



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Enología

**Efecto del uso de β -glucanasas y derivados
de levaduras en la calidad del vino espumoso
verdejo de larga crianza.**

Alumno: Raúl Sandoval Manzano

Tutor: Jose Manuel Rodríguez Nogales
Cotutoras: Encarnación Fernández Fernández
Josefina Vila Crespo

Julio de 2015



Copia para el tutor/a

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	3
2.	INTRODUCCIÓN.....	3
2.1.	Elaboración de vino espumoso.....	3
2.2.	Autólisis de las levaduras.....	6
2.3.	β -glucanasas.....	7
2.4.	Preparados comerciales a base de levaduras inactivas.....	8
2.4.1.	Cortezas de levaduras.....	9
2.4.2.	Autolisados de levaduras.....	9
3.	OBJETIVOS.....	10
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
4.1.	Elaboración de los vinos.....	10
4.2.	Procedimientos analíticos.....	10
4.3.	Análisis sensorial.....	11
4.4.	Tratamiento estadístico de los datos.....	12
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
5.1.	Efectos sobre los parámetros clásicos.....	12
5.2.	Efectos en el contenido de polisacáridos.....	14
5.3.	Efectos sobre las proteínas solubles y el nitrógeno fácilmente asimilable.....	16
5.4.	Efectos sobre los polifenoles.....	18
5.5.	Efectos sobre las características sensoriales.....	20
6.	CONCLUSIONES.....	24
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	25

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1	Elaboración del vino espumoso mediante el método tradicional.....	4
Fig. 2	Esquema de la composición de la pared celular de las levaduras.....	6
Tabla 1	Parámetros enológicos clásicos de cada tipo de tratamiento.....	13
Fig. 3	Contenido en polisacáridos totales y neutros en cada vino.....	14
Fig. 4	Contenido en polisacáridos ácidos en cada vino.....	16
Fig. 5	Contenido en proteínas solubles y nitrógeno fácilmente asimilable..	17
Fig. 6	Absorbancias de intensidad de color, índice de polifenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles.....	19
Fig. 7	Mapa de preferencia interno de la prueba de aceptabilidad.....	21
Fig. 8	Diagrama de componentes principales del análisis sensorial descriptivo.....	22
Fig. 9	Representación de las muestras de vino del análisis factorial múltiple.....	22
Fig. 10	Diagrama de componentes principales de análisis físico-químicos y de las características sensoriales.....	23

1. RESUMEN.

El presente estudio se ha realizado con el fin de comprobar la efectividad de diversos tratamientos enológicos en vinos espumosos de larga crianza de la variedad Verdejo.

Se elaboraron 4 tipos de vinos espumosos partiendo del mismo vino base y un licor de tiraje. Los tratamientos fueron un vino con cortezas de levaduras secas inactivas, otro con un producto a base de autolisados de levaduras y otro con β -glucanasas. Además se incluyó un vino espumoso sin coadyuvantes (vino control). Los coadyuvantes se añadieron a la dosis máxima recomendada por el fabricante en el licor de tiraje

Los vinos se sometieron a una segunda fermentación en botella y un periodo de crianza durante 22 meses. Pasado este tiempo se procedió a realizar un análisis físico-químico y sensorial.

Los tres tratamientos con coadyuvantes mejoraron las características de crianza de los vinos elaborados. La adición de cortezas y autolisados potenció la percepción de aromas frutales y florales, y el empleo de β -glucanasas mejoró la sensación de volumen en boca y suavizó el impacto del carbónico en la misma.

2. INTRODUCCIÓN.

El origen del vino espumoso se remonta hacia 1660, cuando los vinos franceses se comenzaron a embotellar un poco antes de terminar la fermentación alcohólica. El resultado era vinos pálidos, de baja graduación y con presencia de burbujas, muy populares en las cortes francesas e inglesas de la época. Esta efervescencia fue una fuente de problemas, ya que las botellas estallaban y los tapones saltaban. Fue en 1670 cuando el monje dom Pierre Pérignon, de la abadía benedictina de Hautvillers, estableció la forma de producción e introdujo cambios como la selección de uva y viñedo, la sujección del corcho por una grapa metálica y el empleo de botellas de vidrio más grueso (Segarra, 2003).

2.1. Elaboración del vino espumoso.

La elaboración de vinos espumosos mediante el método tradicional es un proceso largo que sigue varias etapas. La mayoría de ellas requieren mucho tiempo y una mano de obra cualificada y cara. En la figura 1 se muestra un esquema de todos los procesos de elaboración de un vino espumoso.

La producción de un vino espumoso de calidad por el método tradicional comienza con la elaboración de un vino tranquilo que se denomina "vino base". La elaboración

del vino base empieza con una vendimia cuidadosa de una uva con una madurez adecuada, que tenga una buena acidez sin demasiado grado alcohólico probable, ya que la segunda fermentación va a aumentar el grado alcohólico total del vino. Esta uva se somete a un sulfitado y prensado muy cuidadosos. El mosto obtenido sufre una fermentación alcohólica a temperatura controlada. Si el vino tiene una acidez elevada, se puede someter al vino base a una fermentación maloláctica. Si así se desea, se puede realizar el coupage de diversos vinos. Una vez obtenido el vino seco acabado se suele someter a una estabilización tartárica, ya que precipitarán cristales de tartrato al aumentar el grado alcohólico en la segunda fermentación, ocasionando problemas en el degüelle (Blouin & Peynaud, 2006). Se comprueba que el vino base acabado tenga un nivel de nitrógeno fácilmente asimilable adecuado, en caso contrario se deben añadir nutrientes nitrogenados con el licor de tiraje.

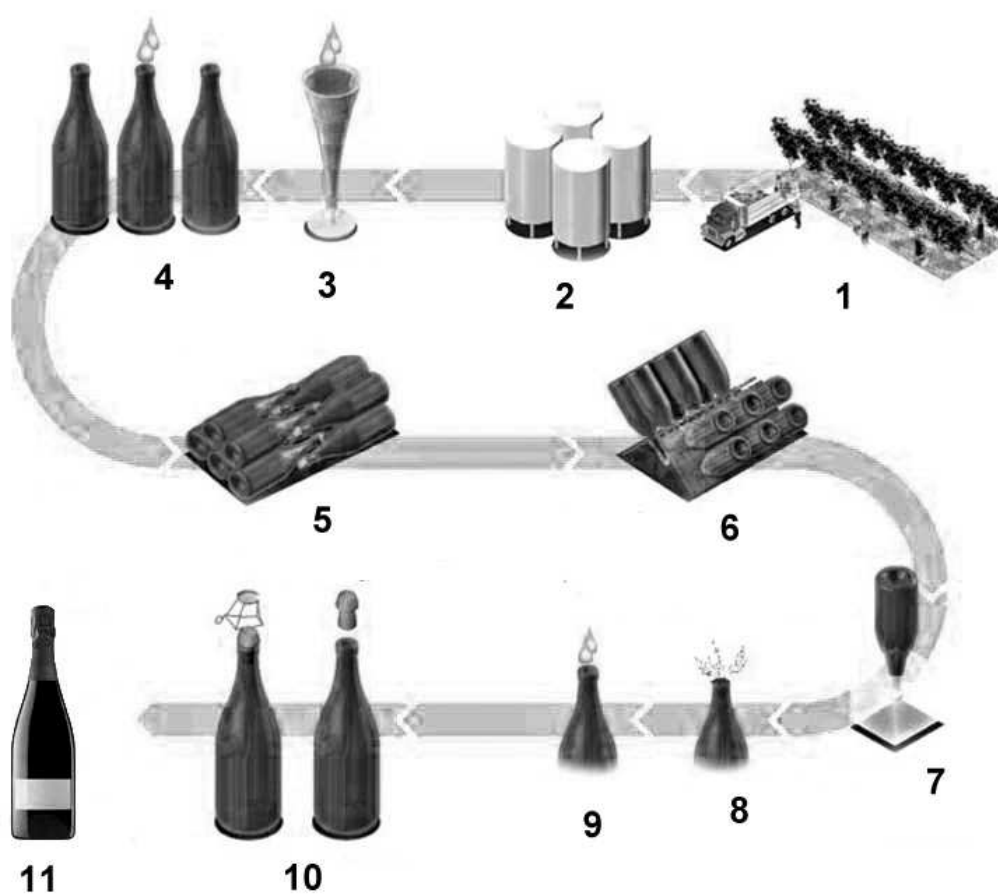


Figura 1: Elaboración del vino espumoso mediante el método tradicional. 1: Vendimia y procesamiento de la uva. 2: Elaboración del vino base. 3: Realización del coupage. 4: Adición del licor de tiraje y llenado de botellas. 5: Segunda fermentación y puesta en rima. 6: Removido y puesta en punta. 7: Congelación del cuello y las lías. 8: Degüelle. 9: Adición de vino y/o licor de expedición. 10: Encorchado. 11: Encapsulado y etiquetado (Hidalgo, 2011).

