estudio de la composición de la espuma y la evaluación del efecto que nuevas técnicas enológicas presentan en la elaboración de los vinos espumosos, con el objetivo de mejorar sus propiedades espumantes.

El grupo de investigación en Tecnología Enológica (TECNENOL) del departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universitat Rovira i Virgili, en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, ha trabajado en esta temática durante las dos últimas décadas. Así, se han desarrollado cuatro Tesis Doctorales enfocadas en el estudio de la influencia que ejercen las proteínas y polisacáridos sobre las propiedades espumantes de los Cavas, así como en otros aspectos en los que estas macromoléculas participan, como por ejemplo la quiebra proteica.

En el primer capítulo de esta memoria se aborda el estudio comparativo entre la composición del vino base con las dos fracciones que se obtienen por el desbordamiento de parte de estos vinos mediante burbujeo con dióxido de carbono: vino de espuma y vino remanente. Dado que el vino de espuma se obtiene mediante el desbordamiento de la espuma y el colapso total de las burbujas, era de esperar que este se enriqueciera en algunos de los componentes del vino, especialmente en aquellos que conforman el film de las burbujas. Del mismo modo, era también de esperar que el vino remanente (no



## DISCUSIÓN GENERAL

---

desbordado) se empobreciera en dichas moléculas. El objetivo, por tanto, era determinar esos cambios y ver cómo afectaban a los parámetros de la espuma, para comprender mejor la relación existente entre la composición y las propiedades espumantes. Este enfoque ya había sido planteado con anterioridad por otros autores (*Brissonet y Maujean, 1991; Gallart y col., 2002*). Sin embargo, en algunos casos las determinaciones analíticas realizadas o no fueron completas (no determinando ni proteínas ni polisacáridos), o algunos procedimientos analíticos no eran los más adecuados. Por este motivo, nos planteamos repetir la experiencia con dos vinos base, uno blanco y otro rosado, utilizando las actuales técnicas de HPLC para la determinación de proteínas y polisacáridos, así como otras técnicas complementarias para determinar tanto otros componentes químicos del vino como ciertas propiedades físicas como la densidad, la viscosidad y la tensión superficial.

Los resultados obtenidos mostraron con claridad que los vinos de espuma presentaban una altura máxima de la espuma (HM), determinada mediante el método Mosalux, significativamente mayor que los vinos base originales. A su vez, la HM de los vinos remanentes era significativamente menor que los vinos originales. Atendiendo a la altura estable de la espuma (HS), esta fue significativamente superior para el caso particular del vino de espuma rosado respecto del vino original y del vino remanente. En cambio, en el vino blanco tan solo se observó que el vino remanente presentaba un valor de HS significativamente inferior que el vino original y el vino de espuma. Estos resultados evidencian de forma clara que el vino de espuma presenta mejores características espumantes que el vino original, y este a su vez que el vino remanente. Por tanto, el análisis de las diferencias en su composición química

debería aportar información sobre cuáles son los principales factores que condicionan las propiedades espumantes del vino.

Así, el vino de espuma rosado presentó una concentración de proteínas significativamente superior a la del vino original y remanente. En el caso del vino blanco las diferencias solo fueron significativas entre el vino de espuma y el vino remanente. Estos datos sugieren que el vino de espuma tiende a enriquecerse en proteínas y el vino remanente a empobrecerse en ellas, a pesar de que las diferencias no siempre sean significativas. Este efecto de enriquecimiento podría deberse a que las proteínas forman parte de la estructura del film de las burbujas, y al colapsar estas se generaría una mayor concentración en el vino de espuma.

En cuanto a la composición química de sustancias volátiles, los vinos de espuma exhibieron un empobrecimiento en etanol, ésteres y ácidos grasos, posiblemente debido a la evaporación causada por el burbujeo con dióxido de carbono. En lo que se refiere a los parámetros físicos medidos, los vinos de espuma presentaron valores que son ligera pero significativamente mayores de densidad y menores de tensión superficial y viscosidad. El aumento de la densidad en el vino de espuma así como la disminución de su viscosidad puede estar relacionado con un menor contenido en etanol. Sin embargo, un menor contenido en etanol debería comportar una mayor tensión superficial cuando en realidad ocurre lo contrario. Esto podría ser debido a que el vino de espuma se enriquece en otros componentes de carácter anfipático (tensoactivos) que disminuyen la tensión superficial.

