

Violeta García Viñola

**ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE PRODUCTOS
ENOLÓGICOS Y DIFERENTES SISTEMAS DE
NUTRICIÓN EN PIES DE CUBA PARA LA SEGUNDA
FERMENTACIÓN EN CAVA**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

dirigido por Nicolas Rozès y Joan Miquel Canals

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

Facultad de Enología



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Tarragona
Septiembre de 2021**

TÍTULO: ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE PRODUCTOS ENOLÓGICOS Y DIFERENTES SISTEMAS DE NUTRICIÓN EN PIES DE CUBA PARA LA SEGUNDA FERMENTACIÓN EN CAVA

AUTOR: VIOLETA GARCÍA VIÑOLA

DIRECCIÓN: Facultad de Enología. Campus Sescelades. Marcel·lí Domingo, s/n. 43007 Tarragona

EMAIL: violeta.garciav@estudiants.urv.cat

PALABRAS CLAVE: CAVA, SEGUNDA FERMENTACIÓN, PIES DE CUBA, NUTRIENTES DE LEVADURA, ACLIMATACIÓN, MANTENIMIENTO

RESUMEN

Codorniu produce anualmente 25 millones de botellas de cava, vino espumoso obtenido por el método *Champenoise* en el que se obtiene la "*prise de mousse*" o espuma. La segunda fermentación en botella del vino base, es realizada normalmente por una cepa seleccionada de *Saccharomyces cerevisiae*, que debido a las condiciones de alto estrés en la que se produce (alto etanol, bajas temperaturas, bajos pH y alto contenido en CO₂) debe ser aclimatada previamente para garantizar su adaptación a estas condiciones desfavorables. Para mejorar la supervivencia de las levaduras se pueden adicionar en la rehidratación y el mantenimiento de los pies de cuba diferentes productos enológicos. En este estudio se compararon tres tipos de formación y nutrición de pies de cuba para segunda fermentación por medio de la caracterización de los productos enológicos, el seguimiento de la evolución de los pies de cuba, la motorización de las cinéticas fermentativas en botella y el análisis del producto final. La nutrición A consistía en un modelo clásico con mantenimientos con vino, agua, azúcar y nutriente, la nutrición B tuvo mantenimientos con agua, azúcar y nutriente y la nutrición C solo con azúcar y nutriente en días alternos. Se realizó de estos tres tipos de nutrición tiraje durante cinco días. En la nutrición A y B se utilizaron los mismos productos enológicos, diferentes a los utilizados en la nutrición C. Los resultados muestran diferencias significativas en los contenidos en nitrógeno, ácidos grasos, esteroides y metabolitos de los productos utilizados y por lo tanto diferencias en el contenido de estos compuestos en las células de los pies de cuba. Las condiciones más desfavorables (contenidos en ácidos grasos, esteroides y grado alcohólico) se encontraron en el caso de la nutrición C, aunque se obtuvieron las mayores poblaciones totales. Todas las fermentaciones nutrición-día, en total 15, comenzaron en menos de 3 días y finalizaron en menos de 33. La condición que peor ratio de fermentación y viabilidad por aumento de presión fue la nutrición C y fueron muy similares en el caso de la nutrición A y B. No se observaron diferencias en el producto final en los tres casos en el cual se obtuvieron similares analíticas básicas, similar calidad de espuma y diferencias no significativas en el análisis sensorial.

ABSTRACT

Codorniu produces 25 million bottles of cava annually, sparkling wine obtained by the *Champenoise* method in which the "prise de mousse" or foam is obtained. The second fermentation in the bottle of the base wine is normally carried out by a selected strain of *Saccharomyces cerevisiae*, which, considering the high stress conditions in which it is produced (high ethanol, low temperatures, low pH and high CO₂ content) has to be acclimatized previously to guarantee its adaptation to these unfavorable conditions. In order to improve the survival of the yeasts, different oenological products can be added in the rehydration and maintenance of starter medium. In this study, three types of formation and nutrition of starters for second fermentation were compared through the characterization of oenological products, monitoring of starters evolution, motorization of fermentation kinetics in the bottle, and analysis of the final product. Firstly, nutrition A consisted of a classic model with maintenance with wine, water, sugar and nutrient; secondly nutrition B maintenance with water, sugar and nutrient and finally nutrition C only with sugar and nutrient on alternate days. These three types of nutrition were used for five days. In both nutrition A and B the same oenological products were used, different from those used in nutrition C. The results show significant differences in the content of nitrogen, fatty acids, sterols and metabolites of the products used and therefore differences in the content of these compounds in the cells of the starters. The most unfavorable conditions (content of fatty acids, sterols and alcoholic degree) were found in the case of nutrition C, although the largest total populations were obtained. All nutrition-day fermentations, a total of 15, began in less than 3 days and ended in less than 33. The condition with the worst rate of fermentation and viability due to increased pressure was nutrition C and they were very similar in the case of the nutrition A and B. No differences were observed in the final product in the three cases in which similar basic analytics were obtained, similar foam quality and non-significant differences in the sensory analysis.

Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	5
2. Materiales y métodos	7
2.1. <u>Vino base</u>	7
2.2. <u>Pies de cuba para la segunda fermentación</u>	11
2.3. <u>Tiraje</u>	11
2.4. <u>Condiciones de segunda fermentación</u>	11
2.5. <u>Puntos de estudio</u>	11
2.5.1. <i>Estudio de los pies de cuba</i>	11
2.5.2. <i>Seguimiento de la segunda fermentación</i>	11
2.5.3. <i>Análisis del producto final</i>	11
2.6. <u>Contaje levaduras</u>	11
2.6.1. <i>Recuento células totales</i>	11
2.6.2. <i>Recuento células viables</i>	11
2.7. <u>Determinación de ácidos grasos totales por GC-FID</u>	12
2.8. <u>Determinación de los esteroides y del escualeno por GC-MS</u>	12
2.9. <u>Determinación de metabolitos intracelulares no lipídicos por GC-MS</u>	12
2.10. <u>Determinación de la calidad de la espuma</u>	13
2.11. <u>Análisis sensorial</u>	13
2.12. <u>Análisis estadístico</u>	13
3. Resultados y discusión	14
3.1. <u>Caracterización de los productos enológicos</u>	14
3.1.1. <i>Composición en nitrógeno amoniacal y alfa-amínico de los productos</i>	14
3.1.2. <i>Composición en ácidos grasos de los productos</i>	14
3.1.3. <i>Composición en esteroides y escualeno de los productos</i>	15
3.1.4. <i>Determinación de la composición en metabolitos no lipídicos de los productos</i>	16
3.2. <u>Evolución de los pies de cuba en su formación y mantenimiento</u>	16
3.2.1. <i>Determinación de las poblaciones totales durante el mantenimiento de los pies de cuba</i>	16
3.2.2. <i>Determinación del Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA) durante el mantenimiento de los pies de cuba</i>	17
3.2.3. <i>Determinación del Grado alcohólico durante la aclimatación y el mantenimiento de los pies de cuba</i>	18
3.2.4. <i>Determinación de la Acidez Volátil durante la aclimatación y el mantenimiento de los pies de cuba</i>	18
3.2.5. <i>Determinación de la composición en ácidos grasos de las levaduras durante el mantenimiento de los pies de cuba</i>	19
3.2.6. <i>Determinación de la composición en esteroides de las levaduras durante la formación y el mantenimiento de los pies de cuba</i>	20
3.2.7. <i>Determinación de la composición en metabolitos no lipídicos de las levaduras durante la aclimatación de los pies de cuba</i>	21
3.3. <u>Seguimiento de la segunda fermentación en botella</u>	22
3.3.1. <i>Inicio y días finalización de la segunda fermentación</i>	22
3.3.2. <i>Influencia de la presión en la viabilidad celular</i>	22
3.4. <u>Análisis del producto final</u>	23
3.4.1. <i>Análíticas fin de la segunda fermentación para las distintas nutriciones en los cinco días de tiraje</i>	23
3.4.2. <i>Calidad de la Espuma (MOSALUX)</i>	23
3.4.3. <i>Análisis sensorial</i>	24
4. Conclusiones	25
5. Perspectivas futuras	26
6. Agradecimientos	26
7. Bibliografía	27
ANEXOS: Tablas y Figuras	30

1. Introducción

Cavas Codorníu posee una historia de más de 450 años y produjo en España la primera botella de cava por el método tradicional en 1872. Anualmente produce aproximadamente 25 millones de botellas de cava por el método tradicional, por lo que sus sistemas de producción deben estar adaptados a estas condiciones. La producción de cava se realiza en un sistema continuo, en el cual diariamente, se embotellan aproximadamente 200.000 botellas en formato de 750 mL que son almacenadas para realizar la segunda fermentación en sus cavas subterráneas.

El cava es un vino espumoso, definido según el artículo 21 de la Ley 25/190 como “*vino espumoso natural, cuyo proceso de elaboración y crianza, desde la segunda fermentación hasta la eliminación de lías inclusive, transcurre en la misma botella en que se ha efectuado el tiraje*” (BOE-A-1986-5257) y es regulado a su vez por la Denominación de Origen Cava que recoge en su pliego de condiciones las características analíticas, organolépticas y técnicas que deben cumplir los vinos espumosos para denominarse cava. El cava se realiza por el método tradicional en unas zonas geográficas específicas de las provincias de Barcelona, Girona, Lleida, Tarragona, Álava, La Rioja, Navarra, Zaragoza, Badajoz y Valencia (Pliego Condiciones Denominación de Origen Protegida Cava).

El método tradicional para la elaboración de un vino espumoso requiere dos procesos fermentativos. El primero, que involucra una fermentación alcohólica del mosto obtenido por el prensado de uva para obtener el vino base y una segunda fermentación en botella (método tradicional o *Champenoise*) cerrada en la que se obtiene el “prise de mousse” o espuma. Esta segunda fermentación o “tiraje”, que se produce dentro de la botella, se consigue por la adición al vino base de una solución de azúcar denominada “licor de tiraje” y la adición de levadura (Kemp et al., 2019). La segunda fermentación se realiza generalmente con la una única inoculación de una cepa seleccionada de *Saccharomyces cerevisiae* y su selección influye tanto en las cinéticas fermentativas como en las características fisicoquímicas y organolépticas finales. La segunda fermentación, se considera acabada cuando el CO₂ producido en la segunda fermentación genera una sobrepresión de aproximadamente 6 bares en función del azúcar adicionado durante el tiraje (Liger-Belair et al., 2017). Una vez realizada la segunda fermentación se realiza la clarificación del cava que puede ser potenciada por la adición de clarificantes, como la bentonita, adicionados en el proceso de tiraje y que facilita la eliminación de los productos celulares de la fermentación (Garofalo et al., 2016).

Esta segunda fermentación ocurre bajo condiciones de alto estrés para las levaduras; bajas temperaturas entre los 12 y los 18°C, aumento de la sobrepresión hasta llegar a los 6 o 7 bares, un contenido en etanol elevado que puede alcanzar los 12,5% (v/v), pH bajos entre los 2,8 y los 3,3 y contenido en sulfitos del vino base (Penacho et al., 2012, Porras et al., 2021). Las condiciones de alto etanol y bajas temperaturas modifican la estructura de las membranas celulares, disminuyendo su viabilidad como respuesta al estrés (Beltran et al., 2008). Por todo ello, la adaptación a estas condiciones de la levadura inoculada en la segunda fermentación mejora y asegura una fermentación completa (Tay et al., 2007).

La adaptación progresiva a contenidos de etanol de las levaduras en los pies de cuba para segunda fermentación se realiza de manera paulatina por el consumo progresivo de azúcar en los denominados pies de cuba, asegurando la inoculación de levadura en botella adaptada al grado alcohólico final (Juroszek et al., 1987). Para mejorar las condiciones de estrés de la levadura en los pies de cuba los nutrientes adicionados en la formación y mantenimiento del pie de cuba influyen en su supervivencia. Los factores de crecimiento y supervivencia para las levaduras pueden ser las vitaminas, los lípidos, los aminoácidos y el nitrógeno fácilmente asimilable, que comprende el nitrógeno amoniacal y α -amínico, uno de los factores causantes de las paradas fermentativas (Bisson et al., 1999). La adición de levaduras secas inactivas, con altos contenidos en nitrógeno orgánico, lípidos y esteroides de membrana mejoran la viabilidad, por reducción de estrés, aumentando el número de células por mililitro en el pie de cuba y garantizando mejores cinéticas fermentativas (Pozo-Bayón et al., 2009). Además, estos productos proporcionan otros nutrientes para la levadura como son aminoácidos, vitaminas y minerales.

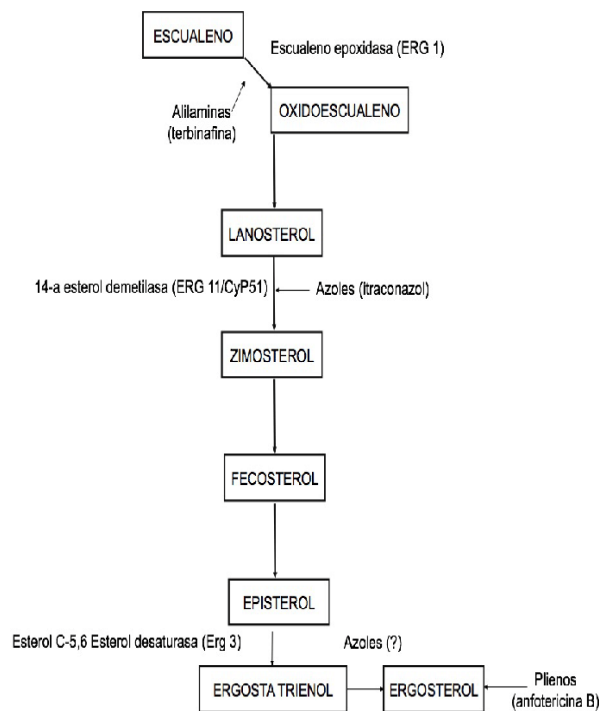
El nitrógeno facilita la producción de biomasa y mejora los rendimientos enológicos de azúcar, siendo el nitrógeno amoniacal el preferido por las levaduras durante la fase estacionaria de crecimiento, ya que aumenta la viabilidad celular y la supervivencia (Martín-Raga et al., 2015; Beltran et al., 2005). Por lo tanto, su adición en los pies de cuba mejora la producción de biomasa y mejora su adaptación a las condiciones de estrés de la segunda fermentación (Laurent et al., 2007).