Una vez elaborado el vino base, se le añade el licor de tiraje. Este licor contiene azúcar, levaduras y aditivos de fermentación y clarificación. La concentración de azúcares suele alcanzar unos 24 g/l en el vino listo para la segunda fermentación. Se introduce la mezcla en las botellas donde se va a llevar a cabo la segunda fermentación durante unas cuantas semanas a temperatura baja. Se forma entorno a 1,3% vol. y 12 g/l de CO₂ que producen una presión de 6 a 8 bar. El vino es, a continuación, conservado “en rima”, con las botellas dispuestas horizontalmente durante varios meses en los que se enriquece en compuestos aromáticos y sápidos procedentes de la degradación de las levaduras inactivas. Esta estancia sobre lías puede durar años y es muy importante para la calidad final del vino, para la finura y para la estabilidad de las burbujas (Hidalgo, 2011).

A continuación se realiza el “removido”, que hace que se junten las lías de fermentación en el cuello en inclinaciones progresivas hasta que la botella llega a ponerse vertical o “puesta en punta”. Tradicionalmente es un proceso totalmente manual y que requiere mucho tiempo aunque cada vez está más mecanizado y se realiza más rápido.

Después se elimina el depósito de lías reunido en el cuello. Este proceso se suele hacer congelando una parte del cuello, liberando las lías congeladas gracias a la presión interior al descorchar la botella y no saliendo apenas vino. Tradicionalmente se realiza esta operación sin congelar el cuello. El líquido que se pierde se puede llenar con el mismo vino procedente de otra botella, o con un “licor de expedición” para ajustar el azúcar del vino final y darle alguna característica organoléptica adicional. (Blouin et al., 2006). Por último se vuelve a tapar la botella, se pone un bozal de alambre, se encapsula y se etiqueta la botella.

En la calidad de los vinos espumosos hay varios factores implicados como la viticultura, la técnica enológica o el tiempo de crianza. La variedad empleada es un factor clave (Pozo-Bayón, Martínez-Rodríguez, Pueyo & Moreno-Arribas, 2009a). En el caso de la variedad Verdejo, originaria de la zona de Rueda (Valladolid, Castilla y León), se ha comprobado que es una variedad que aporta un muy buen perfil organoléptico al vino espumoso y es una variedad muy prometedora a la hora de elaborar vino espumoso de alta calidad (Martínez-Lapiente, Guadalupe, Ayestarán, Ortega-Heras & Pérez-Magariño, 2013). En vinos jóvenes tranquilos, la variedad Verdejo tiene una buena intensidad aromática y presenta aromas de la serie de afrutados, dulces, florales y vegetales (Sánchez-Palomo, Gómez García-Carpintero, Alonso-Villegas & González-Viñas, 2010).

2.2. Autólisis de las levaduras.

La pared celular de *Saccharomyces* está compuesta de manoproteínas (polisacáridos de alto peso molecular conjugados con proteínas) formando una red junto con fibras de glucanos y quitina (Pretorius, 2000) (figura 2). En su ruptura, durante el proceso de autólisis que tiene lugar después de la muerte celular, está involucrada la acción de las β -glucanasas que hidrolizan el enlace β -O-glucosídico de las cadenas de β -glucano, dando lugar a la liberación de glucosa y oligosacáridos (Dubourdieu, Villetaz, Desplanques & Ribéreau-Gayon, 1981). Como consecuencia de la ruptura de la pared celular varios compuestos citoplasmáticos y parietales se liberan en el vino espumoso, que pueden modificar sus propiedades organolépticas y espumantes con efectos positivos sobre las características del producto (Alexandre & Guilloux Benatier, 2006; Pozo-Bayón *et al.*, 2009a).

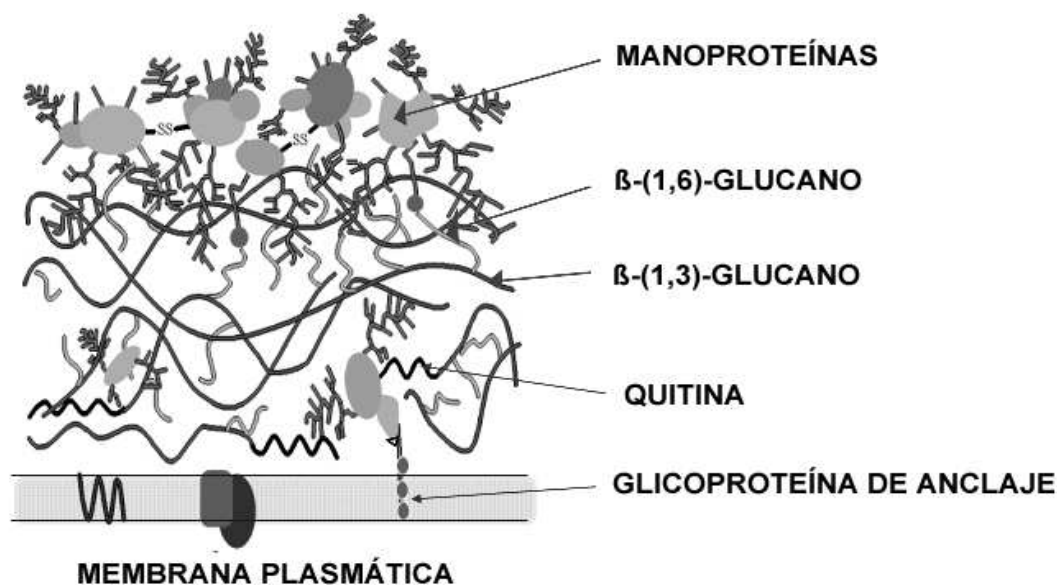


Figura 2: Esquema de la composición de la pared celular de las levaduras (Pretorius, 2000).

La autólisis de las levaduras comienza con la degradación de las estructuras celulares, siguiendo los siguientes pasos (Babayan, Bezrukov, Latov, Belikov, Belatseva & Titova, 1981):

- Primero: las endoestructuras celulares se degradan, liberando proteasas vacuolares al citoplasma.
- Segundo: las proteasas liberadas, son inicialmente inhibidas por inhibidores citoplasmáticos específicos, y después se vuelven a activar debido a la degradación de dichos inhibidores.

- Tercero: se hidrolizan los polímeros intracelulares, y se acumulan los componentes resultantes de dicha hidrólisis en el espacio restringido por la pared celular.
- Cuarto: los productos de la hidrólisis son liberados cuando se hidrolizan hasta alcanzar masas lo suficientemente pequeñas para cruzar a través de los poros de la pared celular.

La ruptura de la pared celular y la liberación de los componentes se realiza mediante el siguiente sistema en el que se diferencian cuatro procesos (Charpentier & Freyssinet, 1989):

- Inicialmente las actividades de las enzimas endo- y exo- β -(1,3)-glucanasas liberan una mezcla de polisacáridos y de cadenas cortas oligosacáridicas. Una fracción de estos polisacáridos corresponde a las manoproteínas unidas covalentemente al glucano de la pared intacta.
- Posteriormente, la hidrólisis parcial del glucano provoca una desestabilización de la estructura de la pared, que supone una liberación de manoproteínas de elevado peso molecular con bajos contenidos de glucosa y que provienen mayoritariamente de la zona periplásmica.
- En una etapa más tardía continúa la degradación de los glucanos de la pared por las β -(1,3)-glucanasas en los restos de pared y en el medio extracelular.
- Finalmente las exo- β -(1,3)-glucanasas, solubilizadas en el medio, degradan el glucano unido a las manoproteínas y estas últimas a su vez pueden ser hidrolizadas por α -manosidasas y por otras proteasas que liberan peptidomananos de menor tamaño.

Para realizar la autólisis de las levaduras en la crianza del vino espumoso se necesitan varios meses. La baja temperatura crianza, un ratio bajo de muerte celular y bajas cinéticas de reacciones enzimáticas explican esta lentitud. Hay varias opciones para potenciar el efecto de la autólisis de las levaduras: la adición de autolisados de levaduras, de cortezas secas de levaduras inactivas, de β -glucanasas y el incremento de la temperatura de crianza. Las técnicas de calentamiento suelen aportar un defecto al vino calificado como “tostado” (Torresi, Frangipane, Garzillo, Massantini & Contini, 2014)

2.3. β -glucanasas.

El empleo de β -glucanasas externas en la elaboración de vino está admitido por la OIV desde el año 2004. Las β -glucanasas comerciales se obtienen de varias especies de *Trichoderma sp.* La adición de estas enzimas puede reducir el tiempo necesario para la liberación de polisacáridos al vino cuando se produce una crianza sobre lías y

aumenta el contenido final de polisacáridos en el vino (OIV, 2004). Debido al poco conocimiento sobre los efectos de los preparados enzimáticos ricos en β -glucanasas para potenciar las características de la crianza de vinos espumosos, los fabricantes únicamente recomiendan su uso en vinos tranquilos.

Los estudios más recientes sobre el efecto de las β -glucanasas en la fermentación y crianza de los vinos espumosos, dicen que la adición de preparados ricos en estas enzimas potencian las características de crianza de los vinos espumosos tradicionales (Rodríguez-Nogales, Fernández-Fernández, & Vila-Crespo 2012a). Estos resultados han sido confirmados pero matizando que los efectos dependen de la cepa de levaduras que lleva a cabo la segunda fermentación (Torresi et al., 2014). También se ha observado que los preparados ricos en β -glucanasas también son un excelente coadyuvante para potenciar los efectos antioxidantes de los vinos espumosos (Rodríguez-Nogales, Fernández-Fernández, & Vila-Crespo 2012b).