Finalmente, el análisis de componentes principales permitió, tanto en el vino blanco como en el vino rosado, separar de forma íntegra el vino de espuma del

## DISCUSIÓN GENERAL

---

vino original y del vino remanente. Estos datos confirman también que las proteínas actúan como factores positivos para la espuma, dado que en ambos vinos se observa que el vector de las proteínas se alinea en la dirección de HM y HS. Por el contrario, los vectores de etanol, alcoholes superiores y ácidos grasos se orientan en un sentido más o menos contrario, lo que confirmaría su efecto negativo.

Una vez se ha estudiado la composición química de la espuma del vino, se planteó investigar si la aplicación de ciertas técnicas de elaboración, de gran interés en la actualidad, permiten obtener vinos espumosos con mejores características espumantes. Hoy en día, la biotecnología ofrece múltiples herramientas que posibilitan la mejora de los procesos de elaboración del vino. Así, la inoculación en el mosto de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas favorece la obtención de vinos de calidad, y más uniformes que los que se producían mediante fermentaciones espontáneas. Sin embargo, ante un mercado cada vez más competitivo, los productores de vino tienen el reto de ofrecer productos que se diferencien en el mercado. En este sentido, en los últimos años se ha comenzado a estudiar el posible empleo de levaduras No-*Saccharomyces* en fermentaciones mixtas controladas o mediante inoculaciones secuenciales.

En un trabajo previo del grupo de investigación (González-Royo y col., 2015) se comprobó que la inoculación secuenciada del mosto de la variedad Macabeo con *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*, producía vinos base con mejores propiedades espumantes (HM y HS) que las del vino base obtenido mediante inoculación convencional. La mejora de estas mejores propiedades espumantes en los vinos base obtenidos por inoculación secuenciada fue

probablemente debida a un incremento en la concentración de proteínas, especialmente en la fracción de menor masa molecular (< 60 kDa).

Por esta razón, en el segundo capítulo de esta memoria nos planteamos verificar si los Cavas procedentes de los vinos base de inoculación secuenciada con *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* mantenían, después de la toma de espuma y crianza sobre lías, mejores características espumantes que los Cavas procedentes del vino base convencional.

Los resultados obtenidos demuestran que existe una disminución importante de HM entre los vinos base y los Cavas, probablemente debida al aumento en etanol que conlleva la segunda fermentación, y a que el contenido en proteínas de los Cavas es mucho menor que el de los vinos base. Este descenso en el contenido en proteínas puede relacionarse con la utilización de bentonita como coadyuvante de tiraje.

Por otra parte, el Cava obtenido mediante inoculación secuenciada con *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* presenta valores de HM significativamente superiores a los del Cava procedente de la inoculación convencional. Sin embargo, las diferencias observadas para HS en los vino base no fueron detectadas en los vinos espumosos.

Del análisis de los Cavas se obtuvo que el contenido en proteínas totales y específicamente el contenido de las de bajo peso molecular (< 60 kDa), fue significativamente mayor en el Cava procedente del vino base inoculado secuencialmente que en el originado a partir del vino base convencional.

Finalmente, el análisis sensorial comparativo mediante test triangular indicó que el panel de cata era capaz de distinguir de forma significativa ambos tipos

## DISCUSIÓN GENERAL

---

de Cavas, y que prefería además el Cava procedente de la inoculación secuenciada, al presentar una efervescencia mejor integrada y ser menos agresivo en boca.

Estos resultados demuestran el potencial de la levadura *Torulaspora delbrueckii*, utilizada en inoculaciones secuenciales, para la obtención de vinos base y vinos espumosos con mejores características espumantes.