Los ácidos grasos cuya presencia es mayoritaria en las membranas lipídicas de las levaduras son los ácidos grasos insaturados, como el ácido palmitoleico (C16:1) y el ácido oleico (C18:1); así como los ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico (C16) y el esteárico (C18) (Daum et al., 1998). Estos ácidos

grasos mejoran la estructura de la membrana, en la que a mayor grado de insaturación la membrana presenta una mejor adaptación a las condiciones de la segunda fermentación como son las bajas temperaturas y los contenidos altos en etanol. A pesar, de que *S. cerevisiae* sintetiza ácidos grasos saturados y monoinsaturados de longitud de cadena en C16 y C18, no sintetiza poliinsaturados, y que bajo condiciones de ausencia de oxígeno no se produce la desaturación (Rodríguez et al., 2006, Yazawa et al., 2009). La desaturación aumenta el número de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de membrana, aumentando su flexibilidad, por lo que su adición o estimulación por oxigenación previa mejora las condiciones celulares mejorando la permeabilidad y la fluidez de la membrana (Weber et al., 2000).

Los esteroides son lípidos esenciales en la composición de la membrana celular ya que contribuyen a la absorción de diversos compuestos y mejoran la permeabilidad y la fluidez de la membrana celular, y

por lo tanto su viabilidad y adaptación (Soubeyrand et al., 2005). Esto hace que su adición en la rehidratación y aclimatación de las levaduras en los pies de cuba mejore la supervivencia. El esteroide principal en las membranas celulares de las levaduras es el ergosterol, producto final de la vía de biosíntesis de los esteroides. Sin embargo, existen numerosos intermediarios en su formación (Figura 1) que pueden estar presentes en el medio nutritivo de los pies de cuba con la presencia de oxígeno. El escualeno, iniciador de la vía principal de los esteroides, se acumula en las células en anaerobiosis, y por lo tanto en una condición de hipoxia, la formación de ergosterol disminuye (Parks, 1987). El ergosterol tiene tres funciones principales: una función “sparking” (iniciando o manteniendo el crecimiento de *S. cerevisiae*), una función “dominio crítico” (usado solo en ciertas regiones de la membrana) y función “bulk” (manteniendo la estructura y fluidez de la



membrana) (Parks, 1987).

Figura 1: Síntesis de ergosterol a partir de escualeno. (adaptación de Daum, et al., 1998).

El objetivo de este trabajo es evaluar tres diferentes tipos de nutrición y mantenimiento en pies de cuba, estudiando los nutrientes adicionados y su influencia en la adaptación de las levaduras a las condiciones de la segunda fermentación con el fin de asegurar una correcta fermentación y optimizar los procesos de dosificación y utilización de las levaduras. Para ello, se han comparado tres sistemas de nutrición con la misma levadura, en el que se diferenciaron los nutrientes adicionados y las diluciones con agua o vino durante las fases de mantenimiento.

2. Materiales y métodos

2.1. Vino base

El vino base blanco utilizado en este estudio proviene de un *coupage* de las variedades tradicionales (Xarel·lo, Parellada y Macabeo) al 33,3% elaborado en las Caves Codorniu (Sant Sadurní d'Anoia, Barcelona) durante la campaña 2020.

Las analíticas básicas del vino utilizado para este estudio están descritas en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición química del vino base utilizado en el estudio.

	Valor	Unidades	Metodología
pH	3,15		OIV-MA-BS-13//FTIR
Acidez total	5,50	g ácido tartárico/L	OIV-MA-BS-12//FTIR
Grado alcohólico	10,2	%(v/v)	OIV-MA-BS-02//FTIR
Ácido acético	0,23	g ácido acético/L	Análisis Enzimático*
SO₂ libre	10	mg/L	OIV-MA-AS323-04A
SO₂ total	66	mg/L	OIV-MA-AS323-04A
Nitrógeno (α-amínico y amoniacal)	70	mg/L	Análisis Colorimétrico y Enzimático*

*Los análisis enzimáticos y colorimétricos (ácido acético y nitrógeno α -amínico y amoniacal) se realizaron con el autoanalizador enzimático MIURA 200 (TDI, Barcelona, España). Para obtener los valores del NFA (Nitrógeno Fácilmente Asimilable) se sumaron los valores de nitrógeno α -amínico (método colorimétrico) y amoniacal (método enzimático) automáticamente.

2.2. Pies de cuba para la segunda fermentación

Para la preparación de los pies de cuba para segunda fermentación en botella se siguieron tres modalidades diferentes de nutrición (detallados en las figuras 2, 3 y 4) y están resumidos en la Tabla 2. Los pies de cuba se prepararon en biorreactores de una capacidad de 3000 L con aporte constante de oxígeno, agitación y temperatura controlada (18°C).

- El primero (protocolo A) sigue un patrón de pie de cuba convencional donde se produce una multiplicación y adaptación inicial progresiva de la levadura a las condiciones de la segunda fermentación durante 3 días. Posteriormente se mantienen las condiciones idóneas para su inoculación a lo largo de 5 días de tiraje consecutivos por la adición de vino y agua para realizar un factor dilución de grado, junto con azúcar y nutrientes.

- El segundo (protocolo B) sigue el mismo patrón sin embargo la renovación del pie de cuba es menor y se realizan los mantenimientos solo con agua, junto con azúcar y nutrientes.

- El tercer sistema (protocolo C) difiere al añadirse progresivamente una solución de vino, agua y nutrientes durante los tres primeros días, para una vez obtenido el volumen total del pie de cuba realizar adiciones diarias de azúcar y en días alternativos de nutriente durante los 5 días de tiraje sin aplicar la acción de dilución.

Tabla 2: Puntos básicos de los protocolos de rehidratación, nutrición y mantenimiento de los tres pies de cuba utilizados en este estudio.

	Producto rehidratación	Producto Nutrición o mantenimiento	Adición vino en mantenimiento	Adición agua en mantenimiento
Protocolo de nutrición A	A	B	SI	SI
Protocolo de nutrición B	A	B	NO	SI
Protocolo de nutrición C	C	D	NO	NO

PROTOCOLO A

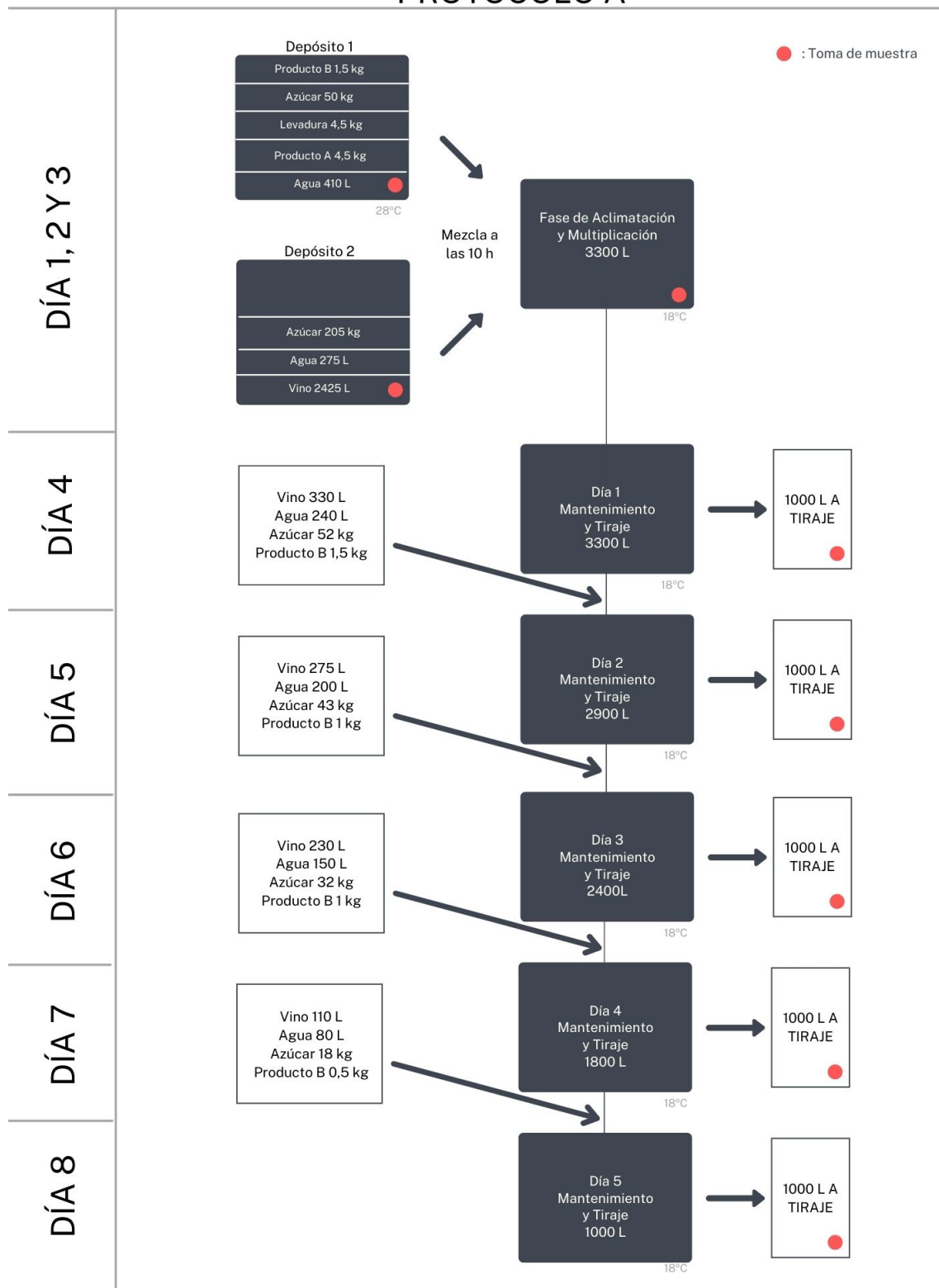


Figura 2: Esquema del protocolo de nutrición A. Los puntos rojos muestran los puntos de toma de muestras.

PROTOCOLO B

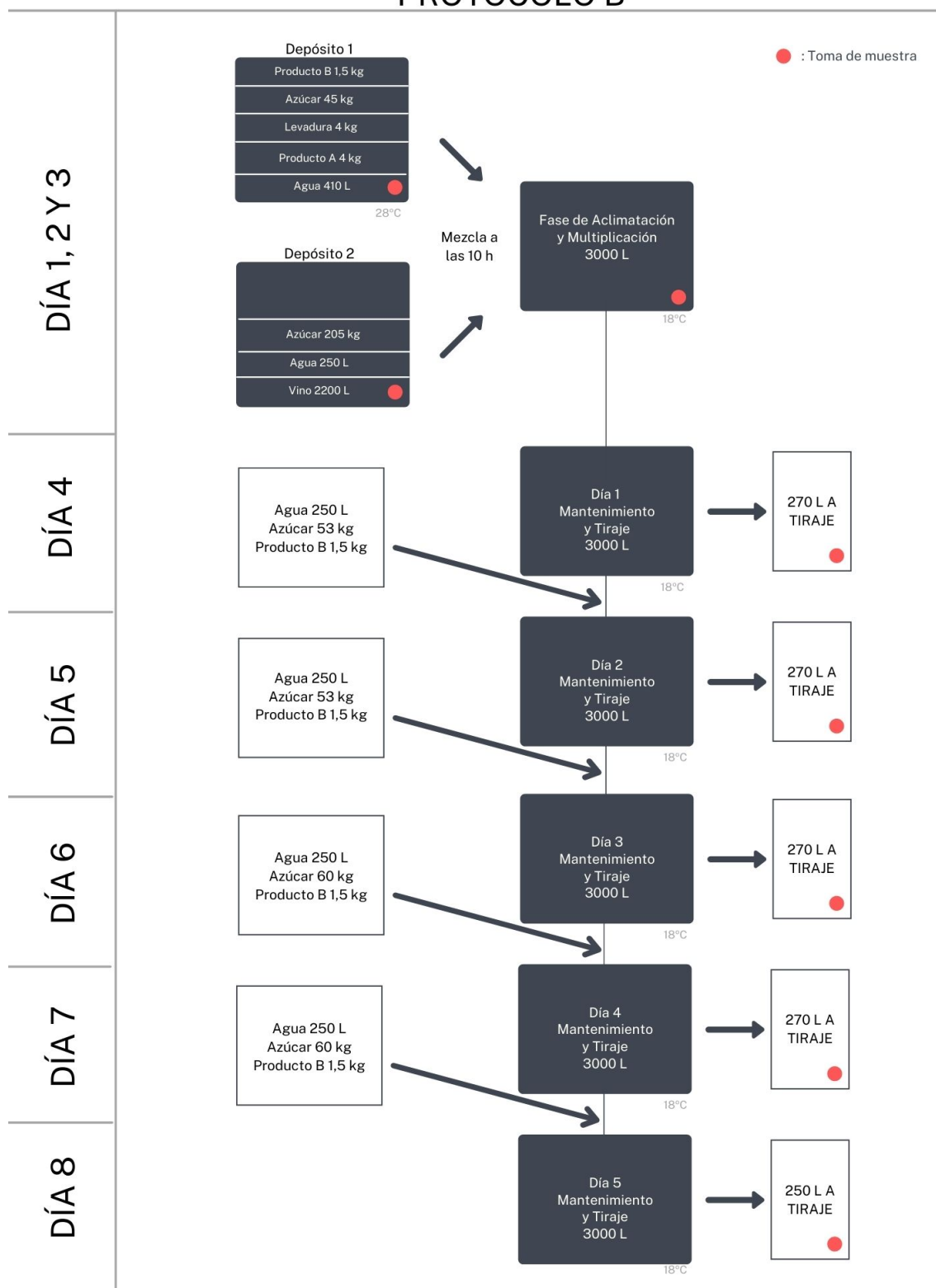


Figura 3: Esquema del protocolo de nutrición B. Los puntos rojos muestran los puntos de toma de muestras.

PROTOCOLO C

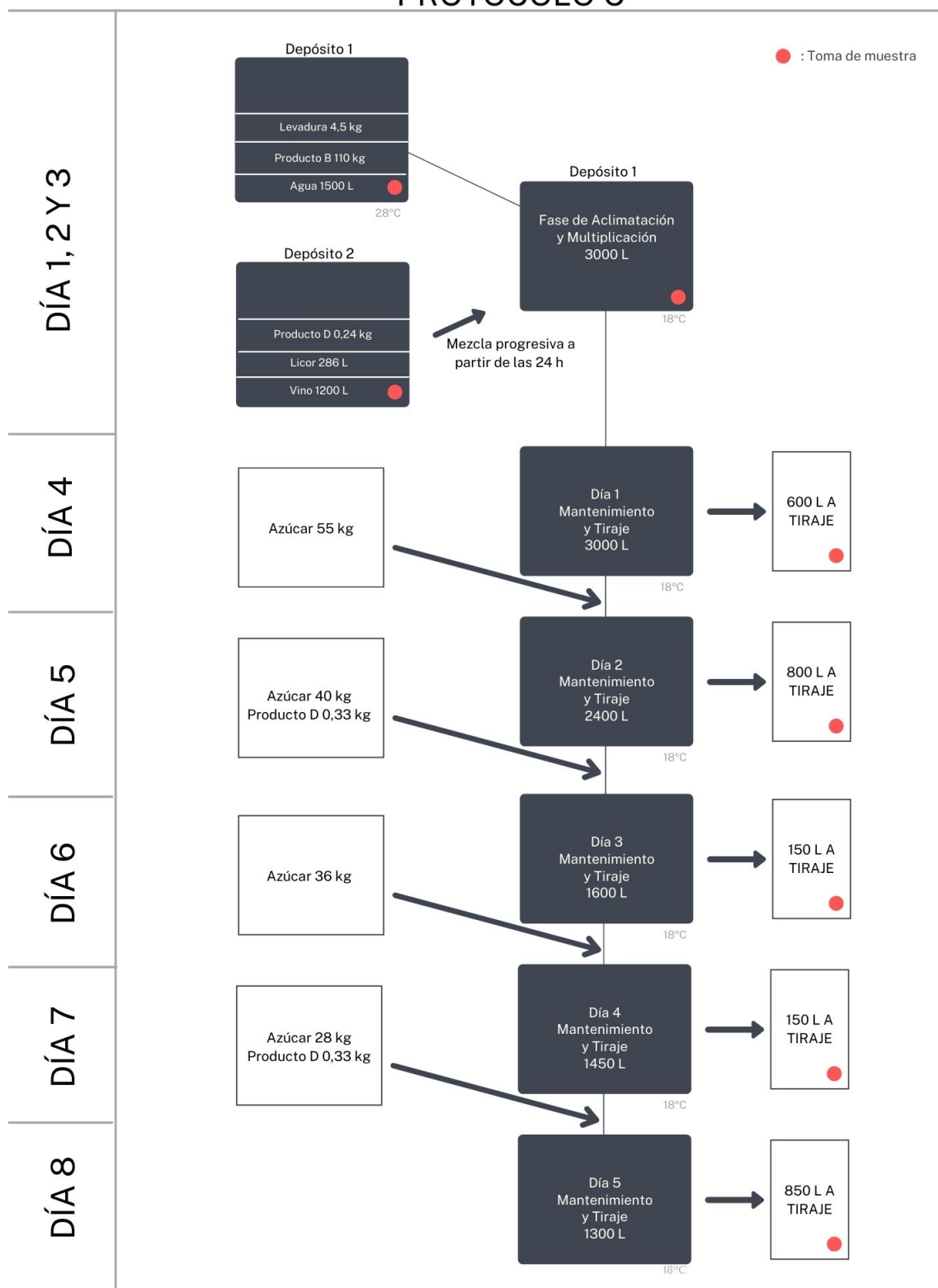


Figura 4: Esquema del protocolo de nutrición C. Los puntos rojos muestran los puntos de toma de muestras.

Para la elaboración de los 3 pies de cuba se inoculó una levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (18-2007, IOC, Francia), K2 activa y con capacidad fructofílica natural por encima de la media de las otras *S. cerevisiae* comercializadas. Los productos A y B están compuestos por levaduras inactivas más coadyuvantes, el producto C por autolisados, levaduras inactivas y magnesio y el producto D por cortezas de levadura y autolisados de levadura más coadyuvantes.

2.3. Tiraje

Todo el sistema se realizó por el método tradicional en las Cavas Codorniu. En primer lugar se preparó un licor de tiraje, una solución de bentonita y los tres pies de cuba como se detalla en el apartado 2.2. Las tres mezclas de tiraje (vino, licor y levadura) se realizaron en sistema continuo, con una cantidad de azúcar final de 20 g/L expresado con glucosa/fructosa y con una población total de levaduras de $1,6 \cdot 10^6$ cél/mL en todos los casos. Las mezclas se embotellaron en botellas de 750 mL y se taparon herméticamente con un obturador y tapón corona de aluminio TC1002 (ISART, Barcelona). Por cada nutrición y día de tiraje se hicieron tiradas de 8.400 botellas.

2.4. Condiciones de segunda fermentación

Una vez realizado el tiraje, las botellas se almacenaron en posición horizontal en una zona con una temperatura constante de 15,5 °C para su fermentación.

2.5. Puntos de estudio

2.5.1. *Estudio de los pies de cuba*

De las tres condiciones de nutrición se obtuvieron muestras cada uno de los 8 días del proceso. Los tres primeros días (1-3) comprenden la fase de rehidratación o aclimatación y los 5 siguientes a la fase de mantenimiento o tiraje (4-8). En el caso del primer día de aclimatación se tomó la muestra a las 10 horas de rehidratación y en el caso de los cinco días de tiraje se obtuvieron las muestras antes del mantenimiento sobre el volumen que se utilizó en el tiraje.

2.5.2. *Seguimiento de la segunda fermentación*

Las tres condiciones se mantuvieron durante 5 días de tiraje o mantenimiento (lunes-viernes) y por ello se realizó el seguimiento de cada una de ellas todos los días, en un total de 15 condiciones (nutrición por día). El muestreo se realizó sobre las botellas en fermentación almacenadas en función de las necesidades. Para determinar el inicio de la fermentación se introdujo un manómetro en una botella condición/día y posteriormente se realizaron lecturas cada 3 días.

2.5.3. *Análisis del producto final*

Se realizaron análisis del producto final de los 5 días de tiraje o mantenimiento (lunes-viernes) por cada nutrición a los tres meses desde el tiraje.

2.6. Contaje de levaduras

2.6.1. *Recuento células totales*

Los recuentos celulares se realizaron mediante microscopio y una cámara Neubauer con tinción de azul de metileno en solución tampón pH 4,6 (Azul de metileno + $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ + PO_4HNa_2 , Panreac, Barcelona, España) para determinar el número de células vivas, gemantes y muertas en la mezcla de tiraje y antes de realizar los mantenimientos en los pies de cuba.

2.6.2. *Recuento células viables*

La viabilidad celular se realizó en cultivo en placas Petri con medio sólido YPD que contiene 20 g/L de glucosa (Panreac), 20 g/L de peptona (Panreac), 10 g/L de extracto de levadura (Panreac) y 20 g/L de agar (Panreac). Previo a la siembra se realizó una serie de diluciones decimales hasta obtener 10^{-3} , de las cuales 100 μL se sembraron en placas y se incubaron a 22 °C durante 2 a 3 días para posteriormente hacer el recuento de colonias y determinar las poblaciones en Unidad Formadora de Colonias (UFC) por mL. Esta metodología se siguió para el recuento de células viables y cultivables a 0, 2, 4 y 6 bares de presión de las botellas en fermentación.

2.7. Determinación de ácidos grasos totales por GC-FID

La determinación de ácidos grasos totales se realizó en las tres condiciones durante los ocho días de pie de cuba y sobre los cuatro productos según una modificación del método por Borrull et al. (2015). En primer lugar, se centrifugaron 45 mL de muestra a 10.000 rpm durante 5 minutos, el pellet obtenido se llevó a un microtubo (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se resuspendieron 45 µL de pellet (o 10 mg de nutriente) en 2 mL de H₂SO₄ en metanol al 2,5% (v/v) y 10 µL de ácido heptadecanoico (C17, 4 mg/mL) diluido en hexano como patrón interno. Esta mezcla se mantuvo a 90 °C en baño seco durante una hora. Una vez enfriada la mezcla se añadió 1 mL de agua Milli-Q y 300 µL de hexano y se agitó durante 30 segundos. Se centrifugó la muestra a 3.000 rpm durante 5 minutos y una vez separadas las dos fases se extrajo la fase superior y se inyectó (2 µL) en el cromatógrafo de gases acoplado a un detector de flama (FID). El extracto se inyectó (splitless, 0,75 min) en una columna FFAP-HP de fase de 30 m × 250 µm × 0,25 µm espesor (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) con un inyector automático (Agilent Technologies). El programa de temperatura cambió de 100 °C a 240 °C (5 min) a 4 °C/min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 220 °C y 250 °C, respectivamente. El gas portador fue helio, aplicado a 1,2 mL/min. Las cantidades relativas de los ácidos grasos dados se calcularon a partir de su respectivas áreas de pico cromatográfico después de la normalización con el patrón interno (C17).

2.8. Determinación de los esteroides y del escualeno por GC-MS

La determinación de esteroides y escualeno se realizó también en las tres condiciones durante los ocho días de pie de cuba y sobre los cuatro productos según una modificación del método descrito por Quail y Kelly (1996). 10 mg de producto o 100 µL de pellet obtenido según el procedimiento descrito en el apartado 2.7 fueron resuspendidos en 5 mL de KOH al 12% (p/v) en metanol y con 10 µL de α-colestano (1 µg/mL) como patrón interno, esta mezcla se mantuvo a 70°C al baño seco durante 1 hora. Después, se añadió 1 mL de agua Milli-Q y 0,5 mL de hexano, se agitó durante 30 segundos y se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos. La fase superior obtenida de la centrifugación se secó mediante el equipo *speed vacuum system* SC110 (Savant Instruments, USA) durante 30 minutos a 45 °C. La muestra seca se resuspendió con 100 µL de hexano y se inyectó en el cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masa (MS).

La cromatografía de gases se realizó con un dispositivo Agilent Sistema GC 6890N conectado a un equipo HP Vectra con Software ChemStation (Agilent Technologies). Se inyectaron 2 µL en modo pulsado splitless (70 psi, 0,10 min) en una columna DB-5HT (30 m 0,25 mm 0,1 mm, Agilent Technologies) con un inyector automático (7683B, Agilent Technologies). Se utilizó helio como gas portador a un flujo constante de 1,2 mL/min. La temperatura del inyector fue de 160 °C. El programa de temperatura se inició a 160 °C min y aumentó a una velocidad de 50 °C/min hasta 260 °C, y luego a 320 °C a una velocidad de 4°C/min, donde se mantuvo durante 1 min. Los esteroides y el escualeno se detectaron utilizando un detector selectivo de masas inerte (MSD, modelo 5975, Agilent Technologies). Las temperatura del MSD transfer, MS Quad y MS Source fueron 300 °C, 150 °C y 280 °C, respectivamente. Los datos de MSD se adquirieron en modo de ionización electrónica a 70 eV dentro de un rango de 60 a 700 amu. El análisis posterior a la ejecución se realizó con el Chemstation Agilent MSD mejorada (versión 1989e2005, Agilent Tecnologías). Se realizó la identificación de cada compuesto comparando el patrón de fragmentación masiva del pico con los de la inyección de estándar disponible o descrito por Quail y Kelly (1996). La abundancia relativa de cada compuesto identificado fue calculada de acuerdo con las respectivas áreas de picos cromatográficos corregido con respecto al área de pico de IS. Los resultados se expresan como porcentaje individual de la suma total de esteroides identificados y escualeno.

2.9. Determinación de metabolitos intracelulares no lipídicos por GC-MS

La determinación de metabolitos intracelulares se realizó sobre los cuatro productos y los tres primeros días (fase de aclimatación) de las tres condiciones de nutrición según el método descrito por Ruiz de Villa (2019). Se pesó 10 mg de producto enológico y se hidrató en 400 µL de una mezcla de agua Milli-Q y metanol en proporción 1:1 vol, 100 µL de pellet fueron usados en el caso del estudio de las células del pie de cuba. Esta mezcla se agitó con un vortex y se introdujo a 90 °C en baño seco durante 10 minutos. Después, se centrifugó y se pasó el sobrenadante a un microtubo (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se secó en el *speed vacuum system* SC110 durante 3 horas. Al extracto seco se añadió 40 µL de metoxilamina (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) diluido en piridina a 20 mg/mL y se mantuvo a 70 °C

durante 1 hora en baño seco. Pasado este tiempo se añadió 60 µL de MSTBFA (Sigma-Aldrich) y se mantuvo durante 1 hora a 70 °C en baño seco para la sililación de los metabolitos. Finalmente, se inyectaron 2 µL del extracto celular en una proporción de división de 20:1 en una columna DB-5HT (30 m × 0,25 mm × 0,1 µm; Agilent Technologies) con un inyector automático (7683B, Agilent Technologies). Se utilizó helio como gas portador a un flujo constante de 1,0 ml/min. La temperatura del inyector fue de 200 °C. La temperatura del horno de la columna se mantuvo inicialmente a 80 °C durante 4 min y luego se incrementó primero a 200 °C a una velocidad de 5°C/min y luego a 300 °C a una velocidad de 25 °C/min, donde se mantuvo durante 7 min. La temperatura de transferencia del MSD fue de 300 °C. Las temperaturas de la fuente y cuadrangular del MSD se mantuvieron a 180 °C y 280 °C, respectivamente. Los datos de MSD se adquirieron en el modo de exploración de ionización electrónica a 70 eV dentro del rango de 35 a 650 amu después de un retraso del disolvente de 3 min. El análisis postrun se realizó con la Chemstation Agilent MSD. La abundancia relativa de cada compuesto identificado se calculó de acuerdo con las respectivas alturas de los picos corregidas con respecto a la altura de pico de IS (Ribitol). Los metabolitos se identificaron mediante las bibliotecas propias de MS y NIST 2017, y los tiempos de retención. Para la determinación de metabolitos intracelulares se trataron 50 µL de pellet y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente.

2.10. Determinación de la calidad de la espuma

La calidad de la espuma de los productos finales fue determinada mediante el sistema Mosalux y se ha seguido la metodología descrita por Maujean et al. (1990). Las muestras se analizaron transcurridos 3 meses desde su embotellado y se realizó sobre las muestras de la nutrición A y C. En primer lugar, se introdujo la membrana de la columna de medición en agua durante 24 horas para su hidratación antes de su uso. Se midieron 150 mL de cada muestra y se centrifugaron durante 15 minutos a 10.000 rpm a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante obtenido se trasladó a recipientes limpios y se guardó en una nevera a 20 °C durante 24 horas con el fin de realizar la lectura a 20 °C. Transcurridas las 24 horas de rehidratación de la membrana y atemperación de las muestras se realizó una calibración con 100 mL de agua destilada. Una vez calibrado, se introdujeron 100 mL de muestra con un flujo constante de 7 l/h de CO₂ y se midieron la altura máxima (HM) y la altura constante o estabilizada (HS) expresada en mm.

2.11. Análisis sensorial

Se constituyó un panel de catadores compuesto por 8 jueces entrenados pertenecientes al departamento de enología de Codorniu. Se realizaron dos catas, la primera en la que se evaluaron las diferencias entre las nutriciones por cada día de tiraje comparadas en una cata triangular dispuesta de manera separada comparando la nutrición A con la C, y otra comparando la nutrición B con la C de la misma manera. Los jueces a su vez identificaron si tenían alguna preferencia.

2.12. Análisis estadístico

El procesamiento y análisis de datos se realizó con Microsoft Office Excel 16.16.27 (Redmond, WA, USA) en el cálculo de medias y desviaciones típicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa XLSTAT (Addinsoft, Paris, Francia).

3. Resultados y discusión

El proceso de elaboración de los vinos espumosos se basa en dos etapas distintas: la primera en la cual se rehidrata y adapta la levadura a las condiciones estresantes para re-fermentar un vino (elaboración del pie de cuba) y la segunda, la *prise de mousse* o tiraje, es decir la obtención del vino espumoso en botella. En las condiciones industriales en las que se ha desarrollado este proyecto la aclimatación de la levadura (pie de cuba) a un medio como el vino tiene que perdurar 5 días para disponer de ella durante una semana laboral.

En este estudio se comentará en primer lugar la caracterización de los productos enológicos utilizados en la rehidratación (producto A y C) y el mantenimiento de los pies de cuba (producto B y D). Seguidamente los resultados de la aclimatación y mantenimiento de las levaduras según tres procedimientos diferentes utilizando los productos A y B para los protocolos de nutrición A y B, y los productos C y D para el protocolo de nutrición C. Por último, se comentarán los resultados del seguimiento de la segunda fermentación y las características del producto final.

3.1. Caracterización de los productos enológicos

3.1.1. Composición en nitrógeno amoniacal y α -amínico de los productos

Se analizaron la composición en nitrógeno amoniacal y α -amínico de los productos de rehidratación A y C y los productos de mantenimiento B y D y se calculó su NFA total.

Los resultados muestran una variabilidad en los contenidos en nitrógeno que están recogidos en la Tabla 3. Los productos de rehidratación A y C poseen cantidades similares de nitrógeno orgánico, entorno a 100 mg/g sin embargo el producto A no posee nitrógeno inorgánico y el producto C contiene 216 mg/g. Los productos para el mantenimiento de los pies de cuba (producto B y D) difieren en su contenido total en NFA siendo más de 1,5 veces mayor en el caso del producto B. El nitrógeno inorgánico, preferido por las levaduras, además es casi dos veces mayor en el caso del producto B de mantenimiento.

Tabla 3: Composición en nitrógeno amoniacal, α -amínico y NFA total de los productos enológicos expresados en mg/g.

Productos	Utilización durante	N. amoniacal (mg/g)	N. α -amínico (mg/g)	NFA total (mg/g)
A	Rehidratación	0	140	140
B	Mantenimiento	1278	122	1400
C	Rehidratación	216	114	330
D	Mantenimiento	683	157	840

3.1.2. Composición en ácidos grasos de los productos

En la Figura 5 podemos observar la composición en ácidos grasos de cadena media (MCFA), ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y el ácido linoleico (C18:2) de los cuatro productos utilizados durante la rehidratación (A y C) y la aclimatación (B y D) de las levaduras. Se puede observar que todos los productos tienen una composición en ácidos grasos diferente. En el caso del producto A hay una proporción de MUFA y C18:2 equivalente que puede sugerir un crecimiento de *S. cerevisiae* en un medio de cultivo suplementado con C18:2 o la presencia de una no-*Saccharomyces* antes de la inactivación. Los otros productos B, C y D no tienen o presentan poca cantidad de C18:2 en su composición lo que nos indica que seguramente el preparado de levaduras inactivadas se realizó a partir de una cepa de *S. cerevisiae*. Sin embargo, podemos notar que hay una mayor ratio de SFA respecto a MUFA en el caso del producto C, 1,3 mientras que en los otros productos esta ratio es siempre bajo de 1, es decir más de MUFA que de SFA, 0,32 y 0,16 para los productos C y D respectivamente.

Si consideramos que teóricamente los ácidos grasos de las levaduras inactivadas se liberan en el medio o se integran en las estructuras celulares de las levaduras en el momento de la rehidratación o mantenimiento, podemos decir que:

- Las levaduras rehidratadas con el producto A tendrán más ácidos insaturados (MUFA y C18:2) que las levaduras rehidratadas con el producto C que tendrán más presencia de SFA, y presentarán una estructura de la membrana más saturada.
- Las levaduras en presencia de los productos B y D tendrían que tener una composición en ácidos grasos similar porque los productos son equivalentes.

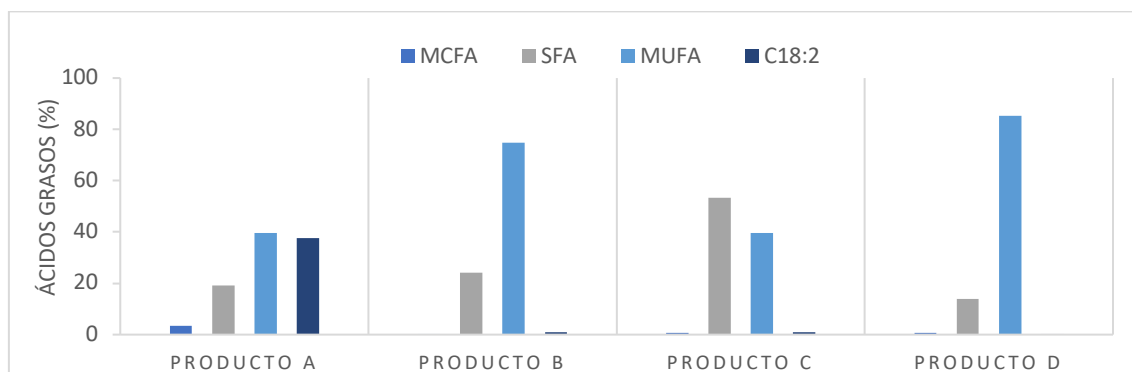


Figura 5: Composición en ácidos grasos de los productos A, B, C y D. MCFA, suma de los ácidos grasos de cadena media (C10 + C12); SFA, suma de los ácidos grasos saturados de cadena larga (C14 + C16 + C18); MUFA, suma de los ácidos grasos mono insaturados (C14:1 + C16:1 + C18:1).

3.1.3. Composición en esteroles y escualeno de los productos

El ergosterol se ha encontrado en los productos A y B en altas concentraciones con respecto al número de esteroles totales, suponiendo el 33% y el 49% respectivamente (Figura 6). También en estos dos productos se han encontrado intermediarios en su formación como son el escualeno, el zimosterol, lanosterol y el episterol. El escualeno y el zimosterol se han encontrado a porcentajes similares en el producto A, en el caso del producto B el zimosterol es el intermediario más presente después del escualeno. En el caso del producto C solo se ha detectado escualeno y en el D solo se han identificado escualeno y lanosterol. Estas diferencias se deben posiblemente al tipo de producto celular, ya que en el caso del producto A es autolisado de levadura y levaduras inactivas, y en el B son cortezas y autolisados por lo que contienen los esteroles de membrana e intracelulares, mientras que los productos C y D al contener solo escualeno puede ser debido a su forma de preparación en la que se han eliminado la fracción de las membranas celulares al ser lisados de levadura.

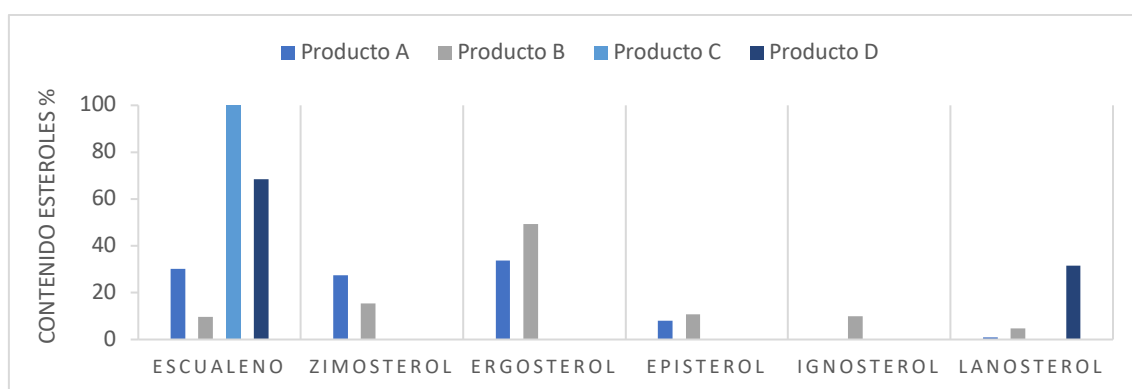


Figura 6: Contenido de esteroles expresado en porcentaje del total de esteroles en cada producto de rehidratación A y C y de mantenimiento B y D.

3.1.4. Determinación de la composición en metabolitos no lipídicos de los productos

Se realizó también el análisis de los metabolitos no lipídicos de los productos por GC (Tabla 4). Para su identificación los resultados se compararon con una base de datos y posteriormente se filtraron solo aquellos que tuvieron más de un 75% de coincidencia con los espectros de masa de los metabolitos de las bases de datos propias y comercial (NIST17).

En todos los casos se encontraron aminoácidos, y más específicamente la alanina que estaba presente en los cuatro productos. Los productos más ricos en aminoácidos son el producto A que contiene alanina, leucina, lisina, serina y tirosina y el producto D que incluye alanina, leucina, prolina, serina y valina. Su adición puede mejorar la resistencia de la membrana al estrés provocado por grandes concentraciones de etanol (Ding et al., 2009)

Otros de los compuestos presentes en los productos en mayor porcentaje son los azúcares. Hay diferencias entre los productos de rehidratación que son el A y el C y los productos para el mantenimiento del pie de cuba como serían el B y el D. En el primer caso se encuentran el mayor número de azúcares. En el producto A encontramos manitol, glicerol, glucosa y trehalosa y en el C existe presencia de glucosa, fructosa y sacarosa. También encontramos azúcares en el producto D como fructosa y tanto en el producto B como en el D hay derivados trehalosa.

Cabe destacar que se han encontrado la presencia de aminas biógenas como la cadaverina y la putrescina en el Producto C y D, que puede ser debido a una contaminación por bacterias lácticas o por el uso de materia prima que lo contuviese en la fabricación de los productos.

Tabla 4: Resumen cualitativo de la presencia de metabolitos en los productos utilizados para la rehidratación y el mantenimiento. -, ninguna presencia; +, presencia; +++, muy presente. Se ha calculado la presencia por relación de áreas de los mismos metabolitos entre productos.

	Producto A	Producto B	Producto C	Producto D
Hexosas	++	+	++	+
Disacáridos	++	+	++	+
Ácidos orgánicos	+	+	+++	+
Aminoácidos	+++	+	+	+++
Aminas biógenas	-	-	+	+
Otros	+	+	+++	+++

3.2 Evolución de los pies de cuba en su formación y mantenimiento

3.2.1. Determinación de las poblaciones totales durante el mantenimiento de los pies de cuba

La cantidad total de células en los tres pies de cuba varía en los tres casos (Figura 7). Las poblaciones más altas se dan en la nutrición C con $372 \cdot 10^6$ cél/mL, siendo del orden de 2,5 veces mayor que en las nutriciones A y B. Sin embargo, la desviación típica (Tabla A1, Anexo) muestra una mayor variabilidad en este caso a lo largo de los días. Las poblaciones se mantienen en el orden de los $100 \cdot 10^6$ cél/mL en el caso de las nutriciones A y B, sin embargo existe una mayor variabilidad en el caso de la nutrición A en comparación con la B debido posiblemente a la renovación de una mayor cantidad de volumen cada día de tiraje (1000 litros/día).

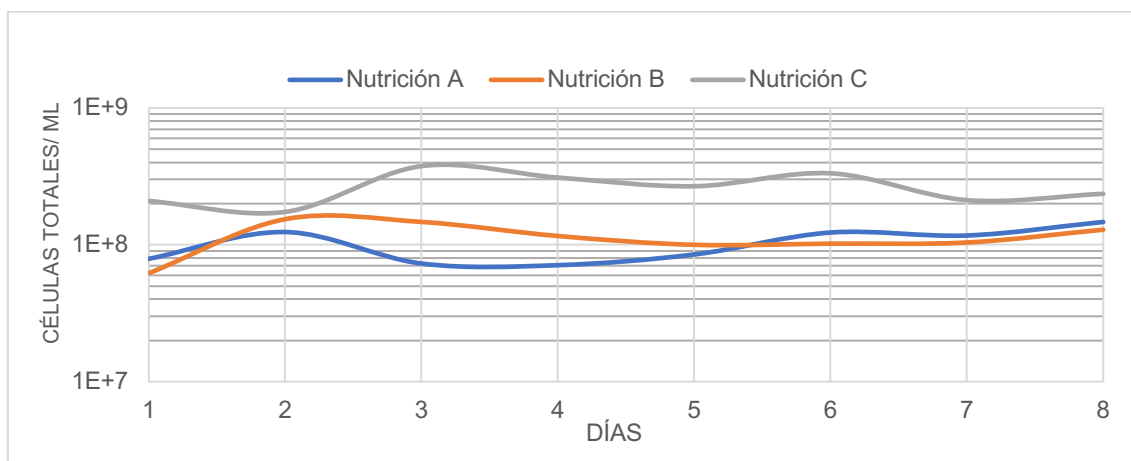


Figura 7: Evolución de las células totales (cél/mL) de los pies de cuba en las tres nutriciones a lo largo de los ocho días de aclimatación y mantenimiento.

3.2.2. Determinación del Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA) durante el mantenimiento de los pies de cuba

El nitrógeno es un factor limitante en el crecimiento de las levaduras y supone un foco importante en la formación y mantenimiento de los pies de cuba (Bisson et al., 1999). El contenido en nitrógeno orgánico e inorgánico a lo largo de los días de aclimatación o formación (del día 1 al 3) a los días de tiraje o mantenimiento (del día 4 al 8), puede modificar la producción de biomasa o las poblaciones totales, variando la cantidad de celular del pie de cuba y su aclimatación al medio (Martí-Raga et al., 2015).

Los contenidos en nitrógeno expresados en mg N/L presentan grandes variaciones en los tres tipos de nutrición (Figura 8). Mientras que en la nutrición A en las primeras 24 horas se mantienen valores entre los 1600 mg N/L y los 1200 mg N/L en las nutriciones B y C se consumen el 87,8% y el 86,7% de NFA respectivamente.

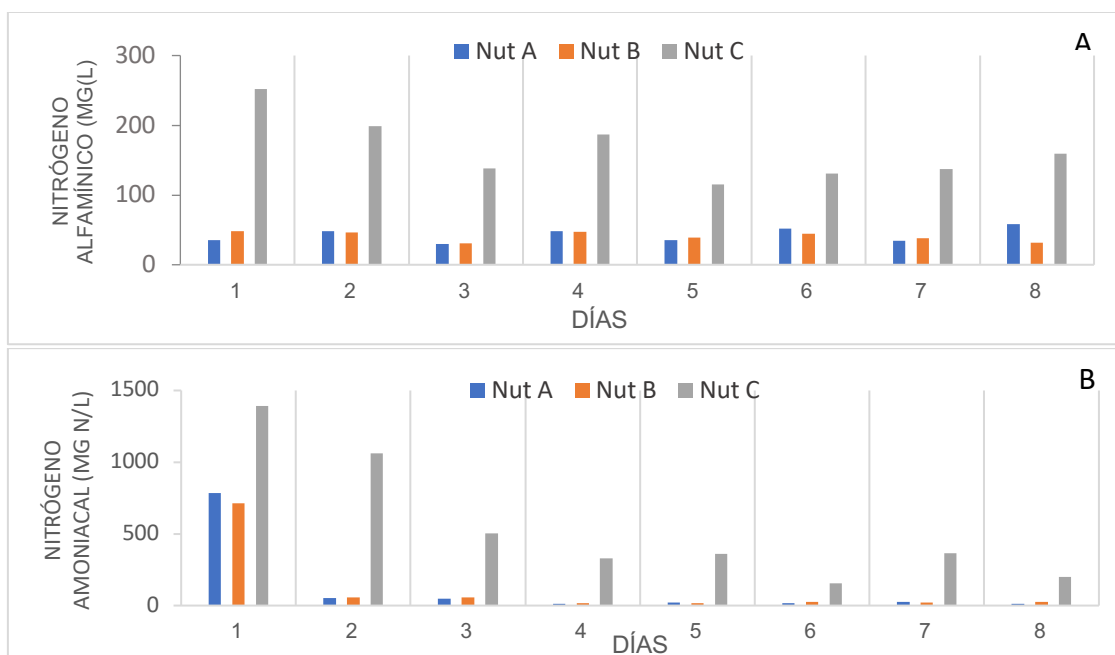


Figura 8: Evolución del consumo en nitrógeno α -amínico (A) y amoniacal (B) según los 3 tipos de nutrición a lo largo del mantenimiento.

La expresión de menor consumo de NFA en el caso de la nutrición A es debido al factor de corrección de NFA por la adición continuada de alimentación y las altas dosis adicionadas en la formación del pie de cuba de la nutrición. Los días sucesivos de tiraje expresados del día 4 al 8 el NFA de la nutrición A se mantiene entre los 300 mg/l y los 500 mg/l variando en función del día por las adiciones escalonadas del Producto D, mientras que en el caso de la nutrición A y B se mantienen en valores continuos aproximadamente 7 veces menores que en el caso de la nutrición C. Estadísticamente existen diferencias significativas entre la nutrición C y la A, así como con la B; y no existen entre la A y B. El porcentaje de nitrógeno orgánico con respecto al total es de promedio en el caso de la nutrición A y B del 54 y 55% y solo del 29% en la nutrición C.

3.2.3. Determinación del grado alcohólico durante la aclimatación y el mantenimiento de los pies de cuba

La adaptación progresiva de las levaduras a un grado alcohólico similar al del vino base es fundamental para asegurar segundas fermentaciones homogéneas (Juroszek et al., 1987). Por ello se estudió la evolución del grado alcohólico de los pies de cuba a lo largo de los días de aclimatación y mantenimiento (Figura 9).

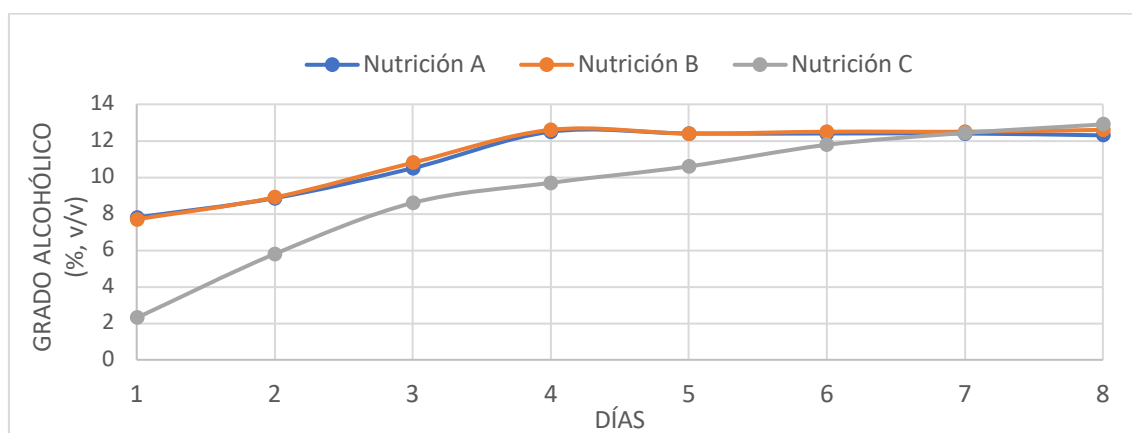


Figura 9: Evolución del grado alcohólico (% v/v) de los pies de cuba. Día 1 a 3 aclimatación, día 4 a 8 mantenimiento.

En los tres casos hay un incremento de grado en las primeras 72 horas por el consumo de azúcar en la fase de aclimatación, sin embargo, a partir del cuarto día, cuando se comienza el tiraje, existen diferencias significativas. El grado alcohólico en la nutrición A se mantiene en torno a los 12,4% y los 12,5% (v/v) en el caso de la nutrición B, con desviaciones de 0,1% (v/v) respecto a la media durante todos los días de tiraje o mantenimiento. Sin embargo, se observa que en el caso de la nutrición C el grado aumenta cada día de manera irregular desde los 9,7% (v/v) el día 1 de tiraje hasta los 12,9% (v/v) el día 5 de tiraje o mantenimiento. Estas variaciones en el grado alcohólico de la nutrición C son debidas a que se hace una adición menor de azúcar en la primera fase de aclimatación y no se realiza factor de dilución de grado, aumentando progresivamente a lo largo de los días.

3.2.4. Determinación de la acidez volátil durante la aclimatación y el mantenimiento de los pies de cuba

El contenido en acidez volátil durante la aclimatación y mantenimiento de los pies de cuba proporciona información sobre el estado del medio y fue medida a lo largo de los 8 días de aclimatación y mantenimiento de los pies de cuba en el caso de las tres nutriciones (Tabla 5).

Se observa una mayor concentración de acidez volátil en el caso de la nutrición A y B ya que en su formación se añade vino en las primeras 24 horas, mientras que en el caso de la nutrición C es menor. Existen diferencias significativas entre la nutrición C y la A y B, no entre la A y B. La nutrición A y B tienen una acidez volátil entre los 0,17 y los 0,20 g de ácido acético por litro a lo largo de los días de mantenimiento, sin embargo, la nutrición C aumenta hasta llegar a los 0,37 g ácido acético/L el último día de tiraje. Estas variaciones pueden ser debidas a la renovación de una parte del volumen de pie de cuba

en el caso de la A y B, mientras que en el caso de la nutrición C un porcentaje volumen de pie de cuba no es renovado diariamente durante los días de mantenimiento.

Tabla 5: Evolución de la acidez volátil en los pies de cuba a lo largo de los días de aclimatación y mantenimiento de las tres nutriciones, expresados en g ácido acético/L. Media de los ocho días, las mayúsculas representan diferencias entre las medias de las nutriciones.

	Aclimatación			Mantenimiento					
	1	2	3	4	5	6	7	8	Media
Nutrición A	0,12	0,14	0,15	0,18	0,18	0,20	0,19	0,17	0,17 ^A
Nutrición B	0,10	0,12	0,15	0,19	0,17	0,19	0,17	0,17	0,16 ^A
Nutrición C	0,05	0,09	0,10	0,15	0,25	0,28	0,34	0,37	0,20 ^B

3.2.5 Determinación de la composición en ácidos grasos de las levaduras durante el mantenimiento de los pies de cuba

Los ácidos grasos pueden ser protectores de las células en las condiciones de estrés por etanol (Ding et al., 2010), en concreto los ácidos grasos insaturados (Ding et al., 2009) como el C16:1 o el C18:1 (Ding et al., 2009; You et al., 2003). Sin embargo, también se comprobó que una concentración mayor de C16 y C18 mejoraba la resistencia de la membrana (Aguilera et al., 2006). Estos ácidos grasos protectores de la membrana adicionados en el mantenimiento son incorporados a la célula aumentando su resistencia al etanol. Los ácidos grasos fueron determinados durante los 8 días de aclimatación y mantenimiento y se obtuvieron las medias (Figura 10).

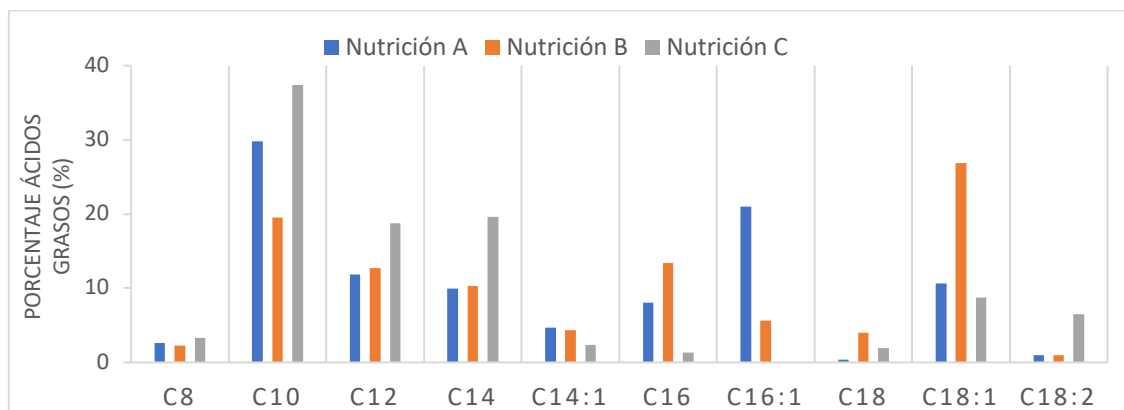


Figura 10: Contenido medio en ácidos grasos de las levaduras durante los ocho días de aclimatación y mantenimiento en la nutrición A, B y C.

Si se observa la Tabla 6, podemos ver la media en contenidos medios de ácidos grasos agrupados en MCFA, SFA, MUFA y C18:2 de los pies de cuba a lo largo de los 8 días de aclimatación y mantenimiento. Las células rehidratadas con el producto A (nutrición A y B) tienen un mayor número de ácidos grasos insaturados del 36,34% y del 36,87% respectivamente, premisa que se cumple según la composición lipídica del producto A al tener un mayor contenido en C16:1 y C18:1. Sin embargo, la nutrición C tiene una mayor cantidad de C18:2, 6,47% presentando diferencias significativas frente a 0,99% y 0,94% de la nutrición A y B respectivamente. Sin embargo, este alto porcentaje puede estar determinado por el bajo porcentaje de otros ácidos grasos con respecto al total de la nutrición C. También observamos un alto contenido en ácidos grasos de cadena media en el caso de la nutrición C del 59,54% con respecto a los 44,24% y los 34,54% de la nutrición A y B respectivamente, existiendo diferencias significativas entre las tres nutriciones. Los ácidos grasos saturados están en concentraciones similares en los tres casos, aunque existen diferencias significativas entre la B y la A y la C. Por todo ello, las células de las nutriciones A y B

tienen una mejor composición lipídica de membrana al poseer mayor porcentaje de MUFA's y una concentración menor del MCFA's, en concreto, el C8 y C10 son tóxicos para las células al tener efecto inhibitorio en el crecimiento (Torija et al., 2003); así como un contenido similar en SFA's.

Tabla 6: Contenidos medios en MCFA, SFA, MUFA y C18:2 de los ocho días de aclimatación y mantenimiento de los pies de cuba para las tres nutriciones. Las mayúsculas muestran diferencias significativas entre nutriciones a $p < 0.05$ según Test LSD de Fisher

	MCFA	SFA	MUFA	C18:2
Nutrición A	44,24 ^A	18,47 ^A	36,34 ^A	0,99 ^A
Nutrición B	34,54 ^B	27,64 ^B	36,87 ^A	0,94 ^A
Nutrición C	59,54 ^C	22,94 ^A	11,07 ^B	6,47 ^B

3.2.6. Determinación de la composición en esteroides de las levaduras durante el la formación y el mantenimiento de los pies de cuba

La presencia de esteroides y su cantidad proporciona información sobre el estado de las membranas y por lo tanto con su capacidad de adaptación a las condiciones estresantes de la segunda fermentación, aumentando su rigidez y por lo tanto su resistencia (Ding et al., 2009). La evolución en los contenidos en esteroides en las tres nutriciones a lo largo de los días está recogida en las Figura A2 del Anexo.

El esteroil mayoritario encontrado en todas las condiciones es el ergosterol, seguido del escualeno y zimosterol (Figura A2). En el caso de la nutrición C el porcentaje de ergosterol fluctúa entre el 44% y el 62% comparado con la nutrición A donde el ergosterol varía entre el 23% y el 41%, en las fases finales y en la nutrición B donde los porcentajes de ergosterol se mantienen constantes entre el 37% y el 45%. Se observa en la condición A y B una disminución progresiva del escualeno y un aumento del ergosterol a partir del cuarto día. Otros intermediarios en la biosíntesis de ergosterol presentan una variabilidad en presencia y porcentaje muy diversas en las diferentes condiciones, el porcentaje de episterol en el caso de la nutrición A y B se mantiene constante mientras que en la Nutrición C solo aparece el día 4 y 5 en bajo porcentaje. Según se muestra en la Figura 11, el escualeno presenta diferencias significativas entre la nutrición C (grupo A) y la A y B (grupo b), el zimosterol presenta diferencias significativas en la nutrición B (grupo A) y la A y C (grupo C) y el lanosterol entre la C (grupo B) y la A y B (grupo A). El ergosterol tiene diferencias significativas en las tres nutriciones.

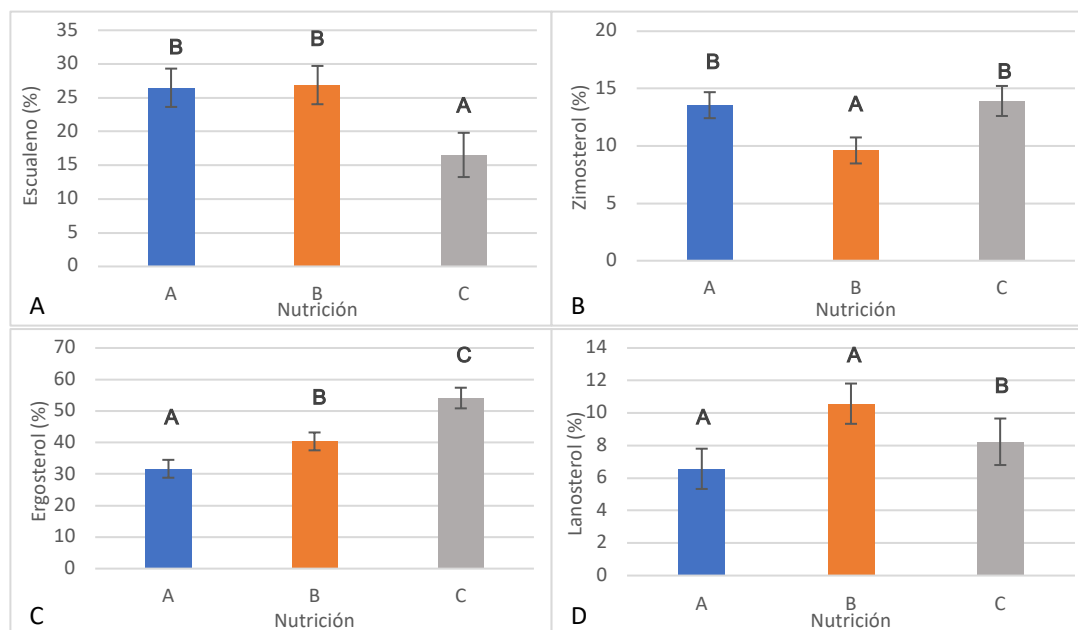


Figura 11: Efecto de la nutrición sobre la composición media en escualeno (A), zimosterol (B), ergosterol (C) y lanosterol (D) de las levaduras a lo largo de los ocho días de aclimatación y mantenimiento de los pies de cuba. Las mayúsculas indican diferencias significativas entre las nutriciones a $p < 0.05$ según Test de Tuckey HSD.

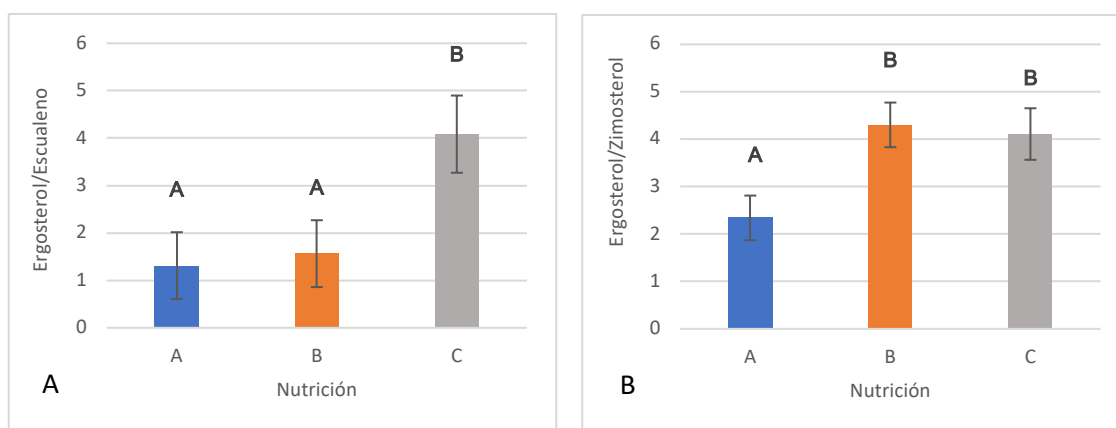


Figura 12: Efecto de la nutrición sobre la relación entre el ergosterol y el escualeno (A), y el ergosterol y el zimosterol (B) de las levaduras utilizando los valores de los ocho días de aclimatación y mantenimiento de los pies de cuba. Las mayúsculas indican diferencias significativas entre las nutriciones a $p < 0.05$ según Test de Tuckey HSD..

La relación ergosterol/escualeno (Tabla A3, Anexo) encuentra su máximo el último día de mantenimiento que indica un alto consumo de escualeno en la biosíntesis de ergosterol, siendo menor en el caso de la nutrición B por menor renovación de volumen y por lo tanto menor oxigenación ya que en la biosíntesis de este compuesto es necesaria la presencia de oxígeno. Sin embargo, globalmente la nutrición A es la que menor relación de biosíntesis ergosterol por escualeno presenta. Se puede observar en la Figura 12 que la relación entre el ergosterol y el escualeno es significativamente más pequeña con las nutriciones A y B que con la nutrición C de media durante los 8 días de aclimatación y mantenimiento de los bioreactores. Este resultado fisiológico como lo ha mencionado Borrull et al. (2016) parece ser positivo cuanto a alcanzar el máximo presión de 6 bares en botella.

La relación de ergosterol/zimosterol (Tabla A4, Anexo) es mayor en el caso de la nutrición B por una menor oxigenación, ya que el zimosterol funciona como esteroide de reserva de ácidos grasos insaturados. Si observamos la Figura 12, se puede observar que la relación ergosterol/zimosterol es similar en el caso de la nutrición B y C, siendo significativamente diferentes a la media en la nutrición A. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los productos de rehidratación y nutrición utilizados en la nutrición C solo se encontró escualeno como esteroide en la composición por lo que se debe tener en cuenta a la hora de estimar las concentraciones finales.

3.2.7. Determinación de la composición en metabolitos no lipídicos de las levaduras durante la aclimatación de los pies de cuba

Los metabolitos intracelulares analizados en los tres primeros días de la aclimatación y multiplicación previas al tiraje muestran diferencias en los tres casos. En el caso de las nutriciones A y B un alto porcentaje de aminoácidos y azúcares se encuentran en el día 1 de la formación del pie de cuba, mientras que en el caso de la nutrición C el contenido en azúcares y aminoácidos es menor, posiblemente influidos por la cantidad de nutrientes añadidos en esta primera fase por medio de los productos enológicos utilizados. El segundo y tercer día es destacable el aumento de ácidos orgánicos como los ácidos láctico, málico, succínico y tartárico provenientes del vino utilizado, así como de glicerol. La presencia de azúcares también se ve afectada por el tipo de nutrición, en el caso de la nutrición C la riqueza de diferentes azúcares es menor que en el caso de la condición A y B. Cabe destacar que estas variaciones entre los azúcares pueden ser debidas a que en el caso de la nutrición C, la adición de vino y licor es paulatina a lo largo de las primeras 74 horas, mientras que la totalidad el volumen formador del pie de cuba en la condición A y B es en las primeras 10 horas.

3.3. Seguimiento de la segunda fermentación en botella

3.3.1. Inicio y días finalización de la segunda fermentación

La segunda fermentación se siguió en el caso de las tres nutriciones por día de tiraje, en un total de 15 condiciones nutrición-día. Estos datos proporcionan información sobre la rapidez de la implantación de la levadura en el vino base y la rapidez en las cinéticas fermentativas. Las medias de los días en los que se realizó el tiraje para cada nutrición se expresan en la Tabla 9 y pueden aportar datos sobre la homogeneidad de las cinéticas en los distintos días por medio de la desviación, expresando que nutrición o nutriciones tiene unas condiciones homogéneas a lo largo de los días de mantenimiento.

Tabla 7: Inicio y finalización (días) de la segunda fermentación en botella de cada uno de los días de tiraje por cada nutrición. Inicio, día de cambio de presión en la botella; Finalización, día en el cual la presión llega a 6 bar. Las letras minúsculas o mayúsculas indican diferencias significativas a $p < 0.05$ según el test LSD de Fisher para el inicio o finalización de la segunda fermentación.

	Días tiraje	1	2	3	4	5	Media	Desviación
Nutrición A	Inicio	2	2	1	2	2	1,80 ^a	0,45
	Días finalización	30	29	31	29	29	29,60 ^A	0,89
Nutrición B	Inicio	1	1	1	2	2	1,40 ^a	0,55
	Días finalización	29	29	29	28	30	29,00 ^A	0,71
Nutrición C	Inicio	3	2	2	3	3	2,60 ^b	0,55
	Días finalización	33	33	30	31	31	31,60 ^B	1,34

La nutrición B a pesar de que tenía menor población viable al inicio de la fermentación, se observa que, de media, considerando los cinco días de tiraje como repetición, tardó 1.4 días para iniciar la segunda fermentación. No obstante no hay diferencias significativas con el efecto de la nutrición A (1.8 días) pero se observó diferencias significativas de ambas con la nutrición C (Tabla 7).

En relación con la fecha de finalización de la segunda fermentación, observamos diferencias significativas entre las nutriciones A y B, y la nutrición C; tenemos 29.6, 29 y 31.6 días de media respectivamente. En conclusión, se puede decir que las nutriciones A y B permiten una disminución del tiempo de segunda fermentación lo que puede representar una ganancia económica importante y una planificación de las segundas fermentación relevante a escala industrial.

3.3.2. Influencia de la presión en la viabilidad celular

El aumento de presión dentro de la botella que se produce en la segunda fermentación es un factor de estrés para las levaduras. Por el estudio de la viabilidad (UFC/mL) en diferentes puntos de presión o fermentación se puede determinar la presión máxima en la botella en la cual la viabilidad celular disminuye. Una vez obtenidas las poblaciones viables en (UFC/ml) a 0, 2, 4 y 6 bares de presión se pueden determinar gráficamente las líneas de tendencia polinómica de grado 2 de la población con respecto a la presión y por derivación obtener la presión en la que comienzan a disminuir las poblaciones viables en una media de los cinco días de tiraje para cada nutrición (Figura A5, Anexo). La condición que supuso una mayor presión para la disminución de la viabilidad fue la nutrición A, en la que disminuye a los 3,41 bar. La nutrición B comenzaba a disminuir a los 3,26 bar de presión y la nutrición C a los 3,15 bar (Tabla 8).

Tabla 8: Presión (bar) máxima alcanzada en botella en la cual la viabilidad celular disminuye en la segunda fermentación para cada uno de los días de tiraje en cada nutrición.

Días Tiraje	1	2	3	4	5	Media
Nutrición A	3,35	3,35	3,35	3,50	3,50	3,41
Nutrición B	3,35	3,30	3,20	3,20	3,30	3,26
Nutrición C	3,10	3,05	3,25	3,20	3,15	3,15

Si se comparan las diferentes nutriciones observamos diferencias significativas entre todas las nutriciones (Figura 13). Las células de la nutrición A por lo tanto estarían mejor adaptadas a las condiciones extremas de la segunda fermentación y presenta mejores capacidades fermentativas bajo condiciones más adversas como bajas temperaturas, que puede mejorar la calidad de la espuma (Cilindre et al., 2021) o concentraciones en SO₂ altos.

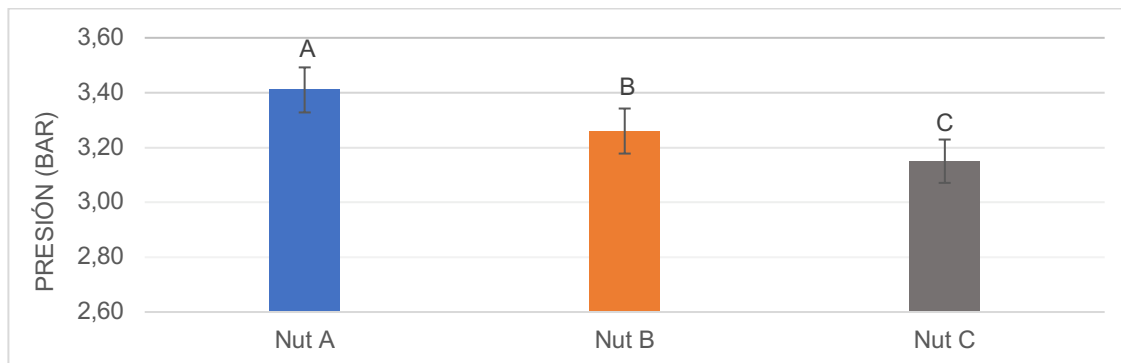


Figura 13: Presión (bar) a partir de la cual empieza a bajar la viabilidad celular en la segunda fermentación en botella de cada uno de los días de tiraje por cada nutrición. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas para cada tipo de nutrición a $p < 0.05$ según Test LSD de Fisher.

3.4. Análisis del producto final

3.4.1 Analíticas fin de la segunda fermentación para las distintas nutriciones en los cinco días de tiraje

El resultado final en azúcar, pH, acidez total, acidez volátil y grado alcohólico de la segunda fermentación para cada día de tiraje o mantenimiento por cada nutrición se ha analizado (Tabla A6, Anexo). Las analíticas de fin de segunda fermentación no muestran diferencias significativas entre los días de la misma nutrición y entre nutriciones en el caso del rendimiento en alcohol, pH y acidez. Se observa un incremento mayor en la concentración de ácido acético en la nutrición C, sin embargo no es significativo pero puede poner el foco en próximas fermentaciones por una posible contaminación por bacterias acéticas en el pie de cuba (Tabla 9).

Tabla 9: Medias de analíticas finales de segunda fermentación de los cinco días de tiraje para cada nutrición. Las letras mayúsculas NS indican que no existen diferencias significativas para cada tipo de nutrición a $p < 0.05$ según Test LSD de Fisher.

	Azúcar residual (g/L)	pH	Acidez total (g ácido tartárico/L)	Grado alcohólico (% v/v)	Ácido acético (g ácido acético/L)
Nutrición A	1,16 ^{NS}	3,19 ^{NS}	5,40 ^{NS}	11,40 ^{NS}	0,24 ^{NS}
Nutrición B	1,20 ^{NS}	3,20 ^{NS}	5,40 ^{NS}	11,39 ^{NS}	0,25 ^{NS}
Nutrición C	1,20 ^{NS}	3,18 ^{NS}	5,41 ^{NS}	11,42 ^{NS}	0,28 ^{NS}

3.4.2 Calidad de la Espuma (MOSALUX)

La calidad de la espuma en el cava mejora su percepción visual y gustativa (Vanrell et al., 2002) y mejora con la crianza por la autólisis de levaduras que liberan proteínas, polisacáridos y manoproteínas que mejoran su estabilidad y por lo tanto su calidad (Esteruelas et al., 2015). Las muestras para realizar las medidas de calidad de la espuma se tomaron a los tres meses del tiraje, cuando ya se había realizado la segunda fermentación por completo.

Se realizó la medida de calidad de la espuma en el caso de la nutrición A y C, al ser las más diferentes en los parámetros de formación, aclimatación y mantenimiento de los pies de cuba. Para ello se obtuvieron muestras a los tres meses de embotellado donde ya había finalizado la segunda fermentación.

Se midió altura máxima de espuma (HM) y altura constante (HC) de los cinco días de tiraje de cada una de ellas y se obtuvo la media y la desviación típica por cada nutrición (Tabla 10).

Tabla 10: Altura Máxima (HM) y Altura constante (HC) en la segunda fermentación en botella de cada uno de los días de tiraje por cada nutrición. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas para cada tipo de nutrición a $p < 0.05$ según Test LSD de Fisher. NS, no significativo.

		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	MEDIA	DESVIACIÓN
Nutrición A	HM	127	127	127	132	128	128 ^A	2,87
	HC	46	41	42	47	47	44 ^{NS}	3,20
Nutrición C	HM	110	113	127	129	104	118 ^B	10,84
	HC	42	43	45	45	44	44 ^{NS}	1,40

Los resultados muestran diferencias significativas entre la altura máxima en los dos tipos de nutrición, sin embargo, poseen la misma media en la altura constante de 44 mm. En el caso de la Nutrición A no se aprecian diferencias significativas entre los días de tiraje con un intervalo de confianza del 95% para la altura máxima, siendo de media 128 mm, para la altura constante (HC) si se aprecia una diferencia significativa entre el día 2 y el 4 y 5. La nutrición C presenta diferencias significativas, en las que el día 3 y 4 se obtuvieron mayores medias en HM aproximadamente de 128 mm, sin embargo la altura constante no presentó diferencias significativas entre los diferentes días de tiraje.

3.4.3. Análisis sensorial

La calidad del producto final puede ser en parte determinada por el análisis sensorial. Los factores principales determinantes en las cualidades sensoriales del cava son el vino base, la levadura y la crianza (Bosch-Fusté et al., 2007).

Para la comparativa de los productos finales se organizaron dos catas comparando, en un primer lugar, la nutrición A vs la C y en segundo lugar la A vs B (Tabla A7, Anexo). Las muestras se tomaron a los tres meses del tiraje, cuando ya se había realizado la segunda fermentación por completo. De esta manera se pudo determinar si existían diferencias significativas entre los tipos de nutrición A y B versus el C ya que su formación y mantenimiento diferían en gran medida.

Los resultados muestran que el porcentaje de aciertos en la determinación de la muestra diferente eran muy bajos, 32,5% en el caso de la cata 1 (nutrición A y C) y 47,5% (nutrición B y C), (Tabla A8, Anexo) esto nos indica que no existen diferencias apreciables y cuantificables en la calidad sensorial de los cavas obtenidos en las distintas nutriciones al calcular el p value, en el que en todos los casos era mayor de 0,05. Esto concuerda con la premisa de que los factores que en mayor medida determinan la calidad no se han visto modificados, ya que se trataba del mismo vino base, la misma levadura y crianza. También se observó que las nutriciones preferidas fueron la A en la primera cata y la B en la segunda, sin embargo, no son tampoco resultados determinantes al no haber un porcentaje alto de aciertos en la diferenciación entre nutriciones.

4. Conclusiones

- Todos los productos enológicos utilizados poseen una composición diferente en NFA, ácidos grasos y esteroides totales.
- Las levaduras rehidratadas con el producto A tendrán una menor cinética de crecimiento al inicio que las rehidratadas con el producto C por su menor contenido en NFA. Además, poseerán mayor cantidad de ácidos insaturados (MUFA y C18:2) que las rehidratadas con el producto C. Por último, las células rehidratadas con el producto A disponen de un alto porcentaje de esteroides, tanto ergosterol como intermediarios en su formación (escualeno, zosterol, etc) que las células rehidratadas con el producto C, que necesitarán una mayor oxigenación para producir ergosterol e incluirlo en sus membranas al disponer solo de escualeno como esteroide en el producto. Las células rehidratadas con el producto A dispondrán además de un alto número de aminoácidos, menor contenido en ácidos orgánicos y no presencia de aminas biógenas.
- Las células mantenidas con el producto B dispondrán de un mayor contenido relativo de nitrógeno amoniacal que las mantenidas con el producto D. Sin embargo, tendrán un aporte similar en ácidos grasos (alto contenido en MUFA). Además, las células mantenidas con el producto B dispondrán de un alto contenido en ergosterol y de un mayor número de intermediarios en la formación de ergosterol que las células mantenidas con el producto D en el que solo se encuentra escualeno y lanosterol. Por otro lado, las células mantenidas con el producto D dispondrán de un mayor número de aminoácidos que las células con el producto B y presencia de aminas biógenas.
- En cuanto a la evolución de los pies de cuba, las poblaciones en el caso de la nutrición C fueron de media 2,5 veces más altas, esto puede ser debido a la no renovación de volumen formador, el menor contenido en etanol en los primeros días y el alto contenido en nitrógeno del pie de cuba. Sin embargo, presentó un peor perfil en ácidos grasos y esteroides.
- Todas las nutriciones a lo largo de los 5 días de tiraje consiguieron finalizar la fermentación en menos de 33 días e iniciaron la fermentación en los primeros 3 días, siendo la nutrición B la que inició la fermentación antes y la finalizó en menor tiempo.
- Se observó una mejor viabilidad al incremento de la presión en la nutrición A y una menor en el caso de la nutrición C.
- La calidad del producto final (composición química y características organolépticas) no se ha visto influida por el tipo de nutrición, aunque si se han visto diferencias en la altura máxima de espuma entre la nutrición A y C.

5. Perspectivas futuras

- Análisis estadístico de la evolución en los contenidos en azúcar, pH y acidez total de los biorreactores y la segunda fermentación.
- Análisis estadístico de la evolución por días del contenido en esteroides y ácidos grasos de las células de los pies de cuba.
- Estudio de diferentes lotes de los productos donde se han encontrado aminas biógenas.
- Estudio de la formación de metabolitos secundarios de la segunda fermentación para cada tipo de nutrición.
- Estudio de la capacidad de floculación en las tres nutriciones.
- Medición de la calidad de espuma transcurridos 7 meses.
- Análisis sensorial del producto final transcurridos 7 meses con análisis de descriptores organolépticos.
- Análisis comparativo del impacto económico del uso de cada nutrición.
- Repetición del experimento en condiciones más desfavorables para la levadura, menor temperatura de fermentación, pH y/o mayor cantidad de SO₂.

6. Agradecimientos

Quisiera dar las gracias en primer lugar a Laura Tragant por confiar en mí para realizar este proyecto, a todo el equipo del celler y al departamento de enología de Codorniu, a Francesc Vendrell y en especial a Joan González. También a Joan Miquel por darme la oportunidad de trabajar en el equipo y a Nicolas Rozès por la paciencia, las horas y los ánimos. Gracias a Candela Ruiz por la ayuda y a Fernando Zamora por la posibilidad de disponer del equipo Mosalux. Pero sobre todo gracias a mi familia y amigos.

7. Bibliografia

- Aguilera, F., Peinado, R. A., Millán, C., Ortega, J. M., Mauricio, J. C. (2006). Relationship between ethanol tolerance, H^+ -ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int. J Food Microbiol*, 110, 34-42.
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 996–1002.
- Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J., Mas, A., Rozès, N. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 169-177.
- Bisson, L. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 107-119.
- BOE-A-1986-5257. Resolución del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para la denominación de vinos espumosos “Cava”.
- Borrull, A., Poblet, M., Rozès, N. (2015). New insights into the capacity of commercial wine yeast to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection. *Food Microbiology*, 48, 41–48.
- Bosch-Fusté, J., Riu-Aumatell, M., M.Guadayol, J., López-Tamames, E., Buxaderas, S. (2007). Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. *Food Chemistry*, 105 : 428-435.
- Cilindre C., Henrion C., Coquard L., Poty B., Barbier J., Robillard B., Liger-Belair G. (2021). Does the Temperature of the prise de mousse Affect the Effervescence and the Foam of Sparkling Wines?. *Molecules*, 26, 4434.
- Daum, G., Lees, N., Martin, B., & Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14, 1471-1510.
- Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, L., Yang, D., Zhang, K. (2009). Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiology Biotechnology*, 85, 253-263.
- Ding, M. Z., Li, B. Z., Cheng, J. S., Yuan, Y. J. (2010). Metabolome analysis of differential responses of diploid and haploid yeast to ethanol stress. *OMICS* 14, 553-561.
- 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 Science Food Agriculture*, 95, 2071–2080.
- Garofalo, C., Pia, M., Laddomada, B., Cappello, S., Berbegal, C., Spano, G., Capozzi, V. (2016). Starter cultures for sparkling wines. *Fermentation*, 2, 21.
- Juroszek, J., Feuillat, M., Charpentier, C. (1987). Effect of the Champagne method of starter preparation on ethanol tolerance of yeast. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 194-198.
- Kemp, B., Condé, B., Jégou, S., Howell, K., Vasserot, Y., Marchal, R. (2019). Chemical compounds and mechanisms involved in the formation and stabilization of foam in sparkling wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 2072–2094.

- Laurent, M., Valade, M. (2007). La préparation du levain de tirage à partir de levures sèches actives. *Le Vigneron Champenoise*, 128, 74–95.
- Liger-Belair, G. (2017). Effervescence in champagne and sparkling wines: From grape harvest to bubble rise. *The European Physical Journal Special Topics*, 226, 3–116.
- Martí-Raga, M., Sancho, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Beltran, G. (2015) The effect of nitrogen addition on the fermentative performance during sparkling wine production. *Food Research International*, 67, 126–135.
- Maujean, A., Poinssaut, H., Dantan, H., Brissonnet, F., Cossiez, E. (1990). Study of the performance and quality of the foam in sparkling wines. II perfecting of measuring technique for foaming ability, performance and stability of the foam in sparkling wines. *Bulletin Office Internationale de La Vigne et Du Vin*, 711–712, 405–426.
- Parks, L.W. (1978). Metabolism of sterols in yeast. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 6, 301–341.
- PLIEGO DE CONDICIONES DENOMINACIÓN DE ORIGEN PROTEGIDA “CAVA” Resolución de 10 de junio de 2021 de la DGIA, BOE de 15 de junio de 2021.
- Porras-Agüera, J.A., Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J., Mauricio, J.C. (2021). Impact of CO₂ overpressure on yeast mitochondrial associated proteome during the “prise de mousse” of sparkling wine production, *International Journal of Food Microbiology*, 348, 109226.
- Pozo-Bayón, M.A., Hernández, M.T., Martín-Alvarez, P.J., Polo, M.C. (2003). Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2089–2095.
- Quail, M.A., Kelly, S.L. (1996). The extraction and analysis of sterol from yeast. *Methods in Molecular Biology*, 53, 123–131.
- Rodriguez-Porrata B., Novo M., Guillamón J., Rozès N., Mas A., Cordero-Otero R. (2008). Vitality enhancement of the rehydrated active dry wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 11–122.
- Ruiz de Villa Sardón, C. (2019). Lipidomic and metabolomic tolols from colony forming units of wine microorganisms on agar plates. Màster en Begudes Fermentades, Facultat dEnologia, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Espanya.
- Soubeyrand V., Luparia V., Williams P., Doco T., Vernhet A., Ortiz-Julien A., Salmon J.M. (2005). Formation of micella containing solubilized sterols during rehydration of active dry yeast improves their fermenting capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 8025–8032.
- Tay, S. L., Daran-Lapujade, P., Walsh, M. C., Pronk, J. T., Daran, J. (2007). Acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature: A chemostat-based transcriptome analysis. *Molecular Biology Cell*, 18, 5100–5112.
- Torija, M., Beltran, G., Novo, P., Poblet, M., Guillamón, J., Mas, A., Rozès, N. (2003). Effect of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 127–136.
- Vanrell, G., Esteruelas, M., Canals, J.M., Zamora, F., Poinssaut, P., Sieczkowski, N., Leboeuf, (2005). Studies on compounds which influence the foam of Cava. *Rev. Oenol.*, 114, 28–30.
- Weber M.H., Klein W., Muller L., Niess U.M., Marahiel M.A. (2001). Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Molecular Microbiology*, 39, 1321–1329.

Yazawa H., Iwahashi H., Kamisaka Y., Kimura K., Uemura H. (2009). Production of polyunsaturated fatty acids in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relation to alkaline pH tolerance. *Yeast* 26, 167-184.

You, K. M., Rosenfield, C. L., Knipple, D. C. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1499–1503.

Anexos: Tablas y figuras.

Tabla A1: Evolución poblaciones totales (cél/mL) en los pies de cuba.

	Aclimatación			Tiraje					Media	Des. típica
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8		
Nutrición A	7,90E+07	1,24E+08	7,30E+07	7,10E+07	8,50E+07	1,23E+08	1,17E+08	1,47E+08	1,09E+08	3,05E+07
Nutrición B	6,20E+07	1,54E+08	1,47E+08	1,16E+08	1,00E+08	1,02E+08	1,04E+08	1,29E+08	1,10E+08	1,22E+07
Nutrición C	2,09E+08	1,74E+08	3,76E+08	3,10E+08	2,68E+08	3,33E+08	2,12E+08	2,36E+08	2,72E+08	5,02E+07

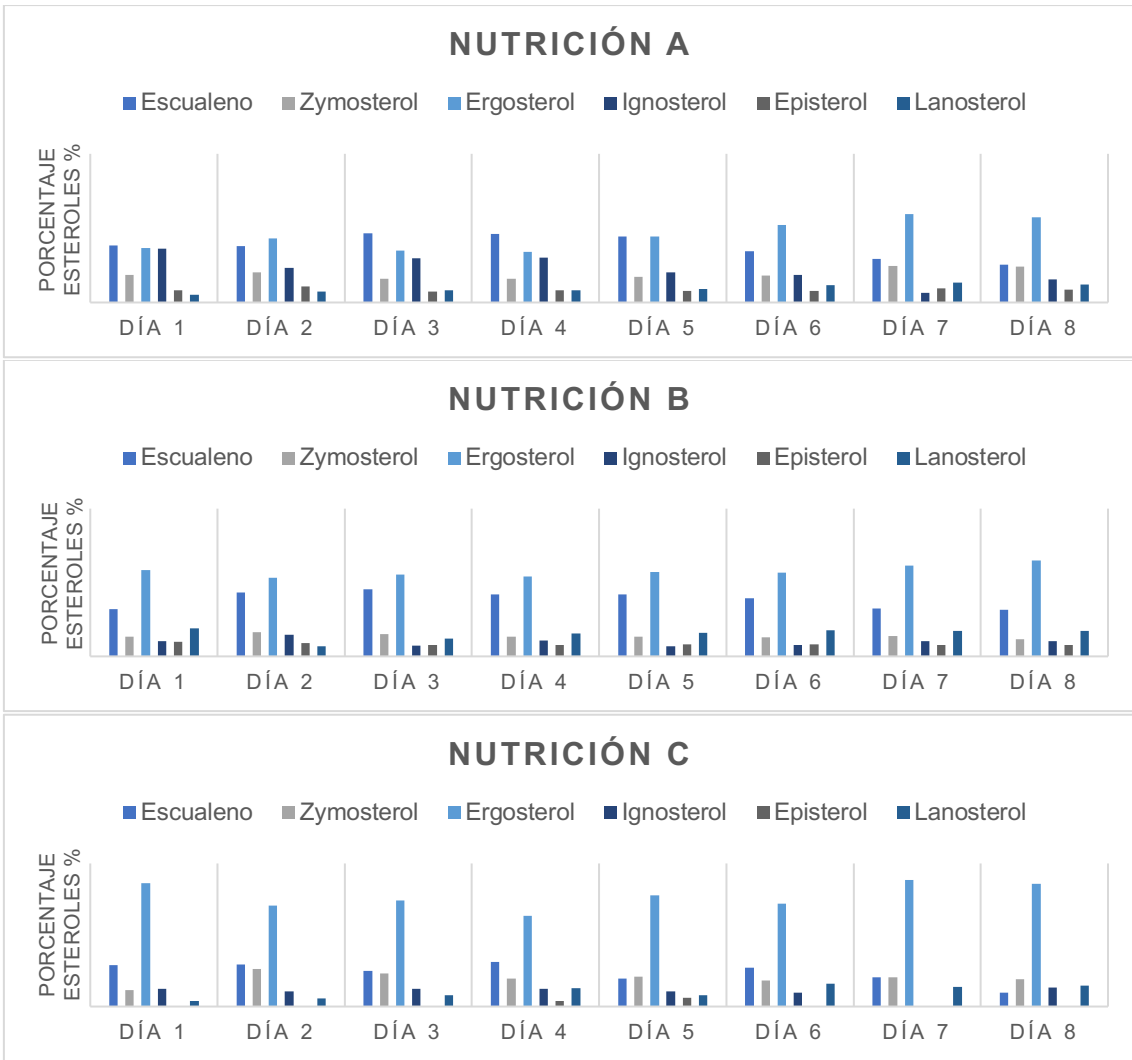


Figura A2: Evolución del contenido en esteroides de las tres nutriciones A, B y C a lo largo de los ocho días de aclimatación y mantenimiento de los pies de cuba.

Tabla A3: Relación ergosterol/escualeno de los ocho días de aclimatación y mantenimiento de los pies de cuba de las tres nutriciones.

	Aclimatación			Mantenimiento				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
Nutrición A	0,96	1,14	0,75	0,74	0,99	1,51	2,02	2,26
Nutrición B	1,84	1,23	1,23	1,29	1,37	1,45	1,90	2,05
Nutrición C	3,00	2,39	2,97	2,04	3,98	2,63	4,39	8,86

Tabla A4: Relación ergosterol/zimosterol de los ocho días de aclimatación y mantenimiento de los pies de cuba de las tres nutriciones.

	Aclimatación			Mantenimiento				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
Nutrición A	1,97	2,13	2,18	2,12	2,59	2,89	2,41	2,37
Nutrición B	4,36	3,27	3,66	4,11	4,22	4,34	4,44	5,69
Nutrición C	7,49	2,67	3,23	3,27	3,75	3,94	4,33	4,47

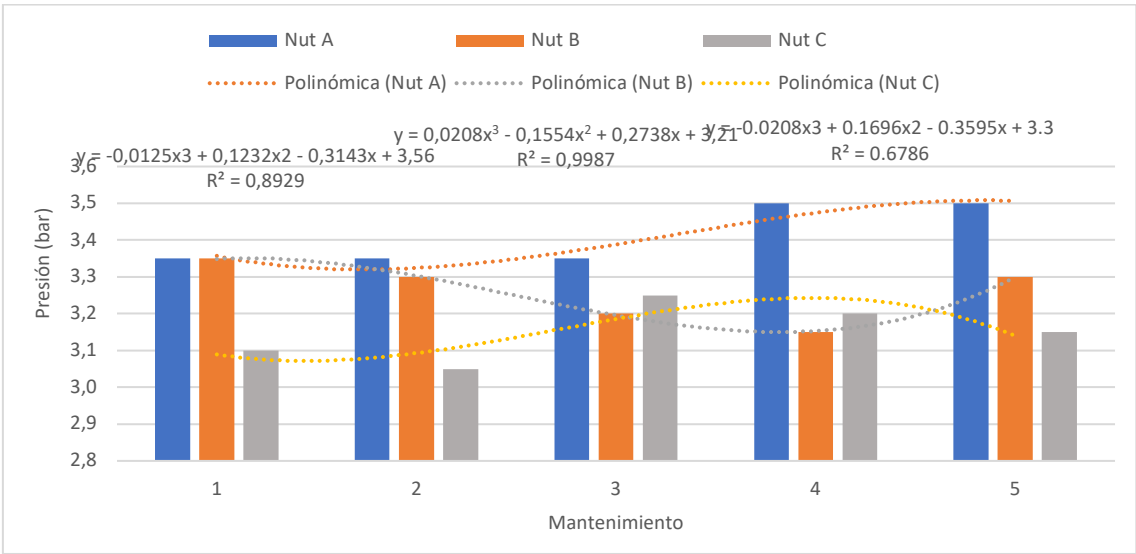


Figura A5: Cálculo de las rectas polinómicas de grado 2 de la población a diferentes presiones para obtener su derivación una recta para el cálculo de la presión máxima en la que comienza a disminuir la viabilidad para cada tipo de nutrición.

Tabla A6: Analíticas finales en la segunda fermentación en botella de cada uno de los días de tiraje por cada nutrición.

		Azúcar residual (g/L)	pH	Acidez total (g ácido tartárico/L)	Grado alcohólico (% v/v)	Ácido acético (g ácido acético/L)
Nutrición A	Día 1	1,2	3,20	5,38	11,43	0,23
	Día 2	1,2	3,18	5,42	11,39	0,25
	Día 3	1,2	3,19	5,39	11,41	0,23
	Día 4	1,1	3,19	5,39	11,42	0,23
	Día 5	1,1	3,19	5,43	11,36	0,25
Nutrición A	Media	1,16	3,19	5,40	11,40	0,24
Nutrición B	Día 1	1,3	3,21	5,38	11,38	0,25
	Día 2	1,3	3,19	5,40	11,37	0,24
	Día 3	1,2	3,20	5,42	11,39	0,26
	Día 4	1,1	3,20	5,42	11,41	0,24
	Día 5	1,1	3,20	5,42	11,40	0,25
Nutrición B	Media	1,20	3,20	5,40	11,39	0,25
Nutrición C	Día 1	1,3	3,18	5,47	11,40	0,31
	Día 2	1,3	3,19	5,39	11,45	0,28
	Día 3	1,1	3,18	5,38	11,37	0,27
	Día 4	1,2	3,18	5,40	11,43	0,25
	Día 5	1,1	3,19	5,41	11,43	0,27
Nutrición C	Media	1,2	3,18	5,41	11,42	0,28

Tabla A7: Resultados del análisis sensorial (catas triangulares) en el que se identifican si se han detectado diferencias y cual. También el número total de identificaciones por copa y el porcentaje de acierto con el p value.

	Nutrición A vs C					Nutrición B vs C				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Juez 1	a	b	a	a	b	a	c	b	b	b
Juez 2	a	a	b	a	c	a	c	c	b	a
Juez 3	c	b	b	a	c	c	b	b	b	b
Juez 4	b	a	c	a	c	a	b	c	c	c
Juez 5	c	a	c	b	b	a	a	c	a	c
Juez 6	a	c	a	c	b	b	c	c	c	c
Juez 7	b	c	c	c	b	b	a	c	c	c
Juez 8	c	a	a	b	c	b	a	c	b	b
A	3	4	3	4	0	4	3	0	1	1
B	2	2	2	2	4	3	2	3	4	2
C	3	2	3	2	4	1	3	5	3	4
Muestra diferente	b	c	a	c	b	b	a	c	b	c
Porcentaje acierto	25	25	37,5	25	50	37,5	37,5	62,5	50	50
p < 0,05	0,821	0,821	0,548	0,821	0,275	0,548	0,548	0,104	0,275	0,275

Tabla A8: Tabla de preferencia por copas identificando que el tipo de nutrición preferida.

	Nutrición A vs C					Nutrición B vs C				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Juez 1	b	b	a	a	c	a	a	a	a	b
Juez 2	a	b	b	b	c	c	a	b	b	a
Juez 3	a	b	a	a	c	c	b	a	a	c
Juez 4	b	a	c	a	c	a	c	c	c	a
Juez 5	a	a	a	a	c	b	b	a	b	c
Juez 6	a	a	a	a	a	b	a	a	c	a
Juez 7	a	c	c	c	b	a	b	c	b	b
Juez 8	c	a	a	b	c	a	a	c	b	a
A	5	4	5	5	1	4	4	4	2	4
B	2	3	1	2	1	2	3	1	4	2
C	1	1	2	1	6	2	1	3	2	2
Preferencia	a	a	a	a	c	a	a	a	b	a
Tipo nutrición	Nut C	Nut A	Nut A	Nut A	Nut C	Nut B	Nut B	Nut B	Nut C	Nut C