2.4. Preparados comerciales a base de levaduras inactivas

Los preparados comerciales a base de levaduras inactivas se obtienen de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* después de una inactivación térmica una vez que han crecido en condiciones aeróbicas en medios con altas concentraciones de azúcar. Se pueden clasificar en cuatro tipos dependiendo del proceso empleado en su producción (Pozo-Bayón, Andújar-Ortiz & Moreno-Arribas, 2009b). :

- Levaduras inactivas. Obtenidas por la inactivación térmica seguida por una deshidratación.
- Autolisados de levaduras. Después de la inactivación térmica, hay un paso de incubación donde se permite que las enzimas sean liberadas desde la vacuola, y degraden parte del contenido intracelular.
- Cortezas o paredes de levaduras. Se separan los componentes insolubles formados por las paredes celulares de las levaduras sin el contenido citoplasmático.
- Extractos de levaduras. El extracto soluble obtenido después de una degradación total del contenido citoplasmático.

La adición de derivados de levaduras secas inactivas a los vinos puede producir cambios en el aroma del vino no sólo debido a su efecto sobre la volatilidad de aroma, sino también por la liberación y la incorporación de compuestos odorantes inicialmente presentes en los preparados de levaduras secas inactivas en los vinos. En función del tipo de vino los efectos sensoriales pueden ser diferentes; mientras que la adición de preparados de levaduras secas inactivas no tiene ningún efecto sobre el aroma de los

vinos varietales muy intensos, sí pueden mejorar el aroma de los vinos poco aromáticos (Pozo-Bayón et al., 2009b).

2.4.1. Cortezas de levaduras.

Las paredes celulares de levaduras, o cortezas de levaduras, se obtienen a partir de levaduras *Saccharomyces spp.* El método de preparación debe respetar el área de superficie y por consiguiente, la capacidad de absorción.

Las paredes celulares de levaduras se presentan bajo la forma de polvo fino o microgranulado, no higroscópico, de color crema y ligeramente aromático. No aportan residuos perjudiciales a los mostos de uva ni a los vinos. En el proceso, no se añaden antibióticos ni ningún otro compuesto que no sea necesario para el crecimiento de la levadura.

Se utilizan para prevenir y tratar de evitar las paradas de fermentación. Cuentan con la propiedad de fijar ciertos ácidos grasos (octanoico y decanoico) que afectan a la permeabilidad de la membrana de las levaduras.

El efecto estimulador de las paredes celulares de levadura se basa en su capacidad para adsorber ciertas sustancias tóxicas para las levaduras, que éstas producen durante el periodo de crecimiento, siendo especialmente el ácido decanoico, el principal inhibidor (OIV, 2013a)

2.4.2. Autolisados de levaduras.

Los autolisados de levaduras se utilizan como nutrientes para la rehidratación de las levaduras secas activas destinadas a la fermentación alcohólica, así como en calidad de nutrientes durante la fermentación alcohólica. Proceden de biomasa de levaduras de tipo *Saccharomyces spp.* Se obtienen a partir de una biomasa de levadura, tras una autólisis, en ocasiones, combinada con tratamientos térmicos y/o modificaciones del pH.

Se presentan en polvo, en copos o granulados, con un color entre amarillo claro y marrón y un olor característico a levadura. También pueden encontrarse en estado líquido, de un color entre amarillo ocre y marrón.

Los autolisados de levadura son fácilmente solubles en agua. La parte soluble es inferior al 80 % de la materia seca (OIV, 2013b).

El uso de autolisados de levaduras para potenciar la fermentación alcohólica o maloláctica puede inducir cambios negativos inesperados en la composición del vino. Por ejemplo, se ha demostrado que mostos a los que se les añaden autolisados de levaduras tienen mayor cantidad de aminas biógenas (tiramina y cadaverina) que

pueden proceder de los aminoácidos tirosina y lisina que están presentes en el autolisado inicial. (Pozo-Bayón et al., 2009b).

3. OBJETIVO.

El objetivo del presente estudio es comprobar el efecto del uso de diversos coadyuvantes (β -glucanasas, cortezas y autolisados de levaduras) sobre las características físico-químicas y organolépticas de los vinos espumosos Verdejo de larga crianza.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. Elaboración de los vinos.

Los vinos espumosos se elaboraron usando un vino base de la variedad Verdejo del año 2012 mediante el método tradicional (segunda fermentación en botella). Para llevar a cabo dicha fermentación, se añadió azúcar (22,3 g/l), levadura *Saccharomyces cerevisiae bayanus* (Seccoferm, Erbslöh, Alemania, 15 g/Hl) y un clarificante (alginato, Sekt-Klar plus, Erbslöh, Alemania, 60 ml/Hl). Las botellas se dividieron en cuatro lotes para aplicar cada tratamiento: (a) un lote sin aditivos, (b) cortezas de levaduras (Superbouquet MN, Agrovin, Spain) a 30 g/Hl, (c) autolisados de levaduras (Superbouquet, Agrovin, Spain) a 30 g/Hl y (d) β -glucanasas (Enovin glucan, Agrovin, España) a 3 g/Hl. Las dosis se corresponden con las máximas dosis recomendadas por el fabricante. La segunda fermentación y crianza sobre lías se llevó a cabo durante 22 meses a una temperatura de unos 14-15°C.

4.2. Procedimientos analíticos.

Al final del periodo de crianza, dos botellas de cada lote se analizaron por duplicado para los parámetros de pH, acidez total (AT), acidez volátil (AV), grado alcohólico ($^{\circ}$ Alc), azúcares reductores (AzR) nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), intensidad del color (IC), índice de polifenoles totales (IPT), ácidos hidroxicinámicos (Hcin) y flavonoles (FLVS) y por triplicado para los parámetros de proteínas solubles (PS), polisacáridos ácidos (PoIAc), polisacáridos totales (PoIT) y polisacáridos neutros (PoIN).

Se emplearon los métodos descritos por la *Organización Internacional de la Viña y el Vino* (OIV, 2015) para la determinación del pH, acidez total, acidez volátil, azúcares reductores y grado alcohólico. La intensidad del color se determinó midiendo la absorbancia óptica del vino a 420 nm. Las proteínas totales se determinaron por el

método colorimétrico descrito por Bradford (1976). El método de titulación con formaldehído se usó para cuantificar el nitrógeno fácilmente asimilable (Shively & Henick-Kling, 2001). Los polisacáridos totales, ácidos y neutros fueron evaluados mediante el método descrito por Segarra, Lao, López-Tamames & De La Torre-Boronat (1995).

Algunas familias de compuestos fenólicos se determinaron mediante espectrofotometría UV. Índice de Polifenoles Totales, ácidos hidroxicinámicos totales y flavonoles totales, se cuantificaron midiendo las absorbancias a 280, 320 y 365 nm respectivamente en cubetas de cuarzo de 1 cm en un espectrofotómetro UV-visible (Lan Optics 2000 UV, Labolan, España).

4.3. Análisis sensorial.

Un grupo de 13 consumidores no entrenados, pero con experiencia previa en la cata de vinos, y con edades comprendidas entre los 18 y los 45 años, evaluaron 4 muestras, cada una de un vino con uno de los tratamientos del estudio. Las pruebas se realizaron en la sala de cata de la ETSIIAA del Campus de Palencia (Universidad de Valladolid) y en cabinas individuales. Las 4 muestras se sirvieron aleatoriamente según un diseño de bloques completos, en copas tipo flauta para la degustación de vinos espumosos, con códigos de tres cifras elegidos al azar.

Para cada muestra, los consumidores evaluaron en primer lugar la aceptabilidad del color, olor, sabor, picor en boca, persistencia en boca, aceptabilidad global e intención de compra utilizando una escala hedónica de 9 puntos (Stone & Sidel, 2004). A continuación los consumidores realizaron un análisis descriptivo cuantitativo (Faye, Brémaud, Teillet, Courcoux, Giboreau & Nicod, 2006) utilizando una ficha de cata de 14 descriptores agrupados en fase visual (limpidez e intensidad del color), fase olfativa (intensidad del olor, olor a frutas, olor a flores y olor a levaduras) y fase en boca (carbónico en boca, intensidad de aroma, sabor ácido, sabor amargo, sabor dulce, volumen en boca, astringencia y persistencia). Todos los atributos los evaluaron utilizando una escala no estructurada de 10 cm. Por último, mediante la técnica del Napping® (Pagès, 2005), los consumidores tenían que colocar las muestras de vino en una hoja en blanco de 40 cm x 60 cm según sus propios criterios y según la importancia relativa que cada consumidor quisiera dar, de tal manera que dos vinos están muy cerca si son percibidos como idénticos y distantes entre sí si son percibidos como diferentes.

4.4. Tratamiento estadístico de los datos.

Con los resultados analíticos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada parámetro ($p < 0,05$). Posteriormente, se aplicó el test de Tukey para diferenciar los subconjuntos homogéneos que forman las medias, definidos con letras. Para realizar dicho tratamiento estadístico se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.2.04 para Windows 7 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD 20852-4999 EE.UU.).

El análisis de los datos obtenidos en la prueba de aceptabilidad se realizó utilizando mapas de preferencia internos (MPI), y con los datos del análisis descriptivo cuantitativo, un análisis de componentes principales (ACP). En ambos casos se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.2.04 para Windows 7 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD 20852-4999 USA). Los datos del Napping[®] se analizaron mediante un análisis factorial múltiple (AFM) usando el lenguaje R (R Development Core, 2007) y el paquete FactoMine R.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Una vez realizados los análisis físico-químicos, se realizó un estudio de varianza (ANOVA) para cada uno de los parámetros mostrando las diferencias estadísticamente significantes ($p < 0,05$) para cada tipo de tratamiento.

5.1. Efectos sobre los parámetros clásicos.

La tabla 1 muestra los resultados de los análisis realizados una vez concluida la crianza para el pH, la acidez total y volátil, los azúcares reductores y el grado alcohólico.

No se muestran diferencias significantes entre el pH de los cuatro tratamientos. Tampoco se observan diferencias concluyentes para la acidez total y la acidez volátil. Por lo que se supone que el tipo de tratamiento no afecta a los parámetros de pH, acidez total y acidez volátil

Tabla 1. Parámetros enológicos clásicos de cada tipo de tratamiento.

	Control	Cortezas	Autolisados	β -glucanasas	P-valor
pH	2,81 ^a ±0,01	2,81 ^a ±0,02	2,80 ^a ±0,01	2,79 ^a ±0,02	0,39
Acidez total (g/l de ác. tartárico)	5,2 ^a ±0,1	5,1 ^a ±0,1	5,1 ^a ±0,1	5,1 ^a ±0,1	0,37
Acidez volátil (g/l de ác acético)	0,22 ^a ±0,02	0,22 ^a ±0,01	0,22 ^a ±0,01	0,23 ^a ±0,01	0,62
Azúcares reductores (g/l)	0,7 ^a ±0,2	0,9 ^a ±0,2	4,6 ^c ±0,9	2,4 ^b ±1,7	0,0000
Grado alcohólico (% \approx v/v)	12,6 ^{bc} 0,1	12,7 ^c ±0,1	12,1 ^a ±0,1	12,4 ^{ab} ±0,2	0,0002

En cuanto a los azúcares reductores, se observa como en los vinos elaborados sin aditivos y con cortezas de levaduras, se puede afirmar que se han agotados los azúcares fermentables por completo se podrían denominar como “Brut Nature” (<3,0 g/l de azúcares residuales), mientras que los vinos elaborados con β -glucanasas si bien todavía podrían llevar la apelación de “Brut Nature”, sus azúcares residuales son sensiblemente mayores. Los vinos elaborados con autolisados de levaduras, presentan una cantidad de azúcar residual mayor a los otros tres tipos de vino, y ya no podrían llevar la denominación de “Brut Nature”, si no que tendría que llevar la de “Extra Brut” (<6,0 g/l de azúcares residuales) (Unión Europea, 2009). Estos resultados están en desacuerdo con los encontrados por Rodríguez-Nogales *et al.* (2012a) donde a los 9 meses de crianza, los niveles de azúcares residuales en los tratamientos y del vino control, no presentaron diferencias significativas. Además, desde el tercer mes de crianza, los niveles de azúcares residuales ya estaban por debajo de los 3,0 g/l, llegando, a los 9 meses de crianza, a alcanzar niveles inferiores a 0,3 g/l y por lo tanto, no observándose ningún problema en la segunda fermentación.

Respecto al grado alcohólico, se observa que está muy relacionado con la cantidad de azúcares residuales. Se comprueba que los vinos que mayor grado alcohólico tienen son los que más azúcares han consumido. El grado alcohólico medio lo presentan los vinos elaborados con β -glucanasas que son los vinos con un contenido en azúcares residuales medio. Por último, se confirma que los vinos con autolisados no han fermentado completamente los azúcares del licor de tiraje al ver que son los que menor grado alcohólico tienen junto con la mayor cantidad de azúcares residuales. A pesar de estos resultados, no parece lógico que el menor grado alcohólico observado en algunas muestras esté relacionado directamente con la adición de los coadyuvantes (autolisados y β -glucanasas).

5.2. Efectos en el contenido de polisacáridos.

El nivel de polisacáridos neutros se emplea para evaluar el grado de autólisis en el vino (Rodríguez-Nogales, 2012a). En la figura 3 se muestran los contenidos en polisacáridos totales y neutros en los vinos objetos del estudio. Al partir del mismo vino base, se supone que las diferencias que se observan en cada vino son únicamente a los coadyuvantes añadidos con el licor de tiraje. Al comparar los polisacáridos totales se tiene en cuenta los polisacáridos neutros y los ácidos. Los polisacáridos neutros son, mayoritariamente glucanos y manoproteínas procedentes de autólisis de las levaduras (Usseglio-Tomasset, 1998).

Como se observa en la figura 3, el vino control es el que menos polisacáridos totales presenta al final de la crianza. Por el contrario, el vino al que se le añadieron autolisados de levaduras es el que más polisacáridos totales tiene, mientras que la cantidad de polisacáridos totales en el vino con cortezas y el que se añadieron β -glucanasas quedarían en un grupo intermedio.

Teniendo en cuenta los polisacáridos neutros, el vino control sigue siendo el que menos tiene, mientras que el vino con autolisados y con β -glucanasas son los que más tienen. En este aspecto, el vino con cortezas seguiría quedando en una categoría intermedia.

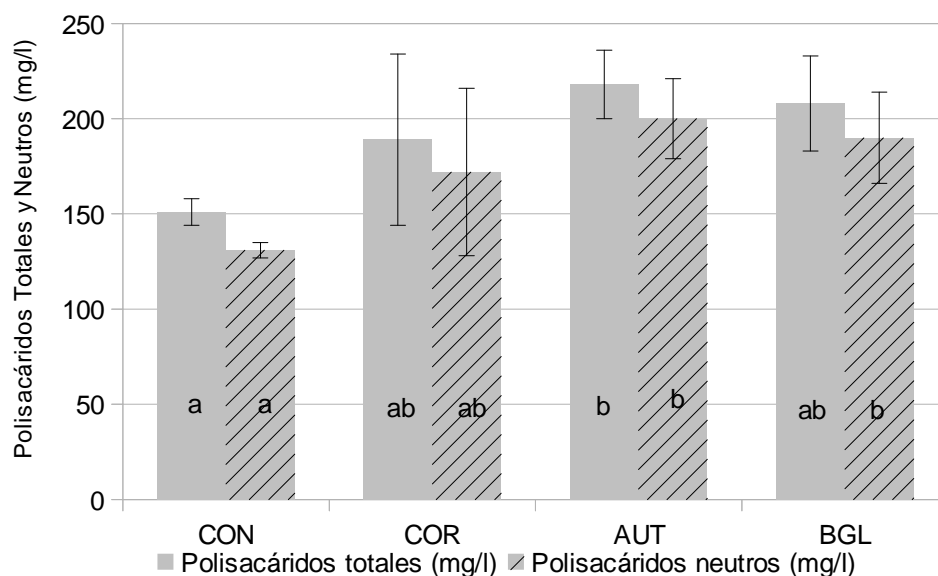


Figura 3: Contenido en polisacáridos totales y neutros en cada vino. Los resultados están expresados como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes se corresponden con valores estadísticos significativamente diferentes ($p < 0,05$). CON = vino control, COR = vino con cortezas secas de levaduras, AUT = vino con autolisados de levaduras, BGL = Vino con β -glucanasas.

Comparando estos resultados con los obtenidos por Rodríguez-Nogales *et al.* (2012a) al cabo de una crianza de 9 meses, se observa un aumento importante en los

contenidos de polisacáridos neutros de los cuatro tratamientos. Estos incrementos son más marcados en el vino control (desde unos 20 mg/l en el vino con 9 meses a unos 130 mg/l en el vino con 22 meses de crianza), aunque los niveles siguen siendo más bajos que el resto de tratamientos. El siguiente vino que más ha aumentado en el contenido de polisacáridos neutros es el que tiene autolisados de levaduras, que ha aumentado unos 90 mg/l de polisacáridos respecto al vino con crianza de 9 meses. Las diferencia de los vinos con cortezas y con β -glucanasas entre las crianzas de 9 y 22 meses son de 70 y 30 mg/l, respectivamente.

En este caso, el vino que menor cantidad de polisacáridos neutros presenta sigue siendo el vino control, pero las cantidades respecto al mismo vino con una crianza de 9 meses son muy superiores. Esto puede ser debido a que a pesar de no tener ningún coadyuvante, el mayor tiempo de permanencia del vino en contacto con las lías ha permitido que se produzca una mayor autólisis por acción de las enzimas propias de las levaduras y una mayor cesión de compuestos provenientes de la pared celular al vino.

Rodríguez-Nogales *et al.* (2012) mostraron que, a los 9 meses de crianza, el vino control presentó los menores niveles para los polisacáridos neutros. La presencia de coadyuvantes incrementó el contenido en polisacáridos en el vino, compensando los polisacáridos consumidos por las levaduras (Núñez, Carrascosa, González, Polo, & Martínez-Rodríguez, 2005). Los valores más altos los obtuvieron los vinos con β -glucanasas. La adición de β -glucanasas permite una ruptura más rápida de las paredes celulares por hidrólisis de las cadenas de β -glucano (Palomero, Morata, Benito, González & Suárez-Lepe, 2007) y esto permite una liberación de manoproteínas en el vino.

Los polisacáridos ácidos están compuestos, mayoritariamente por pectinas (Rodríguez-Nogales *et al.*, 2012a), que son heterósidos polisacáridos formados mediante la unión de moléculas de ácido galacturónico, parcialmente esterificado con metanol. Las pectinas son solubles en agua e insolubles en alcohol. La hidrólisis de las pectinas es la responsable mayoritaria de la cantidad de metanol presente en los vinos (Usseglio-Tomasset, 1998).

Observando la figura 4, no se puede afirmar que haya diferencias significativas en las cantidades de polisacáridos ácidos, lo cual parece lógico ya que las pectinas presentes en el vino proceden de la uva. Al partir del mismo vino base, las diferencias en estos polisacáridos no resultan importantes.

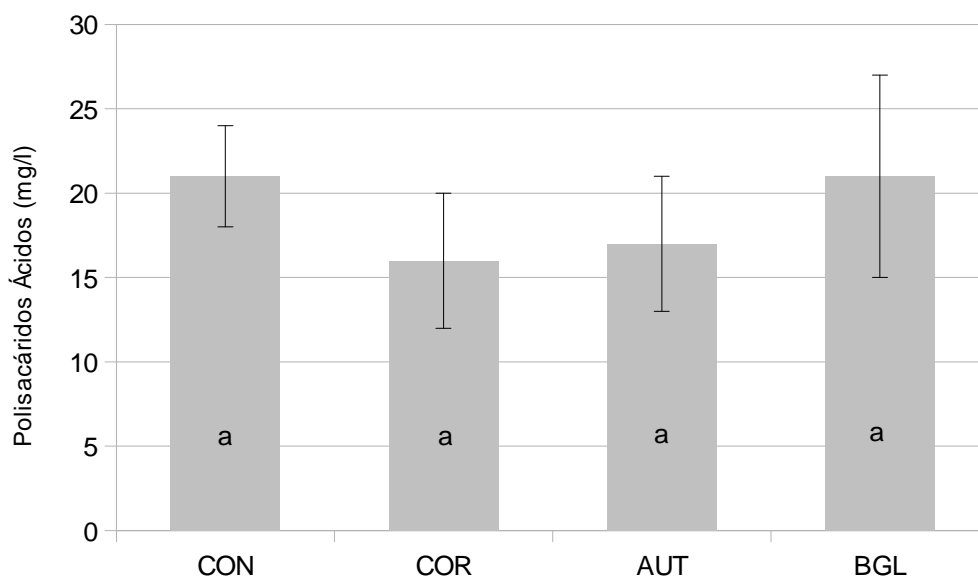


Figura 4: Contenido en polisacáridos ácidos en cada vino. Los resultados están expresados como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes se corresponden con valores estadísticos significativamente diferentes ($p < 0,05$). CON = vino control, COR = vino con cortezas secas de levaduras, AUT = vino con autolisados de levaduras, BGL = Vino con β -glucanasas.

5.3. Efectos sobre las proteínas solubles y el nitrógeno fácilmente asimilable.

Aunque las proteínas son un componente minoritario en el vino, contribuyen de manera importante a su calidad. De hecho, las proteínas contribuyen de forma importante a la sensación de “cuerpo” en el vino, pueden unirse a compuestos volátiles reteniendo el aroma y tienen un efecto positivo en la estabilidad de la espuma (Torresi *et al.*, 2014). Por otra parte, Rodríguez-Nogales *et al.* (2012b) han mostrado que las proteínas totales están correlacionadas positivamente con las propiedades antioxidantes de los vinos espumosos. Durante el proceso de autólisis, las proteasas hidrolizan las proteínas de las levaduras a compuestos de menor masa molecular.

En la figura 5, se muestran las cantidades de proteínas solubles y de nitrógeno fácilmente asimilable presentes en los cuatro tipos de vino. En la gráfica de las proteínas solubles, se observa que los vinos control y con autolisados de levaduras tiene menor cantidad de proteínas que el vino al que se le añadieron β -glucanasas. El espumoso elaborado con cortezas de levaduras tiene un contenido intermedio.

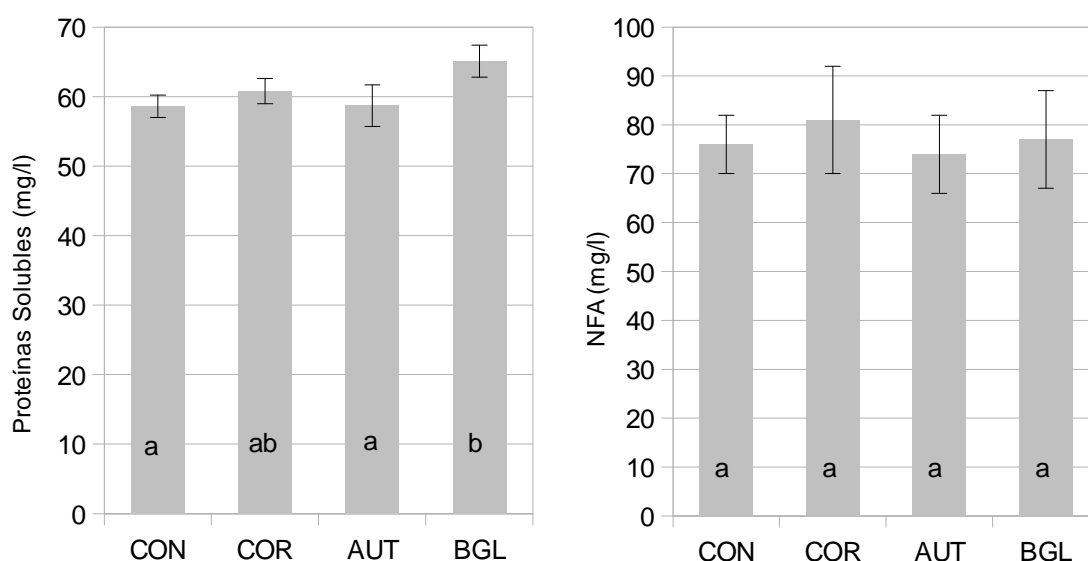


Figura 5: Contenido en proteínas solubles en mg/l y nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) en mg/l de cada vino. Los resultados están expresados como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes se corresponden con valores estadísticos significativamente diferentes ($p < 0,05$). CON = vino control, COR = vino con cortezas secas de levaduras, AUT = vino con autolisados de levaduras, BGL = Vino con β -glucanasas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Rodríguez-Nogales et al. (2012a) y Torresi et al. (2014) en un estudio similar, se ratifica la tendencia a aumentar el contenido de proteínas solubles en el vino a lo largo de la crianza en contacto con las lías. Estas diferencias aumentan más para los vinos con β -glucanasas. Estos resultados pueden ser debidos a que la adición de β -1,3-glucanasas exógenas promueve la liberación de manoproteínas de la pared celular de la levadura (Torresi, Frangipane & Anelli, 2011)

En la gráfica del Nitrógeno fácilmente asimilable (figura 5) no se observan diferencias estadísticamente significantes por lo que no se puede afirmar que cualquiera de los tratamientos realizados es favorable en este aspecto sobre los demás. También se puede descartar que las fermentaciones incompletas de los azúcares en los vinos con autolisados y β -glucanasas estén causadas por problemas de falta de nitrógeno fácilmente asimilable. En el estudio presentado por Rodríguez-Nogales et al. (2012a) se observa una tendencia a disminuir la cantidad de NFA en el vino durante los 9 meses de crianza, pero comparando los valores con los del presente artículo, no sólo se ha roto esta tendencia si no que ha aumentado: desde los 30 mg/l a los 9 meses de crianza a los 80 mg/l a los 22 meses aproximadamente. Este hecho puede ser debido a que hasta que no comienza la autólisis, las levaduras no sólo no ceden compuestos nitrogenados al medio, si no que los absorben. Una vez

que comienza la autólisis, a partir de 3 ó 9 meses, se comienzan a liberar, lentamente al vino, diversos aminoácidos (Alexandre, 2006).

Además Rodríguez-Nogales et al. (2012a) si apreciaron diferencias significativas entre los cuatro vinos respecto al NFA a los 9 meses de crianza. Los vinos con derivados de levaduras, cortezas y autolisados, presentaron los mayores niveles de NFA, seguidos por los vinos con β -glucanasas y el vino control presentó menor cantidad de NFA.

5.4. Efectos sobre los polifenoles.

La absorbancia a 280 nm se emplea como medida general de los polifenoles totales existentes en el vino. Las medidas de absorbancia a 320 nm y 365 nm se emplean como indicativo de los ácidos hidroxicinámicos y de los flavonoles, respectivamente. Los ácidos hidroxicinámicos son los principales polifenoles presentes en los vinos blancos y son responsables del color de los mismos (Rodríguez-Nogales et al., 2012b). Durante su crianza, los vinos espumosos se van oscureciendo, virando hacia colores marrones (aumenta la absorbancia del vino a 420 nm). Este aumento de color es debido a la oxidación de los ácidos hidroxicinámicos, principalmente del ácido caftárico en sus formas *cis* y *trans*, y del ácido 2-S-glutationilcaftárico (Ibern-Gómez et al., 2000). Por el contrario, los compuestos resultantes de esta oxidación pueden precipitar durante el periodo de crianza del vino, lo que supondría un descenso en la intensidad del color del vino.

En la figura 6 se muestran las absorbancias de los vinos a 420 nm, 280 nm, 320 nm y 365 nm para medir la intensidad de color, el IPT, los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoles respectivamente. No se observan diferencias significativas en el color de los vinos, cabe señalar que los valores de la intensidad colorante son relativamente bajos. En cuanto a al IPT la única diferencia significativa la presenta el vino elaborado con autolisados, que tienen unos valores ligeramente mayores. El vino control tiene una cantidad de ácidos hidroxicinámicos ligeramente mayor a los otros tres vinos. El contenido en flavonoles, compuestos con buenas propiedades antioxidantes, es prácticamente idéntico en los cuatro vinos estudiados.

Sobre los grupos genéricos de polifenoles, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles lo que más influye es la variedad y el periodo de crianza sobre lías. El método de elaboración afecta en menor medida (Stefenon, Bonesi, Marzarotto, Barnabé, Spinelli, Webber & Vanderlinde 2014).

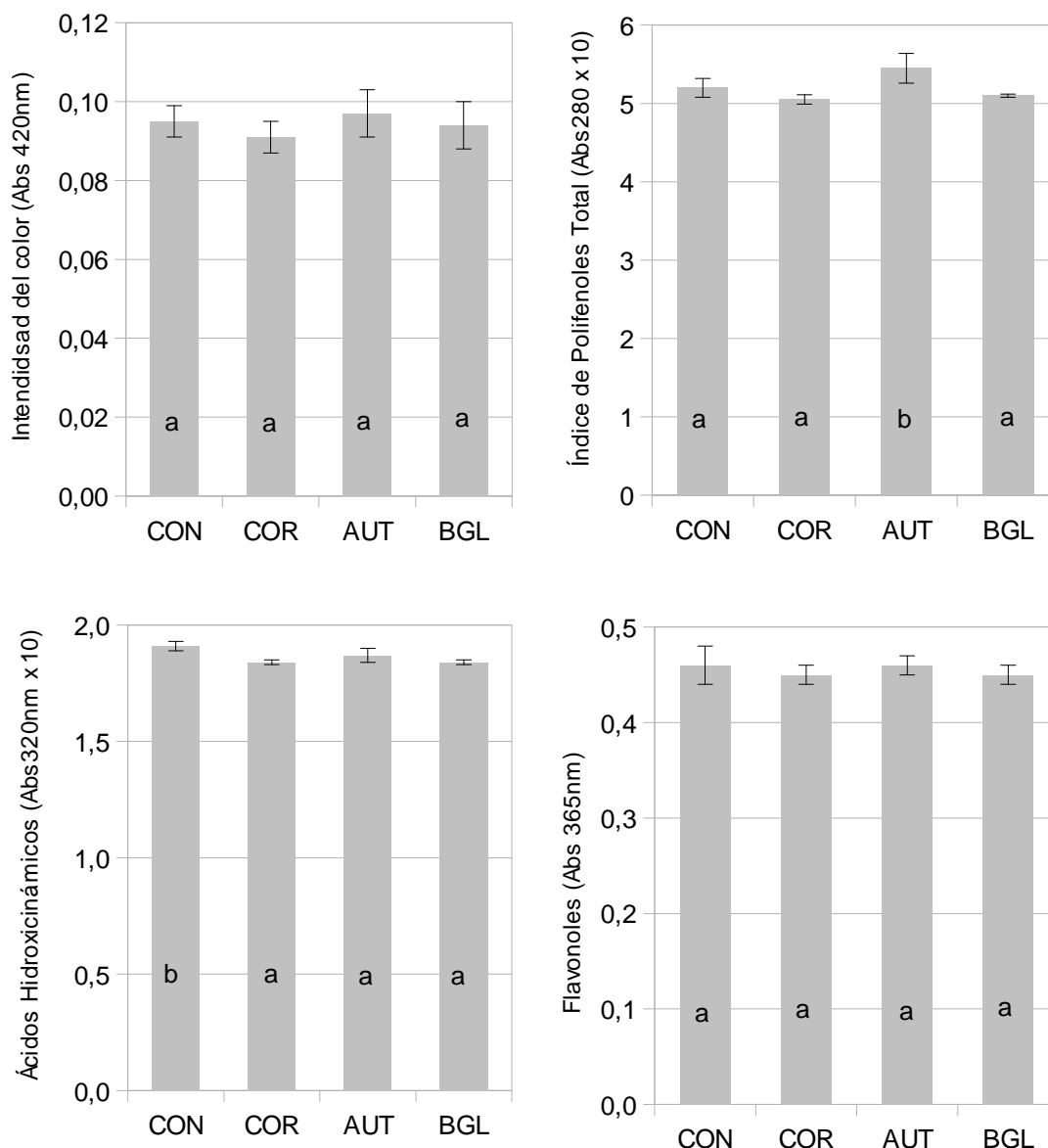


Figura 6: Intensidad del color (Abs 420 nm), índice de polifenoles totales (Abs 280 nm de una disolución de vino 1:10), ácidos hidroxicinámicos (Abs 320 nm de una disolución de vino 1:10) y flavonoles (Abs 365 nm). Los resultados están expresados como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes se corresponden con valores estadísticos significativamente diferentes ($p < 0,05$). CON = vino control, COR = vino con cortezas secas de levaduras, AUT = vino con autolisados de levaduras, BGL = Vino con β -glucanasas.

En el estudio presentado por Rodríguez-Nogales et al. (2012a), respecto a la intensidad de color, los vinos elaborados con autolisados y cortezas de levaduras no mostraron diferencias significativas con el vino control, únicamente el vino con β -glucanasas presentó menores niveles de intensidad del color. Esto puede ser explicado por la mayor cantidad de manoproteínas de la pared celular liberadas en la autólisis y el efecto protector de éstas sobre la oxidación de los polifenoles. Además,

los vinos con coadyuvantes tuvieron mayores valores de IPT, ésteres hidroxicinámicos y flavonoles que el vino control.

Comparando con los resultados obtenidos por Rodriguez-Nogales et al. (2012a), vemos que los valores de intensidad del color entre las muestras tuvieron mayores diferencias que las observadas en los vinos de este estudio.

En el caso del IPT, Rodriguez-Nogales et al. (2012a), también observaron mayores diferencias, pero al igual que en este estudio, el vino con autolisados es uno de los que mayor IPT presenta y los valores de IPT en general, también alcanzan valores similares.

Si tenemos en cuenta la absorbancia por parte de los ácidos hidroxicinámicos, se observan valores parecidos, pero en el caso de Rodriguez-Nogales et al. (2012a), a los 9 meses de crianza, el vino que presentaba menor valor era el control, mientras que en este ensayo es el que mayores valores presenta, siendo el resto muy similares.

Observando la absorbancia de los flavonoles, los valores de este estudio no presentan diferencias significativas y son menores que el de Rodriguez-Nogales et al. (2012a) a los 9 meses de crianza.

5.5. Efectos sobre las características sensoriales.

En la figura 7 se muestran los resultados de la prueba de aceptabilidad mediante un mapa de preferencia interno (MPI). Los vinos están localizados en la dimensión vectorial definida por las dos primeras componentes principales que explican el 95,75% de la varianza total. En el MPI se observa que los tratamientos que han sido mejor valorados en la prueba de aceptabilidad han sido los tratamientos con autolisados y con cortezas de levaduras. El tratamiento con autolisados destaca sobre todo en las sensaciones en boca como sabor y persistencia, y en la aceptabilidad global del vino. El vino al que se le añadieron cortezas de levaduras secas presenta mayor aceptabilidad en color, olor, picor en boca e intención de compra. Por contra, los vinos que menor aceptabilidad presentaron en todos los aspectos son los elaborados con β -glucanasas y el vino control. Si nos fijamos en el artículo de Rodriguez-Nogales et al. (2012a) comprobamos que los vinos con mejores valoraciones en aroma frutal y floral, en picor en boca e intención de compra son los vinos elaborados con autolisados. Con estos datos se puede decir que el añadir cortezas permite tener un color agradable y potenciar unas características olfativas y de picor del carbónico en boca muy interesantes, mientras que al realizar la fermentación junto con autolisados, se potencian las características gustativas del vino.

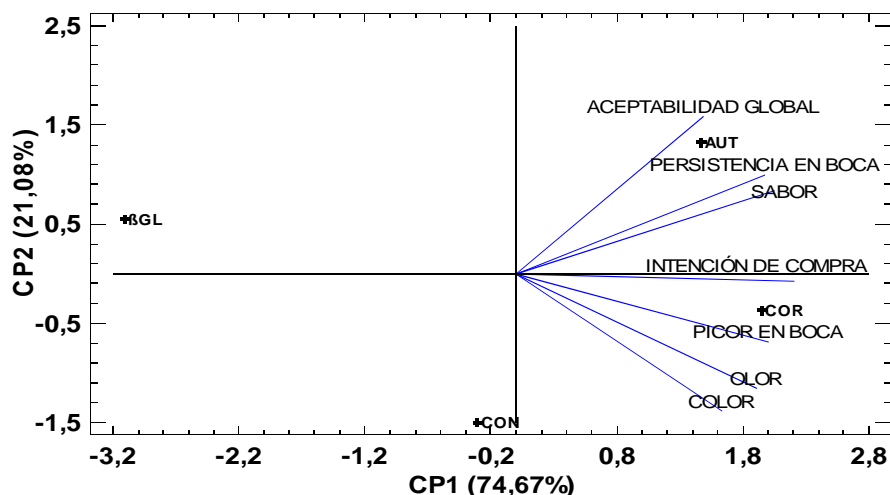


Figura 7: Mapa de preferencia interno (MPI) de la prueba de aceptabilidad: representación de muestras y atributos. CON = vino control, COR = vino con cortezas secas de levaduras, AUT = vino con autolisados de levaduras, β GL = Vino con β -glucanasas.

En la figura 8, se presenta el gráfico del análisis de componentes principales elaborado con los datos de la prueba de análisis sensorial descriptivo cuantitativo. Los vinos están localizados en la dimensión vectorial definida por las dos primeras componentes principales que explican el 75,36% de la varianza total. En este caso se observa una similitud de valoraciones de los vinos elaborados con autolisados y el vino control, y se caracterizan sobre todo por la limpidez, intensidad de color, olor afrutado y acidez en boca. El vino elaborado con cortezas secas de levaduras tiene mayores puntuaciones en la intensidad aromática, el aroma a flores y la persistencia en boca. Y, por último, el vino elaborado con β -glucanasas, vuelve a estar alejado del resto de tratamientos como se observaba en la fig. 7, y posee mayor volumen en boca y sabor amargo.

Estos resultados están en consonancia con los encontrados por Rodríguez-Nogales et al. (2012a), los vinos elaborados con cortezas secas de levaduras aportan mayor aroma a flores que los otros tratamientos y el vino con β -glucanasas presenta mayor aroma a levaduras y mayor volumen en boca.

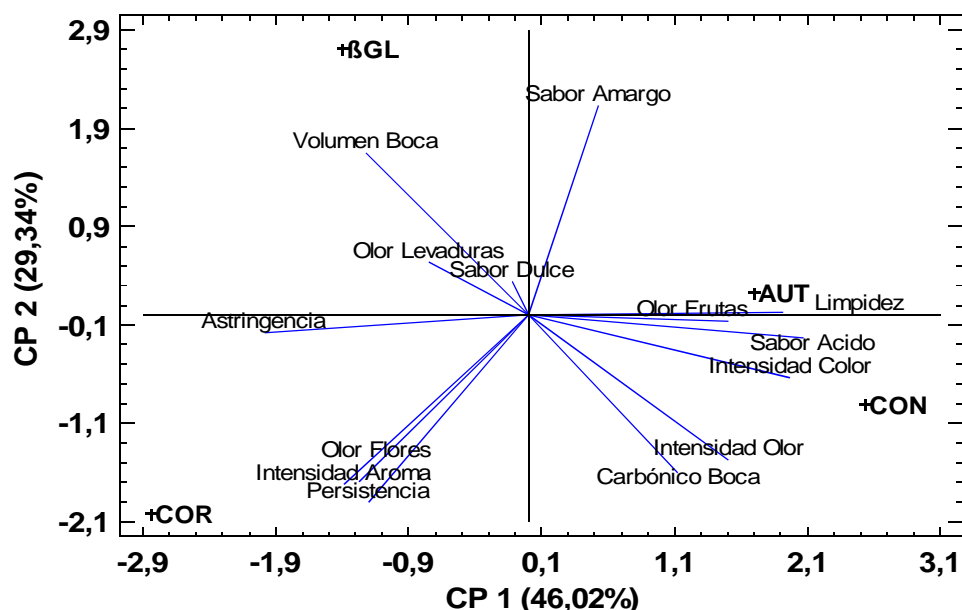


Figura 8: Diagrama de componentes principales del análisis sensorial descriptivo: representación de muestras y atributos. CON = vino control, COR = vino con cortezas secas de levaduras, AUT = vino con autolisados de levaduras, β GL = Vino con β -glucanasas.

En la figura 9 se muestran los resultados de la prueba de Napping[®], después de aplicar AFM. Los vinos están localizados en las dos primeras dimensiones y explican el 74,04% de la varianza total. En esta prueba, al igual que en la prueba de aceptabilidad (Fig. 7), se vuelve a comprobar que los vinos elaborados con autolisados y cortezas de levaduras son muy similares, estando bien diferenciados de los otros dos tratamientos (vino control y elaborado con β -glucanasas).

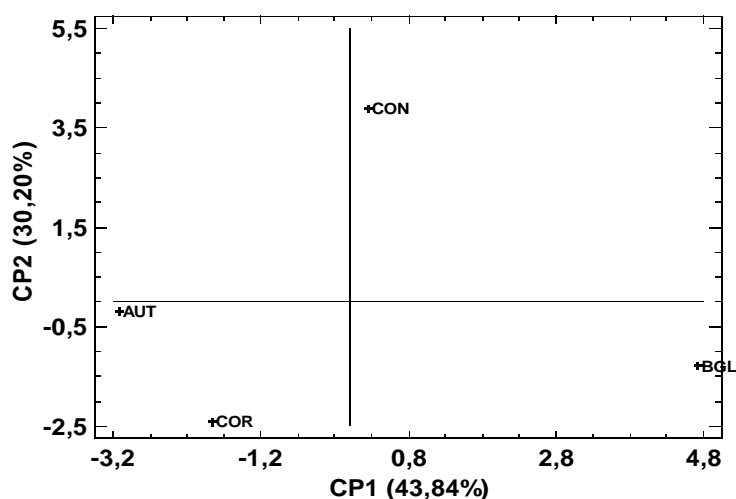


Figura 9: Representación de las muestras de vino en las dos primeras dimensiones del análisis factorial múltiple (AFM). CON = vino control, COR = vino con cortezas secas de levaduras, AUT = vino con autolisados de levaduras, BGL = Vino con β -glucanasas.

Por último, en la figura 10 se muestra un análisis de componentes principales con los datos obtenidos en los análisis físico-químicos junto con los obtenidos en la prueba de análisis sensorial descriptivo cuantitativo. Los vinos están localizados en la dimensión vectorial definida por los dos componentes principales que explican el 73,94% de la varianza total.

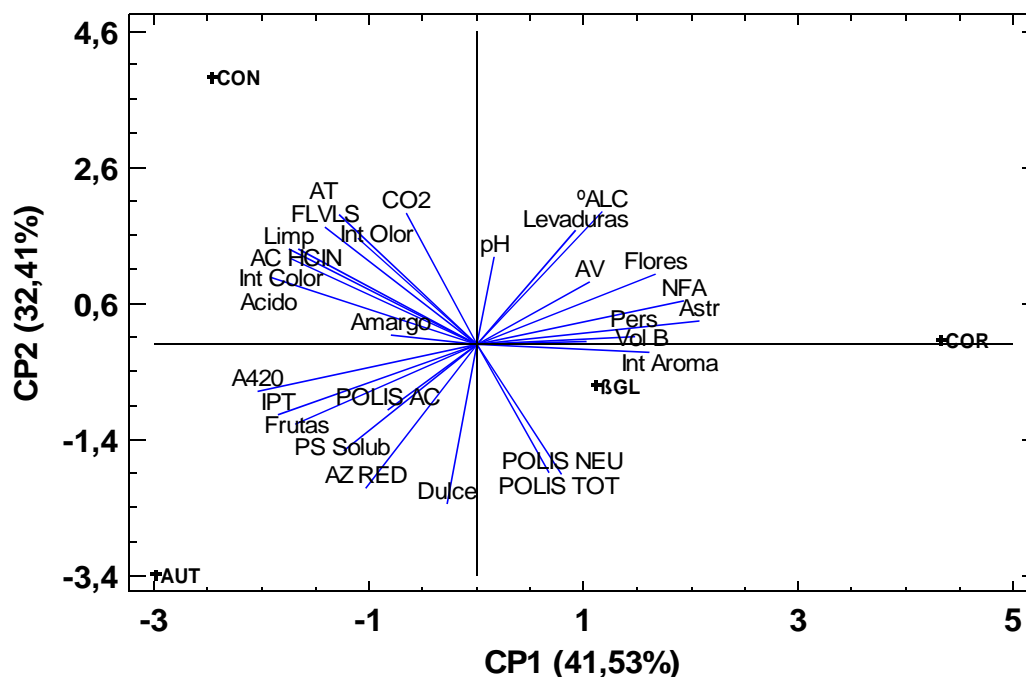


Figura 10: Diagrama de componentes principales de análisis físico-químicos y de las características sensoriales. Muestras: vino control (CON), vino con cortezas (COR), vino con Autolisados (AUT), vino con β -glucanasas (β GL). Parámetros analíticos: Acidez total (AT), Acidez volátil (AV), azúcares reductores (AZ RED), Grado alcohólico ($^{\circ}$ ALC), Polisacáridos totales (POLIS TOT), Polisacáridos ácidos (POLIS AC), Polisacáridos neutros (POLIS NEU), Proteínas solubles (PS Solub). Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), Intensidad del color – Abs 420nm (A420), Índice de polifenoles totales (IPT), Ácidos hidroxicinámicos (AC HCIN), Flavonoles (FLVLS). Parámetros sensoriales: Carbónico en boca (CO2 Boca), Limpidez (Limp), Intensidad del color (Int Color), Intensidad del olor (Int Olor), Olor a frutas (Frutas), Olor a flores (Flores), Olor a levaduras (Levaduras), Intensidad de aroma en boca (Int Aroma), Sabor dulce (Dulce), Sabor ácido (Ácido), Sabor amargo (Amargo), Astringencia (Astr), Volumen en boca (Vol B) y Persistencia en boca (Pers).

En la figura 10 se observa claramente las diferencias que presentan los cuatro tipos tratamientos.

El vino control se caracteriza por la mayor presencia de cantidad de compuestos fenólicos como los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoles, que pueden influir en el sabor amargo (Usseglio-Tomasset, 1998). El vino control, también presenta mejores

valoraciones en cuanto a limpidez y mayor intensidad de color y olor, también se puede destacar la mayor acidez en boca.

En la figura 10 se confirma que el vino con cortezas tiene un mayor grado alcohólico. El vino con cortezas también presenta mayor olor a frutas. En boca, tiene mayor astringencia y presenta mayor persistencia.

El vino elaborado con autolisados de levaduras presenta mayores valores en cuanto a sabor dulce, lo que puede ser debido a la mayor cantidad de azúcares residuales (Tabla 1). También tiene mayores valores de IPT, lo que también influye en los sabores amargos (Usseglio-Tomasset, 1998) y también tiene un mayor aroma afrutado.

El vino elaborado con β -glucanasas presenta mayores valores de polisacáridos totales y neutros lo que le da mayor sensación de volumen en boca. También tiene una buena intensidad aromática.

Los resultados son similares a los obtenidos por Rodríguez-Nogales et al. (2012a), en los que los vinos con tratamientos, respecto al vino control, a los 9 meses de crianza presentaron características similares. Los vinos con β -glucanasas presentaron mayores características de envejecimiento del vino con mayores valores de polisacáridos neutros y totales. Los vinos con derivados de levaduras tuvieron mayor intensidad aromática y permiten conservar mejor los aromas frutales y florales. Concretamente, los vinos con cortezas de levaduras tenían aromas florales más intensos y los vinos con autolisados una mayor intensidad en aromas afrutados.

6. CONCLUSIONES.

Según lo presentado en este estudio cabe afirmar que el empleo de preparados enzimáticos ricos en β -glucanasas como aditivo en la segunda fermentación del vino espumoso va a potenciar las características de crianza de éste. Las β -glucanasas hacen que el vino presente mayor volumen en boca debido a una mayor liberación de polisacáridos neutros y manoproteínas de la pared celular de las levaduras que han llevado a cabo la segunda fermentación y, el vino, también presenta mayor concentración de proteínas solubles que favorecen estas características.

Otros aditivos, como las cortezas de levaduras secas inactivas o los productos autolisados de levaduras también van a potenciar las características aromáticas del vino, fundamentalmente frutales y florales. Bien es cierto que habría que averiguar la causa de que los vinos con autolisados tengan mayor cantidad de azúcares residuales ya que puede ser debido a un problema en la segunda fermentación.

El vino control ha resultado tener buenas características pero no tanto como las otras muestras, por lo que el empleo de estos aditivos puede ser una ventaja a la hora de la producción industrial de vinos espumosos.

Sería conveniente ampliar los conocimientos sobre el efecto de estos aditivos en diferentes variedades, diferentes zonas y con diferentes tiempos de crianza para poder verificar estas afirmaciones.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Alexandre, H., & Guilloux-Benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine – a review. *Australian journal of grape and wine research*, 12(2), 119-127.
- Babayan, T.L., Bezrukov, M.G., Latov, V., Belikov, V.M., Belatseva, E.M. & Titova, E.F. (1981) Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. Morphological effects, rheological effects and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. *Current microbiology* 5, 163-168.
- Blouin, J. & Peynaud, E. (2006). *Enología práctica: Conocimiento y elaboración del vino* (4ª edición). Madrid: Ed. Mundi-Prensa.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Charpentier C. & Freyssinet M. (1989) The mechanism of autolysis in wine. *Yeast* 5,181-186
- Dubourdieu, D., Villetaz, J. C., Desplanques, C., & Ribéreau Gayon, P. (1981). Dégradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. Application à l'amélioration de la clarification des vins issus de raisins pourris. *Connaissance de la vigne et du vin*, 15, 161-177.
- Faye, P., Brémaud, D., Teillet, E., Courcoux, P., Giboreau, A., & Nicod, H. (2006). An alternative to external preference mapping based on consumer perceptive mapping. *Food Quality and Preference*, 17, 604–614.
- Hidalgo Togores, J. (2010) *Tratado de Enología*. Madrid: Ed Mundi-Prensa.
- Ibern-Gómez, M., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S., Singleton, V. L., & De La Torre-Boronat, M. C. (2000). Browning of cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. *American journal of enology and viticulture*, 51(1), 29-36.
- Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Ortega-Heras, M., & Pérez-Magariño, S. (2013). Sparkling wines produced from alternative varieties:

- sensory quality and evolution of phenolics during winemaking and aging. *American journal of enology and viticulture*, 64 (1), 39-49.
- Nunez, 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.
 - Organización Internacional de la Viña y el Vino (2004). *Resolución OENO 27/2004: Beta-glucanasas*. París: Ed. OIV.
 - Organización internacional de la viña y el vino (2013a). *Resolución OIV-OENO 497-2013: Monografía sobre paredes celulares de levadura (Cortezas de levaduras)*. París: Ed. OIV.
 - Organización internacional de la viña y el vino (2013b). *Resolución OIV-OENO 496-2013: Monografía sobre autolisados de levaduras*. París: Ed. OIV.
 - Organización internacional de la viña y el vino (2015). *Compendio de métodos internacionales de análisis de los vinos y mostos (2 volúmenes)*. París: Ed. OIV
 - Pagès, J.,(2005). Collection and analysis of perceived product inter-distances using Multiple Factor Analysis: Application to the study of 10 white wines from the Loire Valley. *Food Quality and Preference*, 16, 642–649
 - Palomero, F., Morata, A., Benito, S., González, M. C., & Suárez-Lepe, J. A. (2007). Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and on wine monomeric anthocyanin content. *Food chemistry*, 105(2), 838-846.
 - Pérez-Serradilla, J. A., & Lauque De Castro, M.D. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food Chemistry*, 111, 447-456.
 - Pozo-Bayón, M. Á., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., & Moreno-Arribas, M. V. (2009a). Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: From a traditional to an improved winemaking technology. *Trends in food science and technology*, 20, 289-299.
 - Pozo-Bayón, M. Á., Andújar-Ortiz, I., & Moreno-Arribas, M. V. (2009b). Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food research international*, 42(7), 754-761.
 - Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.
 - Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., & Vila-Crespo, J. (2012a). Effect of the addition of β -glucanase and commercial yeast preparations on the

- chemical and sensorial characteristics of traditional sparkling wine. *European food research and technology*, 235, 729-744.
- Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., Gómez, M., & Vila-Crespo, J. (2012b). Antioxidant properties of sparkling wines produced with β -glucanase and commercial yeast preparations. *Journal of food science*, 77, 1005-1010.
 - Sánchez-Palomo, E., Gómez García-Carpintero, E., Alonso-Villegas, R., & González-Viñas, M. A. (2010). Characterization of aroma compounds of Verdejo white wines from the La Mancha region by odour activity values. *Flavour and fragrance journal*, 25(6), 456-462.
 - Segarra Montaner, O. (2003). *La cultura del vino: Una guía amena para pasar de iniciado a experto en vinos*. Barcelona: Ed. Amat.
 - Segarra, I., Lao, C., López-Tamames, E., & De La Torre-Boronat, M. C. (1995). Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *American journal of enology and viticulture*, 46(4), 564-570.
 - Shively, C. E., & Henick-Kling, T. (2001). Comparison of two procedures for assay of free amino nitrogen. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(4), 400-401.
 - Stefenon, C. A., Bonesi, C. D. M., Marzarotto, V., Barnabé, D., Spinelli, F. R., Webber, V., & Vanderlinde, R. (2014). Phenolic composition and antioxidant activity in sparkling wines: Modulation by the ageing on lees. *Food chemistry*, 145, 292-299.
 - Stone, H., & Sidel, J.L. (2004). *Sensory Evaluation Practices*. London, UK.: Elsevier Academic Press.
 - Torresi, S., Frangipane, M. T., & Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food chemistry*, 129(3), 1232-1241.
 - Torresi, S., Frangipane, M. T., Garzillo, A. M., Massantini, R., & Contini, M. (2014). Effects of a β -glucanase enzymatic preparation on yeast lysis during aging of traditional sparkling wines. *Food research international*, 55, 83-92.
 - Unión Europea. Comisión Europea. (2009). Reglamento (CE) N° 607/2009 de la Comisión de 14 de julio de 2009 por el que se establecen determinadas disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n° 479/2008 del Consejo en lo que atañe a las denominaciones de origen e indicaciones geográficas protegidas, a los términos tradicionales, al etiquetado y a la presentación de

determinados productos vitivinícolas. Bruselas: *Diario Oficial de la Unión Europea*, 193, 60-139.

- Usseglio-Tomasset , L. (1998). *Química enológica*. Madrid: Ed. Mundi-Prensa.