Actualmente, en la producción de vinos a escala industrial es habitual la adición de productos que mejoran el proceso de elaboración y/o la calidad final del producto. Así, los productos derivados de levaduras secas inactivadas (LSI) aportan ciertos componentes al vino que mejoran, a su vez, tanto los procesos fermentativos (como es el caso de la adición de nutrientes), como la crianza (como es el caso de la adición de manoproteínas y polisacáridos de la pared celular), con el objetivo final de lograr vinos con mejores características organolépticas.

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación (Vanrell y col., 2005) se comprobó que la suplementación con LSI de los vinos base (Cavas y *Champagnes*) durante el tiraje producía vinos espumosos de mejores características espumantes. No obstante, aunque algunos autores han obtenido resultados similares (Martí-Raga y col., 2016), otros autores no han observado diferencias (Pérez-Magariño y col., 2015).

Por estas razones, en el tercer capítulo de esta memoria se ha evaluado el efecto sobre la espuma de la adición de derivados de LSI, obtenidos a partir de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* o *Torulaspora delbrueckii*, en la segunda fermentación de los vinos espumosos. Los resultados obtenidos han mostrado que ambas preparaciones LSI mejoraban significativamente las características

espumantes de los vinos (HM y HS) con respecto al control. Sin embargo, no se observaron diferencias ni en el contenido en proteínas ni en el contenido en polisacáridos. Tampoco se observaron diferencias debidas al tipo de levadura utilizada para la obtención de estas LSI.

Las mejores características espumantes de los Cavas suplementados con LSI fueron confirmadas mediante análisis sensorial. Específicamente, el panel de cata fue capaz de distinguir de forma significativa los Cavas suplementados con LSI respecto del Cava control mediante test triangular. Sin embargo, los catadores no mostraron una preferencia clara entre el Cava suplementado con LSI de *S. cerevisiae* respecto del Cava control (4 sobre 9). Por el contrario, sí prefirieron claramente el Cava suplementado con LSI de *T. delbreuckii* (8 sobre 11), lo que indicaría que este Cava fue el mejor apreciado sensorialmente.

En síntesis, los resultados presentados en esta memoria confirman la hipótesis planteada, de que la capacidad de un vino espumoso para producir una espuma estable depende de su composición química, la cual a su vez depende de las condiciones de elaboración del vino base y de su posterior toma de espuma y crianza. Asimismo, esta hipótesis responde a los objetivos formulados, dado que se ha profundizado en el conocimiento de la relación existente entre la composición química y las propiedades espumantes, y se ha verificado la utilidad de dos nuevas técnicas de elaboración de vinos espumosos, la inoculación secuenciada de *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* en la primera fermentación, y la suplementación con LSI de ambas especies de levadura.

---

**DISCUSION GENERAL**

---

**Referencias**

Brissonet, F., & Maujean, A. (1991). Identification of some foam-active compounds in Champagne base wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(2), 97-102.

Gallart, M., López-Tamames, E., Suberbiola, G., & Buxaderas, S. (2002). Influence of fatty acids on wine foaming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 7042–7045. DOI: 10.1021/jf0204452

González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J. M., & Zamora, F. (2015). Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology*, 240(5), 999–1012. DOI: 10.1007/s00217-014-2404-8

Martí-Raga, M., Martín, V., Gil, M., Sancho, M., Zamora, F., Mas, A., & Beltran, G. (2016). Contribution of yeast and base wine supplementation to sparkling wine composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(15), 4962–4972. DOI: 10.1002/jsfa.7905

Pérez-Magariño, S., Martínez-Lapuente, L., Bueno-Herrera, M., Ortega-Heras, M., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2015). Use of Commercial Dry Yeast Products Rich in Mannoproteins for White and Rosé Sparkling Wine Elaboration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5670–5681. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01336

Vanrell, G., Esteruelas, M., Canals, J. M., Zamora, F., Poinssaut, P., Sieczkowski, N., & Lebouef, D. (2005). Influence du type de clarification du vin de base et des adjuvants de tirage sur la qualité de la mousse des vins effervescents. *Revue des Oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques*, 114(32), 28-30.

## **CONCLUSIONES GENERALES**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

## CONCLUSIONES GENERALES

1. Los vinos obtenidos mediante el desbordamiento de la espuma y por burbujeo con dióxido de carbono (vinos de espuma) de dos vinos base (blanco y rosado), presentan valores de HM significativamente superiores a los del vino original. A su vez la fracción de los vinos que permanecía sin desbordar (vinos remanentes) presenta valores de HM significativamente menores que los del vino original. En el caso del vino rosado se observó además que el vino de espuma presentaba valores de HS superiores a los obtenidos para el vino original y el vino remanente. Sin embargo, para el vino blanco tan solo se observó que HS del vino remanente era significativamente inferior que en el vino original y el vino de espuma.
2. Los vinos de espuma presentan concentraciones de etanol, ésteres y ácidos grasos significativamente inferiores a los del vino original. Los vinos de espuma también presentan valores que son ligera pero significativamente mayores de densidad y menores de tensión superficial y viscosidad. Asimismo, el vino de espuma rosado presentó una concentración de proteínas significativamente superior a la del vino original y a la del vino remanente. En el caso del vino blanco las diferencias solo fueron significativas entre el vino de espuma y el vino remanente. Algunos de estos resultados pueden relacionarse con la evaporación que genera el burbujeo de dióxido de carbono en aquellas sustancias volátiles. Sin embargo, el enriquecimiento en sustancias no volátiles, especialmente en proteínas, que se observa en los vinos de espuma podría ser debido a que estas sustancias tensoactivas forman parte de la estructura del film de las burbujas, y al colapsar estas generarían una mayor concentración en el vino de espuma.

## CONCLUSIONES GENERALES

---

3. La toma de espuma comporta una disminución significativa de la altura máxima de la espuma (HM) del Cava respecto del vino base. Este descenso es probablemente debido a un aumento de la concentración en alcohol que comporta la segunda fermentación, y también a la drástica disminución de las proteínas que conlleva el uso de bentonita como coadyuvante de tiraje para facilitar el removido de las lías.
  
4. La inoculación secuenciada de *Torulaspora delbreuckii* y *Saccharomyces cerevisiae* en el mosto generó un vino base con valores de altura máxima (HM) y altura estable (HS) significativamente superiores a los obtenidos mediante inoculación convencional con solo *S. cerevisiae*. En los correspondientes Cavas, se mantuvo una HM significativamente mayor en el Cava procedente de la inoculación secuenciada, si bien no se observaron diferencias significativas para HS. Esta mejora de los parámetros de la espuma observada tanto para el vino base como para el Cava elaborados mediante inoculación secuenciada, probablemente está relacionada con una mayor concentración de proteínas detectada en relación con el vino base y el Cava convencionales. Por consiguiente, la inoculación secuenciada con *T. delbreuckii* y *S. cerevisiae* parece ser una alternativa interesante para obtener vinos espumosos de mejores características espumantes.
  
5. La suplementación con levaduras secas inactivadas (LSI) en el momento del tiraje permite obtener Cavas a los nueve meses de crianza con valores de HM y HS significativamente superiores a los de los Cavas elaborados sin adición de LSI. No obstante, no se observaron diferencias entre los dos tipos de LSI (*S. cerevisiae* o de *T. delbrueckii*). Se puede concluir, por tanto, que la

suplementación con LSI en el momento del tiraje es una herramienta útil para mejorar la espuma de los vinos espumosos

6. Un panel de cata entrenado fue capaz de distinguir de forma significativa, mediante test triangular, los Cavas suplementados con LSI respecto del Cava control. En el caso de los Cavas suplementados con LSI de *S. cerevisiae*, los catadores no mostraron una preferencia significativa respecto del Cava control. Sin embargo, para el Cava suplementado con LSI de *T. delbrueckii* la preferencia sí fue significativa.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas

Laura Medina Trujillo



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI