



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Grado en Enología**

**IMPACTO DE DIVERSOS  
COADYUVANTES TECNOLÓGICOS  
EN LA CALIDAD DEL VINO  
ESPUMOSO TINTO**

**Alumno: Raúl Moyano Gracia**

**Tutor: Dr. José Manuel Rodríguez Nogales**  
**Cotutoras: Dra. Encarnación Fernández Fernández**  
**Dra. Josefina Vila Crespo**

**Julio de 2020**

Copia para el tutor/a

## Agradecimientos

Para llevar a cabo la investigación que resulta de este Trabajo de Fin de Grado conté con la colaboración de la empresa Agrovin, quienes nos suministraron gratuitamente los productos enológicos para realizar el estudio.

Por ello me gustaría dedicar una apartado a agradecerles su colaboración, sin la cual no hubiese podido realizar este trabajo.

A mis tutores, José Manuel, Encarna y Josefina por su dedicación y paciencia.

Por otro lado, también me gustaría agradecer a la Universidad de Valladolid, así como a su excelente equipo (docente y PAS) el cariño y la dedicación con la que tratan al alumnado.

A mis padres, sin los cuales esto no habría sido posible.

Gracias.

# Índice

	Pág.
0. Resumen.....	4
1. Introducción .....	5
1.1. Sistema de elaboración de espumosos con carbónico endógeno .....	6
1.2. Técnicas de mejora .....	8
1.3. Coadyuvantes procedentes de las levaduras y $\beta$ -glucanasas .....	8
2. Objetivos y plan de trabajo .....	11
3. Materiales y método .....	12
3.1. Protocolos de vinificación .....	12
3.2. Seguimiento de las fermentaciones .....	13
3.2.1. Seguimiento de la fermentación alcohólica .....	13
3.2.2. Seguimiento de la fermentación maloláctica .....	13
3.2.3. Seguimiento de la segunda fermentación alcohólica .....	13
3.3. Análisis físico-químico del mosto y el vino .....	13
3.4. Análisis sensorial de los vinos .....	15
3.5. Análisis estadístico .....	16
4. Resultados y discusión .....	17
4.1. Cinética de segunda fermentación .....	17
4.2. Análisis de componentes principales .....	18
4.3. Análisis de correspondencias simples .....	22
5. Conclusiones .....	24
6. Bibliografía .....	25

## Resumen

La elaboración de vinos espumosos tintos se encuentra muy limitada debido a la dificultad de integración de los diversos componentes con el gas carbónico, además la elección del momento de la vendimia es complicado por la diferencia de maduración entre los compuestos fenólicos y la concentración de azúcar.

En este trabajo se han estudiado el uso de diferentes coadyuvantes durante el periodo de segunda fermentación en botella con el objetivo de mejorar la calidad de los vinos y hacerlos más agradables a los consumidores. Se han utilizado diferentes herramientas como cortezas de levadura,  $\beta$ -glucanasas, levaduras inactivas y manoproteínas. Para comprobar el efecto, se han realizado análisis físico-químicos y hedónicos.

En función del coadyuvante, los vinos mostraron diferencias que también influyeron en los consumidores, haciéndolos más aceptables y por lo tanto mejorando la calidad.

## Abstract

The production of red sparkling wines is very limited due to the difficulty to integrate all the different components with carbon dioxide, also to choose the moment to harvest is complicated because of the difference in maturation between phenolic compounds and sugar concentration.

In this work, the use of different adjuvants during the second fermentation period in the bottle has been studied with the aim of improving the quality of wines and trying to make them more pleasant for consumers. Different tools such as wall yeast,  $\beta$ -glucanases, inactive yeast and mannoproteins have been used. To check the effect, physical-chemical and hedonic analyzes have been realized.

Depending on the adjuvant, wines showed differences that also influenced to consumers' opinion, making them more acceptable and therefore improving its quality.

## 1. Introducción

Dentro de la gran variedad de vinos tintos que existen en la actualidad en todo el mundo hay una especial, por la singularidad de su elaboración, que es la de los vinos tintos espumosos.

Los vinos espumosos comprenden una amplia gama según diferentes características como la variedad de uva empleada, las regiones donde se han producido o la metodología utilizada para su elaboración. Pero todos ellos tienen una característica común que es poseer gas carbónico disuelto, aunque este puede tener un origen exógeno o bien endógeno con una sobrepresión superior o igual a 3,5 atm. El proceso de elaboración tradicional actual se le atribuye al monje benedictino Dom Pierre Pérignon a finales del s. XVII en la abadía Benedictina de Hautvilles (Hidalgo, 2019).

El consumo de vinos espumosos se ha ido incrementando en los últimos años, aumentando hasta un 30% desde 2003 hasta 2013, esto supone un consumo hasta 15,4 millones de Hl.; en cambio los vinos tranquilos apenas crecieron un 7% durante el mismo periodo. Cabe destacar también que los principales productores de vino espumoso también se han deslocalizado. Tradicionalmente los principales países productores de vinos espumosos han sido los occidentales como Francia, Italia y España, pero para hacer frente al aumento de la demanda, han surgido grandes competidores en cuanto a la producción y consumo del vino espumoso se refiere, como pueden ser Rusia, Estados Unidos o Australia, lo cual ha supuesto también un notable aumento de la producción de hasta un 40% en el año 2014 (OIV, 2014).

En la actualidad, en España, la elaboración de espumosos tintos es muy limitada, principalmente, con variedades como Tinta de Toro, Monastrell y Tempranillo. El principal mercado de estos vinos es el internacional ya que para el mercado nacional se trata de un producto desconocido, aunque puede causar cierta curiosidad en los consumidores, según afirma un estudio realizado por Benito (2013). Actualmente la elaboración de espumosos tintos es muy limitada. Se trata pues de un vino novedoso y con buenas perspectivas de futuro en el mercado nacional, aunque con ciertas reservas.

Estas reservas vienen motivadas por la dificultad de elaboración que estos vinos conllevan, ya que la carga tánica y la presencia de gas carbónico dan lugar a una sensación en boca que puede ser desagradable si no se encuentran en equilibrio. Por otro lado, la efervescencia es una característica difícil de apreciar en fase visual debido a que la intensidad colorante que estos vinos presentan no permite observar las burbujas en su interior.

Otro de los inconvenientes que presenta la elaboración de estos vinos reside en la elección de la fecha de vendimia, ya que son muchos los parámetros a tener en cuenta, como son:

- El grado alcohólico probable: este debe ser bajo, ya que posteriormente se aumentará en una segunda fermentación alcohólica (FAL).
- La acidez total: al tratarse de un vino espumoso será necesaria una buena acidez para aportar frescor.
- La cantidad y calidad de los polifenoles: la vendimia con tanino muy verde y bajo contenido en polifenoles aportará al vino una astringencia y un verdor desagradables.

El problema principal radica en que los parámetros citados evolucionan de forma contraria al último, es decir, un elevado grado alcohólico conlleva una baja acidez pero una concentración correcta de polifenoles y viceversa, que por lo tanto dificulta mucho datar el inicio de la vendimia (Peña, 2001).

### 1.1. Sistema de elaboración de espumosos con carbónico endógeno

La elaboración de los vinos espumosos con gas carbónico de origen endógeno se compone por dos etapas bien diferenciadas. En una primera fase se elabora el vino base y en una segunda se desarrolla una segunda fermentación del vino base, en condiciones específicas que permitan la incorporación del gas carbónico producto de la fermentación, al vino, y la crianza del vino sobre las propias lías.

- Obtención del vino base: la elaboración del vino base sigue las mismas normas generales establecidas para la elaboración de los vinos blancos, tintos o rosados. Con unas características de graduación alcohólica moderada y acidez relativamente elevada.
- Segunda fermentación: este proceso comienza con la adición del licor de tiraje al vino base. Este está compuesto por una mezcla de vino base, azúcar a una concentración suficiente para obtener 6 atm de presión dentro de la botella, otros aditivos que faciliten la posterior sedimentación de las lías, junto con las levaduras activas que serán responsables de la segunda fermentación. El licor de tiraje se introduce en el recipiente donde se realizará la fermentación. Una vez finalizada, y dependiendo del sistema utilizado, el vino tendrá una crianza más o menos larga en contacto con las levaduras que se irán autolisando de forma gradual (fase de rima con lías en los métodos transfer y tradicional). Posteriormente finalizada la crianza, se procede a la adición del licor de expedición, que será variable en función del contenido de azúcar final deseado, y al embotellado.

Habitualmente, se utilizan diferentes métodos para la obtención de los vinos espumosos con gas carbónico de origen endógeno: el método charmat, el transfer o el tradicional (Hidalgo, 2019).

- El método charmat consiste en añadir el licor de tiraje para realizar una segunda fermentación dentro de un depósito isobárico, para su posterior estabilización, adición del licor de expedición si fuera conveniente y embotellado.
- El método transfer, a diferencia del charmat, realiza la segunda fermentación y la crianza sobre lías en botella, para posteriormente ser trasvasado a un depósito en el que se añade el licor de expedición, se estabiliza, se filtra y se embotella.

- El método tradicional (ilustración 1) se caracteriza por realizar la segunda fermentación, crianza y removido (aclarado en pupitre) en la propia botella. Finalmente se realiza un degüelle y se añade el licor de expedición.

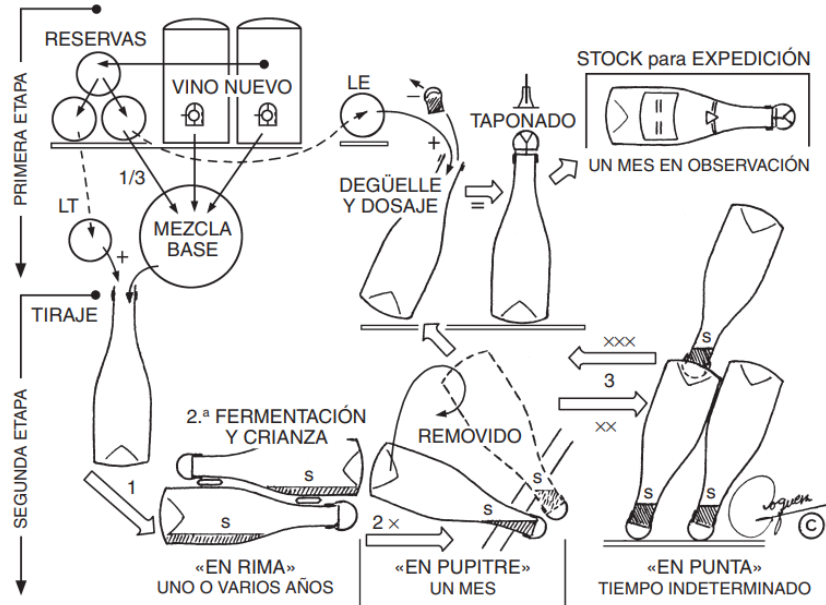


Ilustración 1: Diagrama de elaboración de los vinos espumosos de 2ª fermentación en botella por el método tradicional. 1, 2 y 3 fases sucesivas de crianza; LT, licor de tiraje; LE, licor de expedición; S, sedimentación de los residuos de fermentación en botella (Noguera y Seijo, 1973)

El proceso de crianza se torna clave en este tipo de elaboraciones, ya que durante el mismo se produce una autólisis de las propias levaduras responsables de la fermentación (con una duración de semanas a meses) que de forma paulatina liberan al medio una serie de compuestos que favorecen la mejora aromática y estabilidad física, química y microbiológica del vino. Estos compuestos, son principalmente (Suárez, 2003):

- Polisacáridos como las manoproteínas.
- Aminoácidos, pequeños péptidos y proteínas.
- Ácidos grasos y sus ésteres.
- Alcoholes volátiles, terpenos, aldehídos, lactonas y compuestos azufrados
- Ácidos nucleicos y vitaminas.

## 1.2. Técnicas de mejora

Existen diferentes técnicas que se pueden aplicar para mejorar tanto los vinos base producidos para la elaboración de los vinos espumosos tintos como la posterior fase de crianza. Estas técnicas pueden ser:

- Elaboraciones encaminadas a favorecer la extracción fenólica en el vino base como, por ejemplo, mediante la técnica de “delestage”, maceraciones prefementativas en frío o mediante el uso de enzimas pectinolíticas (Hidalgo, 2019).

Técnicas de desalcoholización del vino base para poder vendimiar en estado óptimo de madurez, mediante diferentes procedimientos como la diálisis (Huerta, 2019) o la pervaporación (Asensio, 2018).

- Uso de coadyuvantes derivados de las levaduras y  $\beta$ -glucanasas con el objetivo de incrementar la concentración de manoproteínas en el vino y así eliminar los caracteres desagradables como el amargor, la astringencia y el verdor excesivos (Rodríguez-Nogales et al., 2012).

A ese respecto, diversos estudios apuntan que la aplicación de manoproteínas,  $\beta$ -glucanasas y diferentes derivados de levaduras podrían aumentar la sensación en boca y el cuerpo, y dotar a los vinos de características más agradables (Pozo-Bayón et al., 2009; Rodríguez-Nogales et al., 2012; Suárez et al., 2005).

## 1.3. Coadyuvantes procedentes de las levaduras y $\beta$ -glucanasas

Para mejorar los procesos de vinificación se han diseñado distintos coadyuvantes que proceden de las levaduras de fermentación, como son las manoproteínas purificadas, las cortezas de las levaduras y las levaduras inactivas. Las manoproteínas proceden de la rotura de la pared debido a la acción de las propias  $\beta$ -glucanasas de las levaduras, las cortezas de levadura son estas mismas paredes sin sufrir ningún proceso enzimático y por último las levaduras inactivas son productos de degradación de la levadura en su totalidad. Estos coadyuvantes tienen un origen común, ya que proceden del proceso de autólisis de las levaduras.



La autólisis consiste en un proceso de degradación enzimática de las distintas partes de la levadura que tiene lugar tras la muerte de la célula. Esta degradación comprende por una parte la liberación de enzimas de hidrólisis, y por otra la destrucción de los componentes de la pared de las levaduras (manoproteínas, glucanos, oligosacáridos y quitina) que permiten su liberación al medio (ilustración 2) (Hidalgo, 2019). Este proceso tiene lugar en un vino sometido a un proceso de crianza sobre lías, como ocurre en un vino espumoso elaborado por el método tradicional.

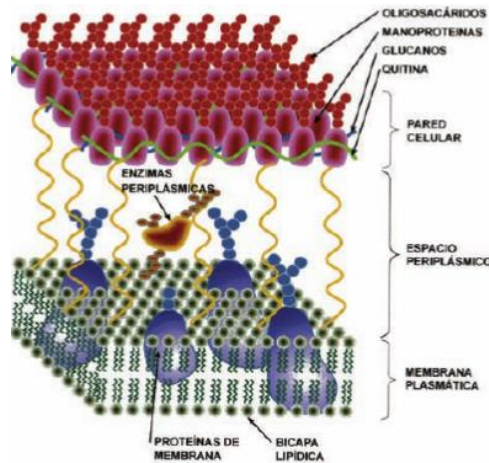


Ilustración 2: Estructura de la pared celular de las levaduras. (Hidalgo 2019)

Las manoproteínas son glicoproteínas compuestas principalmente por manosa y glucosa (>90%) (Del Barrio-Galán et al., 2012). Los estudios de Riou et al., (2002) y Poncet-Legrand et al., (2007) dieron a conocer que las manoproteínas de mayor peso molecular pueden formar complejos con los taninos dando lugar a unos agregados que poseen una mayor estabilidad del color. Además, la formación de estos agregados polisacárido-tanino son capaces de reducir la astringencia y aumentar la redondez de los vinos. Por otro lado, diversos polisacáridos también mejoran las características espumantes de los vinos espumosos, principalmente, por sus características de hidrofobicidad e hidrofiliidad (Moreno-Arribas et al., 2000).

Las cortezas de levadura se obtienen de la pared celular de *Saccharomyces* spp. Se encuentran autorizadas para su uso enológico con un límite de 40 g/HI (OIV, 2015b). Se utilizan en enología con diferentes objetivos, como pueden ser la intervención en las paradas de fermentación o como forma indirecta para aumentar el nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), ya que una adecuada cantidad de NFA garantiza un correcto desarrollo y finalización de la FAL. Para optimizar la efectividad de las cortezas es necesario garantizar la disponibilidad de las enzimas correspondientes que las hidrolicen, permitiendo la liberación al medio de las manoproteínas y oligosacáridos para obtener el beneficio que pueden aportar (Dubourdieu et al., 1981).

Las levaduras inactivas están formadas principalmente por el producto de degradación de las levaduras sometidas a un proceso de lisis inducida. Este coadyuvante está compuesto, principalmente, por polisacáridos, manoproteínas y glucanos, que son componentes de la pared celular, y por aminoácidos, péptidos, nucleótidos, diglicéridos, ácidos grasos y componentes volátiles (alcoholes terpénicos, ésteres, aldehídos y lactonas), que provienen del interior de la levadura. Su uso principalmente se destina como nutriente y fuente de NFA para un correcto desarrollo de la FAL, aunque también

se utiliza en los vinos con crianza sobre lías para acelerar el proceso de extracción aromática y disminuir los tiempos de crianza (Caridi, 2006). Otro de los usos en estudio de estos preparados es la reducción de la concentración de aminas biógenas en el vino y de la ocratoxina A (micotoxina producida por *Penicillium verrucosum* y *Aspergillus ochraceus*), cuya concentración máxima se encuentra regulada en el Reglamento de la UE 1881/2006, 19 de diciembre de 2006. Pero hay que tener en cuenta que, por otro lado, un uso inadecuado de estos productos puede llevar a la producción de otras aminas como la tiramina y la cadaverina que causan un defecto importante en el vino final (Pozo-Bayón et al., 2009).

Las  $\beta$ -glucanasas son enzimas capaces de descomponer los enlaces glucosídicos de los  $\beta$ -glucanos de la pared celular permitiendo la liberación al medio de glucosa y oligosacáridos (Dubourdieu et al., 1981). Además facilitan la liberación de nitrógeno en forma de aminoácido y pueden modificar las características organolépticas del vino, principalmente en cuanto a su composición volátil (Pozo-Bayón et al., 2009). El uso de esta herramienta disminuye notablemente el tiempo de liberación de los polisacáridos, acelerando por tanto el proceso de crianza sobre lías. Los estudios sobre la aplicación de  $\beta$ -glucanasas se han centrado principalmente en su uso en vinos tranquilos, pero los existentes en cuanto a espumosos afirman que se potencian de forma significativa las características de crianza sobre lías (Rodríguez-Nogales et al., 2012). Por otro lado el empleo de  $\beta$ -glucanasas también mejora la capacidad antioxidante de los vinos espumosos (Rodríguez-Nogales et al., 2012).

## 2. Objetivos y plan de trabajo

El objetivo general de la presente propuesta de Trabajo Fin de Grado (TFG) es estudiar el efecto de diferentes coadyuvantes tecnológicos procedentes de las levaduras y  $\beta$ -glucanasas sobre diversos parámetros de calidad del vino espumoso tinto.

Para ello se ha establecido un plan de trabajo con 5 puntos clave para el desarrollo del presente TFG:

1. Búsqueda de bibliografía: con el objetivo de conocer la situación actual del mercado y de las diferentes investigaciones llevadas a cabo en el campo de los vinos espumosos tintos.
2. Elaboración de los vinos espumosos tintos: en la bodega de la ETSIIAA se realizaron las elaboraciones con los diferentes productos de ensayo.
3. Caracterización físico-química y sensorial de los vinos espumosos: se han realizado diversas analíticas físico-químicas y pruebas sensoriales de los vinos espumosos.
4. Obtención de resultados: los datos obtenidos se han tratado con diversas herramientas estadísticas.
5. Redacción del TFG: antes de finalizar la fase práctica se comenzó a redactar el presente documento para continuar una vez realizados los análisis de los datos obtenidos.

En la ilustración 3 se muestra el diagrama de Grantt con las etapas del plan de trabajo del TFG y los tiempos de ejecución.

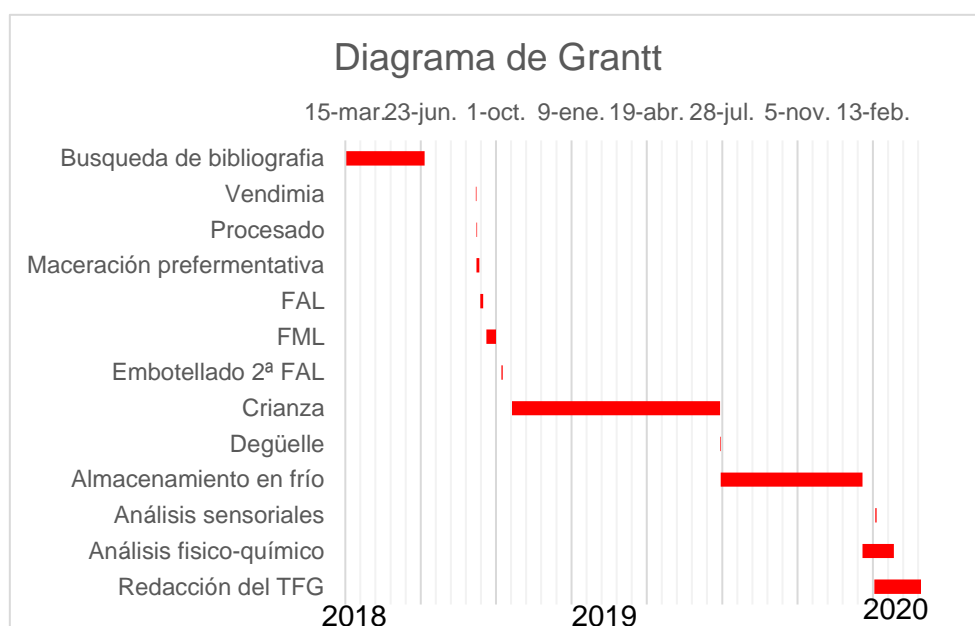


Ilustración 3. Diagrama de Grantt con las etapas del plan de trabajo. FML: Fermentación maloláctica. FAL: Fermentación alcohólica

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Protocolos de vinificación

Para la realización de este estudio, se ha empleado uva de la variedad Tempranillo de la vendimia 2018 procedente de la localidad de Villaveza del Agua (Zamora). La vendimia se realizó relativamente pronto con el objetivo de obtener unos parámetros adecuados para la elaboración de un vino espumoso. Esta uva fue congelada durante 8 días a una temperatura de -25°C.

La elaboración del vino base tinto comenzó con un despalillado y estrujado de la vendimia descongelada, utilizando una despalilladora de paletas y una estrujadora de perfiles conjugados o estriados. Se obtuvieron 150 kg de pasta tinta que fueron encubados en dos depósitos de acero inoxidable de 100 y 50 litros. La pasta se sulfitó a razón de 3,5 g/Hl de SO<sub>2</sub> utilizando metabisulfito potásico (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Se realizó una maceración prefermentativa en frío a 4°C durante 4 días para aumentar la extracción de compuestos fenólicos. Además a esta pasta se le añadieron enzimas a base pectinasas y hemicelulasas en dosis de 1 y 6 g/Hl respectivamente ([Lallzyme HC®](#) y [Lallzyme EX®](#), Lallemand, Francia) con el objetivo de mejorar la extracción de polifenoles de la piel tanto en cantidad como en calidad. Finalmente se obtuvo un mosto con unos valores de 16,1° Brix y un pH de 3,33.

Para asegurar el correcto desarrollo de la FAL se realizó una siembra de levaduras *Saccharomyces bayanus* en dosis de 30 g/Hl ([Viniferm BY®](#), Agrovin, España). La fermentación se desarrolló durante 7 días a una temperatura de 25°C. Posteriormente se realizó un prensado a 1,5 bares mediante una prensa horizontal de membrana parietal. Finalizado el prensado se realizó un trasiego para homogeneizar el vino prensa y el vino yema.

Una vez completada la FAL se realizó una inoculación de bacterias lácticas (BAL) *Oenococcus oeni* ([Lalvin VP41](#), Lallemand, Francia) a la dosis de 1 g/Hl para continuar el proceso de elaboración con la fermentación maloláctica (FML) y cuyo seguimiento se realizó mediante cromatografía en papel hasta obtener los resultados que indicaron el final de la FML. Por último, se realizó el trasiego previo al embotellado.

Para la elaboración del vino espumoso se siguió el método tradicional de segunda fermentación en botella. Se realizaron un total de 5 lotes elaborados con diferentes coadyuvantes y se incluyó un lote control sin coadyuvante. Todos los coadyuvantes fueron suministrados gratuitamente por la empresa Agrovín, S.A. (Alcázar de San Juan, España).

A continuación, se indican los diferentes coadyuvantes, su nombre comercial y la dosis empleada:

- β-Glucanasas (Enozym Glucan®, 5 g/Hl)
- Cortezas de levadura con tanino elágico (ManoArome®, 37,5 g/Hl)
- Manoproteínas (Manoplus®, 10 g/Hl)
- Levaduras inactivas (SuperBouquet®, 30 g/Hl)
- Cortezas de levadura (SuperBouquet MN®, 30 g/Hl)

Para la elaboración del licor de tiraje se realizaron los cálculos que dieran lugar a 6 atm de sobrepresión en el interior de la botella añadiendo 25,2 g/l de sacarosa. La adición

de los diferentes coadyuvantes, objetivo del presente ensayo, se realizó en el licor de tiraje previa a la segunda FAL a la dosis media recomendada por los fabricantes. Con la única excepción de las manoproteínas purificadas que se añadieron tras el degüelle en el licor de expedición por indicaciones del fabricante. Además, la siembra de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* ([Viniferm BY®](#), Agrovin, España) se realizó a la dosis de 40 g/Hl junto con un clarificante a base de bentonita ([Bengel®](#), Agrovin, España) a la dosis de 20 g/Hl, con el objetivo de facilitar el posterior removido y degüelle del vino final.

Durante toda la fase de la segunda FAL las botellas se mantuvieron en posición horizontal a una temperatura constante de 17°C realizando un proceso de crianza sobre lías de 9 meses hasta su degüelle. Posteriormente se rellenaron las botellas con el correspondiente licor de expedición formado por el vino espumoso del propio lote. El cierre o taponado de la botella se realizó con un tapón tipo corona. Los vinos espumosos obtenidos se almacenaron en cámara frigorífica a 5°C durante 6 meses hasta su análisis.

### 3.2. Seguimiento de las fermentaciones

#### 3.2.1. Seguimiento de la fermentación alcohólica

Para realizar el seguimiento de la FA, se tomaron medidas de densidad y temperatura diarias para garantizar el correcto desarrollo de la fermentación previa homogenización de la pasta mediante bazuqueo. Se dio por finalizada cuando la densidad alcanzó un valor cercano a 990 g/l. Además, se procedió a realizar un análisis de azúcares reductores mediante el método Rebelein (OIV-MA-AS311-01A) para determinar la presencia de azúcares fermentables en el vino.

#### 3.2.2. Seguimiento de la fermentación maloláctica

Con la finalidad de hacer el necesario seguimiento de la FML se realizaron varias cromatografías en papel (Lucero, 2009). La primera al inicio del proceso y las posteriores con un intervalo de 3 días entre ellas hasta observar la desaparición del ácido málico en las mismas, esto sucedió pasados 13 días.

#### 3.2.3. Seguimiento de la segunda fermentación alcohólica

Se colocó un afrometro en una botella de cada lote para medir el incremento de presión resultado de la segunda FAL.

### 3.3. Análisis físico-químicos del mosto y el vino

A continuación, se detallan los fundamentos y métodos utilizados para los diferentes análisis realizados:

- pH: se basa en la medida de la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en la muestra de estudio (OIV, 2011).
- Grado alcohólico probable: mediante refractometría, cuyo análisis se fundamenta en la variación del índice de refracción en función de la concentración de azúcares fermentables (OIV, 2012).

- Acidez total: la acidez total es la suma de todos los ácidos presentes en una muestra dada, su fundamento es la diferencia de potencial realizando valoración con NaOH 0,1N (OIV, 2015a).
- Acidez volátil: la acidez volátil trata de cuantificar los ácidos volátiles derivados del ácido acético presentes en una muestra dada. Se empleó el método García-Tena (Barceló, 1990).
- Grado alcohólico: este método se fundamenta en la gran diferencia entre los puntos de ebullición del agua y el alcohol, tomando como referencia la temperatura del agua en las condiciones ambientales. Se empleó el método por ebulloimetría (Barceló, 1990).
- Sulfuroso libre y total: mediante el método Ripper automatizado con el equipo SO<sub>2</sub>-Matic 23 (Crison, L'Hospitalet de Llobregat, España) (Barceló, 1990).
- Índice de polifenoles totales: mediante espectroscopía UV se determina la absorción que presenta la muestra a una longitud de onda de 280 nm, ya que el núcleo bencénico de los polifenoles tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de onda (Betés-Saura et al., 1996; Zamora, 2003).
- Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA): el nitrógeno amónico y  $\alpha$ -amino, reacciona con el formaldehído liberando 2 H<sup>+</sup> que son valorados mediante NaOH (Shively et al., 2001).
- Proteínas solubles: está basado en la capacidad del colorante azul brillante de Coomassie de unirse a las proteínas. El máximo de absorbancia del colorante (465 nm) cambia a 595 nm cuando se une a las proteínas (Murphey et al., 1989).
- Contenido en polisacáridos totales: en presencia de ácido sulfúrico los polisacáridos se degradan y forman complejos coloreados con fenol que permiten su determinación a 485 nm (Lindner y Shomer, 1984).
- Ácidos hidroxicinámicos: mediante espectroscopía UV se mide la absorción que presenta la muestra a 320 nm (Betés-Saura et al., 1996).
- Flavonoles: mediante espectroscopía UV se mide la absorción que presenta la muestra a 365 nm (Betés-Saura et al., 1996).
- Características cromáticas: las características cromáticas vienen dadas por su espectro de absorción a unas longitudes de onda dadas. Estas medidas permiten determinar y definir la intensidad colorante y la tonalidad (Mazza et al., 1999).
- Taninos totales: en medio ácido los taninos son liberados y en presencia de calor, por rotura de los enlaces intermonoméricos, pueden dar lugar a sus antocianidinas, que posteriormente se miden a 550 nm (Bate-Smith, 1981).
- Calidad de la espuma: para la medida de la calidad de la espuma del vino espumoso se empleó un aparato Mosalux. Las muestras de vino se analizaron, en el Centro Tecnológico del Vino (VITEC, Falset). Este método se basa en inyectar un gas a un flujo (7 l/h) y una presión (100 kPa) constantes para provocar que el vino espumoso (previamente desgasificado) forme espuma. La altura de la espuma a lo largo del tiempo se registra gracias a un conjunto de emisores y captadores de luz infrarroja colocados a ambos lados de la probeta. Se determinaron los siguientes parámetros (Trujillo, 1996):

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

Todos los análisis se realizaron por duplicado en dos botellas de vino distintas (n=4).

#### 3.4. Análisis sensorial de los vinos

El análisis sensorial se realizó mediante un grupo de 92 consumidores de los cuales el 51,1% eran hombres y el 48,9% mujeres, estando comprendidos el 73% entre los 21 y 30 años (Tabla 1).

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS DE LOS CONSUMIDORES (N=92)

RANGO DE EDAD	HOMBRES (%)	MUJERES (%)	TOTAL (%)
<20	8,7%	6,5%	15%
21-30	37,0%	37,0%	73%
31-40	0,0%	2,2%	2%
41-50	1,1%	2,2%	3%
51-60	3,3%	1,1%	4%
>60	1,1%	0,0%	1%
<b>TOTAL (%)</b>	<b>51,1%</b>	<b>48,9%</b>	<b>100%</b>

Estos consumidores realizaron, en primer lugar, una prueba de aceptabilidad puntuando diferentes características como color, olor, sabor, picor, persistencia en boca y aceptabilidad global utilizando una escala hedónica de 9 puntos.

Posteriormente realizaron una prueba CATA (Check-All-That-Apply) (Varela y Ares, 2012) también llamada “marque todo lo que corresponda”, que es una alternativa al análisis descriptivo clásico, caracterizada por su facilidad de uso con consumidores. Consistió en presentar a los consumidores una lista de 19 términos, incluyendo tanto aspectos sensoriales como hedónicos, para que indicaran qué descriptores o características describían cada muestra. Los diferentes descriptores se seleccionaron en base a la bibliografía (McMahon et al., 2017) y fueron los siguientes: color violáceo,

color rojo intenso, color rojo evolucionado, olor intenso, alcohólico, picante o aguja, cremoso, astringente, volumen, dulce, ácido, amargo, herbáceo, afrutado, caramelo, tostado, persistente, equilibrado y aceptable

Las muestras de vino se presentaron en copas tipo flauta, con códigos aleatorios de tres dígitos y se presentaron a cada consumidor siguiendo un diseño de bloques completamente aleatorizado. Se sirvieron 25 ml de cada muestra de vino espumoso a una temperatura entre 6-8°C.

Todas las pruebas de análisis sensorial se realizaron en la sala de cata de la ETSIIAA en cabinas individuales diseñadas de acuerdo con la norma UNE- ISO 8589 (2010).

### 3.5. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos, tanto analíticos como sensoriales, se han utilizado dos programas específicos para el tratamiento de datos, Statgraphics Centurion XVII (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, USA) e IBM SPSS Statics versión 24 (IBM, Armonk, USA). Se realizaron análisis de componentes principales (ACP) y análisis de correspondencias (AC).



## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Cinética de segunda fermentación

En la figura 1 se muestra la cinética de la segunda fermentación de los distintos vinos espumosos. Se observa un incremento continuado de la presión dentro de la botella hasta estabilizarse a un valor de 6 atm. Hay que indicar que la dosis de sacarosa que se añadió en el licor de tiraje se ajustó para alcanzar la presión de 6 atm. La duración de la fermentación fue la misma para todos los lotes, dándose por finalizada el día 4 de diciembre del 2018 tras 40 días. Realizando una comparativa de las curvas, no se puede afirmar que el uso de coadyuvantes haya tenido ningún tipo de influencia en la velocidad de desarrollo en la segunda FAL.

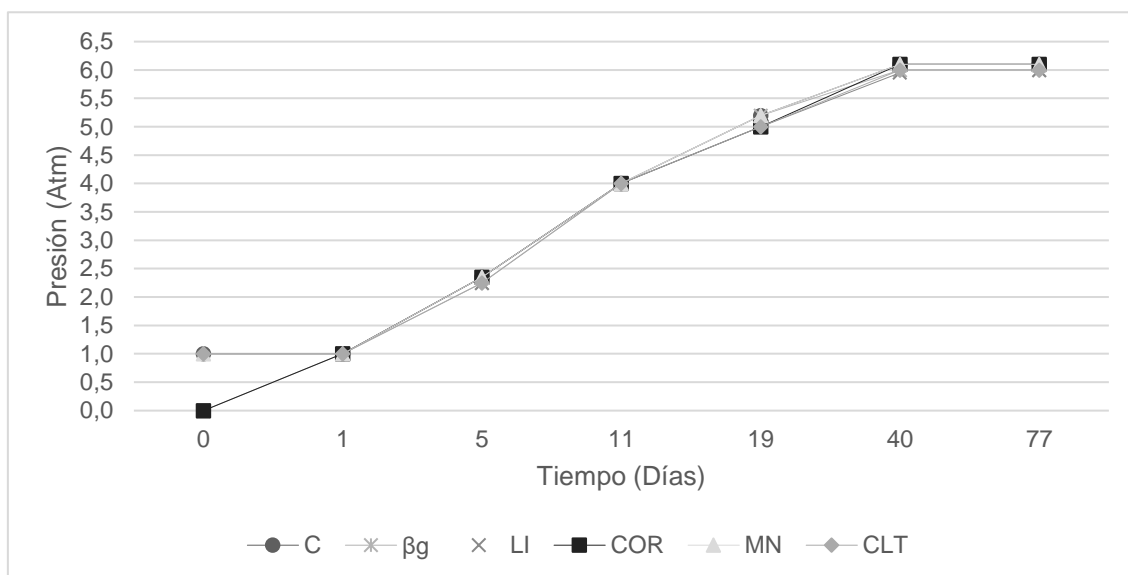


Figura 1. Cinética de la segunda fermentación de los distintos lotes de vinos espumosos.

Símbolos: B-Glucanasas ( $\beta g$ ), Levaduras inactivas (LI), Cortezas de levadura (COR), manoproteínas (MN), Cortezas de levadura + Tanino (CLT), Control (C).

## 4.2 Análisis de componentes principales

Se realizó un ACP de los datos obtenidos mediante análisis físico-químico y sensorial hedónico (prueba de aceptabilidad) de los vinos espumosos, con el objetivo de estudiar las relaciones que presentan los diferentes vinos en función de las distintas variables estudiadas, de forma que quede reflejada la mayor información posible.

En la figura 2 se muestra la distribución de los vinos y de los parámetros analizados en el espacio vectorial definido por las componentes principales 1 (CP1) y 2 (CP2) cuyos datos vienen mostrados en la tabla 2. Las dos primeras componentes principales explican el 56,6% de la varianza total de los datos. La CP1 muestra el 30,3% de la variabilidad de los datos, y se encuentra correlacionada positivamente con los parámetros de acidez total, azúcares residuales, polisacáridos, persistencia de la espuma, grado alcohólico, tiempo de estabilidad de la espuma, color y olor y persistencia en boca, y negativamente por acidez volátil, proteínas, NFA, índice de color, tonalidad, índice de polifenoles totales, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, taninos, espumabilidad, sabor y picor. Por otro lado, la CP2 explica el 26,3% de la variabilidad de los datos, y se encuentra correlacionada positivamente con acidez total, acidez volátil, azúcares residuales, proteínas, NFA, polisacáridos, índice de color, tonalidad, flavonoles, espumabilidad, permanencia, olor, sabor y picor, y negativamente con los parámetros de índice de polifenoles totales, ácidos hidroxicinámicos, taninos y color.

TABLA 2: PESOS DE LOS COMPONENTES EN EL ACP.

Variables*	CP1	CP2
<b>AHC</b>	-0,3162	0,0909
<b>AR</b>	0,0618	-0,1607
<b>AT</b>	0,1955	-0,3157
<b>AV</b>	-0,2332	-0,1018
<b>FLA</b>	-0,3200	-0,0423
<b>GA</b>	0,0068	0,0418
<b>Hm</b>	-0,0716	-0,2314
<b>Hs</b>	0,1153	-0,0379
<b>IC</b>	-0,0320	-0,1275
<b>IPT</b>	-0,2781	0,1910
<b>NFA</b>	-0,2151	-0,2081
<b>POL</b>	0,1541	-0,2516
<b>Prot</b>	-0,2569	-0,2708
<b>TAN</b>	-0,1767	0,3257
<b>TON</b>	-0,2715	-0,1726
<b>Ts</b>	0,1711	-0,3545
<b>ACEPT</b>	-0,1333	-0,3564
<b>COLOR</b>	0,1942	0,0386
<b>OLOR</b>	0,3011	-0,0679
<b>PER_boca</b>	0,3240	-0,1460
<b>PICOR</b>	-0,216206	-0,229617
<b>SABOR</b>	-0,189263	-0,30921

\*Codificación: AHC: ácidos hidroxicinámicos; AR: azúcares reductores; AT: acidez total ; AV: acidez volátil; FLA: flavonoles; GA: grado alcohólico; ); Hm: espumabilidad (mm); Hs: persistencia de la espuma (mm); IC: índice de color; IPT: índice polifenoles totales; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable; POL: polisacáridos; Prot: proteínas totales; TAN: taninos ; TON: tonalidad; Ts: tiempo de estabilidad de la espuma (sACEPT: aceptabilidad global; COLOR; OLOR; PER\_boca: persistencia en boca; SABOR; PICOR.

La figura 2 muestra de forma muy visual los efectos de los diferentes coadyuvantes en la elaboración del vino espumoso, con una clara diferencia respecto al control que se encuentra localizado en el espacio definido por los valores positivos de la CP1 y la CP2. Observándose también que en el plano se encuentran tres grupos de vinos espumosos bien diferenciados respecto a sus características físico-químicas y hedónicas.

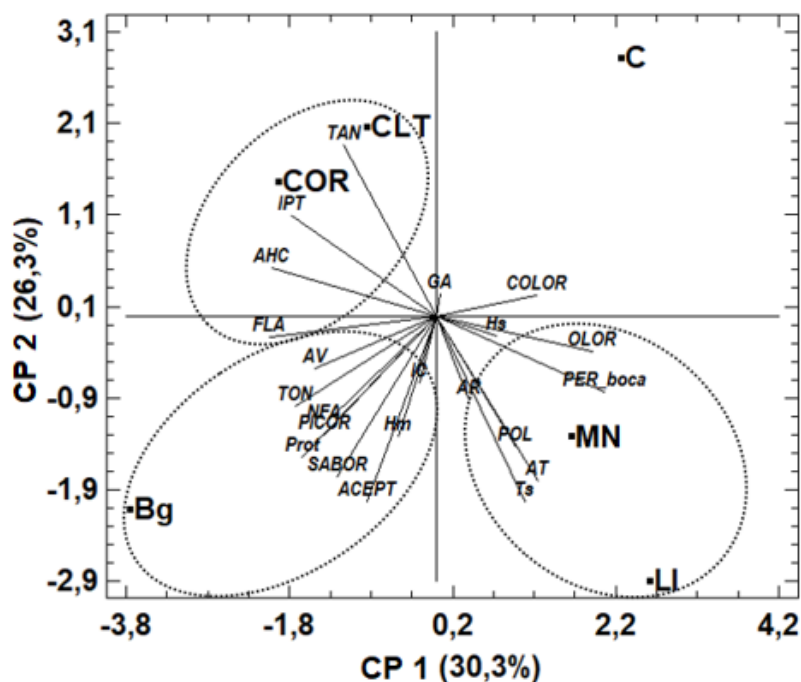


Figura 2: Análisis por componentes principales de las muestras de vino y las características físicoquímicas y sensoriales.

Símbolos:  $\beta$ -Glucanasas (Bg: 5 g/HI), Levaduras inactivas (LI: 30 g/HI), cortezas de levadura (COR: 30 g/HI), manoproteínas (MN: 10 g/HI), cortezas de levadura + tanino (CLT: 37,5 g/HI), Control (C).

AV: acidez volátil; AT: acidez total; GA: grado alcohólico; IC: índice de color; IPT: índice polifenoles totales; AR: azúcares reductores; Prot: proteínas totales; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable; POL: polisacáridos; TON: tonalidad; AHC: ácidos hidroxicinámicos; FLA: flavonoles; Ts: tiempo de estabilidad de la espuma (s); Hm: espumabilidad (mm); Hs: persistencia de la espuma (mm); ACCEPT: aceptabilidad global; PER\_boca: persistencia en boca; COLOR; OLOR; SABOR; PICOR.

En primer lugar, en el espacio con valores positivos para CP1 y negativos para CP2 se encuentran los vinos tratados con manoproteínas purificadas y levaduras inactivas. Estos vinos mostraron mejoras en diferentes caracteres como son una mayor acidez total, un mayor contenido en polisacáridos totales, un mayor tiempo de estabilidad de la espuma y una ligera mejora en la persistencia de la espuma. Respecto a las características sensoriales, se observa en la figura 2 que estos vinos se caracterizan por una muy buena valoración en los atributos de olor y persistencia en boca.

El coadyuvante compuesto por levaduras inactivas presenta en su composición un elevado contenido en polisacáridos y manoproteínas, mientras que el otro coadyuvante está compuesto por manoproteínas purificadas. De este modo, la mayor acidez total observada en estos vinos espumosos podría deberse a que las manoproteínas

contenidas en ambos coadyuvantes tecnológicos ejercen un papel de coloide protector frente a las precipitaciones tartáricas (Caridi, 2006; Hidalgo, 2019), favoreciendo de una forma importante al mantenimiento de la acidez total.

Del mismo modo, estos vinos presentaron mayores contenidos en polisacáridos totales fruto de la propia composición de estos dos coadyuvantes. El contenido en polisacáridos totales tiene una gran importancia en la calidad de la espuma, especialmente en la estabilidad de la espuma. Se ha descrito que los polisacáridos que provienen de las levaduras (manoproteínas) presentan propiedades hidrófobas y son capaces de adherirse a las burbujas de anhídrido carbónico protegiéndolas y evitando su rotura (Blasco et al., 2011). Los resultados de nuestro estudio, se encuentran en concordancia con los realizados por Moreno-Arribas et al. (2000), observándose que los vinos con mayor contenido en manoproteínas y polisacáridos mostraban mejores características en lo que al tiempo de estabilidad de la espuma se refiere.

Los vinos elaborados con manoproteínas y levaduras inactivas obtuvieron los mejores resultados para la persistencia en boca, atributo que evalúa el postgusto que el vino generaba en el consumidor. Las manoproteínas aumentan el “cuerpo” de un vino y lo dotan de un volumen en boca que genera una sensación agradable tras ingerirlo; además son capaces de formar complejos estables con los taninos que disminuyen la sensación de astringencia (Meza, 2012). Diversos estudios realizados sobre la injerencia de las manoproteínas en la elaboración de vinos, confirman que estos compuestos mejoran la calidad y aceptabilidad de los vinos (Navascués, 2006).

En segundo lugar, en el plano vectorial definido por valores negativos para la CP1 y positivos para la CP2, se encuentran los vinos tratados con cortezas de levadura y los vinos elaborados con corteza de levadura y tanino elágico. Estos vinos presentan mayores valores para el índice de polifenoles totales, taninos, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles.

El contenido en taninos, como se esperaba, ha sido notablemente superior en el caso del vino elaborado con cortezas de levaduras y tanino elágico, ya que como indica el fabricante este coadyuvante es una mezcla de corteza de levadura con tanino elágico. La elevada concentración de taninos de los vinos elaborados con las cortezas de levadura podría explicarse por un efecto de adsorción por las paredes de las levaduras que evita la formación de complejos de taninos susceptibles de precipitar (Dulau et al., 1994).

El índice de polifenoles totales se encuentra directamente relacionado con el contenido en tanino, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles ya que son unos de los principales componentes de este índice. Por otro lado, las cortezas de levadura poseen un efecto antioxidante debido a su capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos que impide su polimerización y oxidación (Suárez et al., 2015)

En tercer lugar, en el plano vectorial definido por valores negativos para la CP1 y negativos para la CP2 se sitúan los vinos tratados con  $\beta$ -glucanasas, con un importante número de variables que se encuentran fuertemente relacionadas entre sí. Estos vinos presentaron un mayor valor para los parámetros de color (índice de color y tonalidad), contenido en proteínas solubles y NFA, y para los atributos sensoriales picor, sabor en boca y aceptabilidad global.

Respecto a las medidas cromáticas, los vinos con  $\beta$ -glucanasas obtuvieron los mejores valores para el índice de color, así como para la tonalidad. Esto podría deberse principalmente al efecto protector sobre los antocianos de las manoproteínas y los polisacáridos derivados de la degradación de la pared celular de las levaduras por las enzimas  $\beta$ -glucanasas (Morata et al., 2003). Cabe destacar que las manoproteínas

liberadas por las enzimas  $\beta$ -glucanasas tienen distinta naturaleza a las añadidas en el ensayo de las manoproteínas purificadas ya que los métodos de extracción son muy diferentes. En el caso de las manoproteínas purificadas, estas han sido obtenidas mediante procedimientos de autólisis térmica para acelerar el proceso. Este método da lugar a moléculas de manoproteínas muy heterogéneas con un peso de entre 10,0 y 21,5 KDa, mientras que las manoproteínas producto de la degradación enzimática poseen un peso mayor de entorno a los 30 KDa (Núñez et al., 2006).

En cuanto al contenido de proteínas solubles, este se encuentra directamente relacionado con el contenido en NFA. Como en el caso anterior esta mayor concentración probablemente se debe a la acción de las enzimas  $\beta$ -glucanasas. Cabe destacar que estas manoproteínas liberadas por las enzimas  $\beta$ -glucanasas tienen distinta naturaleza a las añadidas en el ensayo de manoproteínas (MN) ya que los métodos de extracción son muy diferentes (Dubourdieu y Moine-Ledoux, 2007).

Por otro lado, el vino tratado con  $\beta$ -glucanasas presentó mejores características en cuanto a espumabilidad se refiere. Esta propiedad estuvo relacionada con los mayores niveles de proteínas y NFA observados en estos vinos. Es conocido que las proteínas presentes con pesos de 420 KDa tienen un efecto de mejora en la espumabilidad debido a las propiedades físicas de hidrofobicidad (Martínez-Lapuente et al., 2015; Nuñez et al., 2005; Torresi et al., 2014). Por otro lado, los aminoácidos al pH del vino presentan carga positiva y se comportan como compuestos surfactantes con grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Los aminoácidos se retienen en la interfase aire-líquido de las burbujas reduciendo la tensión superficial del vino y, por lo tanto, mejorando la capacidad de formación de espuma (Martínez-Lapuente et al., 2015).

En el caso de los atributos sensoriales, el vino con  $\beta$ -glucanasas presentó mejores valoraciones para el picor en boca, sabor y aceptabilidad global. En el caso del picor, este atributo se describe como el efecto que el gas carbónico ejerce en la boca, y a ese respecto obtuvo buena valoración por parte de los consumidores. Este parámetro se encontró estrechamente relacionado con la espumabilidad y, en ese sentido, las  $\beta$ -glucanasas han resultado ser mejorantes en cuanto a la sensación que la espuma produce en la boca. También, se obtuvo una mayor valoración en cuanto al sabor. De hecho, estos vinos presentaron un mayor contenido en proteínas y aminoácidos, compuestos que intervienen en el sabor del vino (Bell y Henschke, 2005). Por último, los vinos con  $\beta$ -glucanasas obtuvieron una mayor aceptabilidad global, pudiendo concluir que este coadyuvante es el que más gustó al panel de consumidores, que estaba formado mayoritariamente por gente joven (73% de los consumidores con edades entre 21 y 30 años).

### 4.3. Análisis de correspondencias

Los datos obtenidos en la prueba CATA (Check-All-That-Apply) se procesaron mediante análisis de correspondencias (AC) con el objetivo de describir las relaciones entre los distintos descriptores y las muestras. Se utilizó la frecuencia de mención de cada atributo en la prueba CATA contando el número de consumidores que usaron cada término para describir cada muestra. Como en el caso anterior, en la figura 3 se observa que las zonas están muy bien diferenciadas. La primera y segunda dimensión del AC explicaron el 39,9% y el 24,2% de la variabilidad de los datos, respectivamente.

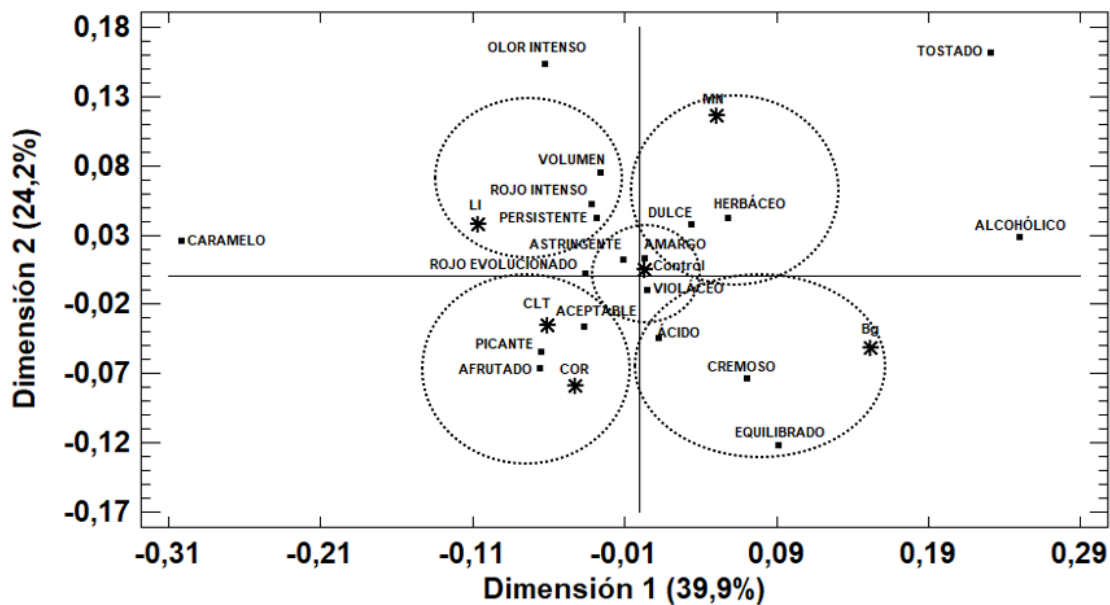


Figura 3. Análisis de correspondencias (AC) extraído mediante CATA.

Símbolos: B-Glucanasas (Bg: 5 g/HL), Levaduras inactivas (LI: 30 g/HL), Cortezas de levadura (COR: 30 g/HL), Manoproteínas (MN: 10 g/HL), Cortezas de levadura + TANINO (CLT: 37,5 g/HL), Control (C).

En el espacio con valores positivos en D1 y negativos en D2 se encuentran los vinos tratados con  $\beta$ -glucanasas, que se caracterizan por ser cremosos, ácidos y equilibrados. En relación con el ACP (figura 2), la cremosidad puede deberse a las buenas características de espumabilidad y al elevado contenido de proteínas de estos vinos que generarían sensación de untuosidad en la boca (Brissonnet y Maujean, 1991; García et al., 2009). Respecto al carácter equilibrado, esta característica en general es una de las más valoradas en un análisis sensorial ya que un desequilibrio en boca genera una sensación desagradable, en consecuencia, las  $\beta$ -glucanasas obtuvieron la mejor calificación respecto al sabor que sería explicado por el equilibrio que posee (Bell y Henschke, 2005). Finalmente, la acidez también forma parte de uno de los principales caracteres que describirían este vino siendo además agradable, ya que obtuvo las mejores valoraciones desde el punto de vista del sabor y de la aceptabilidad global en la prueba de aceptabilidad (figura 2).

Por otro lado, en la zona con valores negativos para D1 y D2 encontramos los vinos con cortezas de levadura y corteza de levadura + tanino, estos vinos podrían describirse

mediante los caracteres de picantes, afrutados, y aceptables. En relación con la prueba de aceptabilidad (figura 2), también se sitúan como vinos con características similares. En este caso los descriptores que los caracterizan les aportan una mayor aceptación por parte de los consumidores.

En cuanto a los vinos tratados mediante levaduras inactivas, situados en la zona negativa de la D1 y la positiva de la D2, se caracterizan por ser persistentes, voluminosos y poseer un color rojo intenso. En relación con la persistencia en boca, los vinos con levaduras inactivas han mostrado la mejor valoración en este atributo tanto en la prueba de aceptabilidad como en la de CATA, así como en el análisis de estabilidad de la espuma. Estos resultados están relacionados con los productos de degradación de las levaduras y sus propiedades hidrófobas (Blasco et al., 2011). Respecto al color, estas muestras fueron catalogadas como vinos de color rojo intenso, color que fue valorado positivamente en el análisis de aceptabilidad. Además, estos vinos se caracterizaron por ser voluminosos en boca, lo que está relacionado con su mayor contenido en polisacáridos, así como con su mayor tiempo de estabilidad de la espuma al ser ingeridos (figura 2).

Los vinos con manoproteínas, localizados en la parte positiva de la D1 y de la D2, resultaron ser catalogados por los consumidores como vinos dulces y herbáceos. En este caso, también sería importante relacionarlo con los parámetros físico-químicos ya que esta muestra presentaba mayor concentración de azúcares residuales (dentro de un vino seco con azúcares <2 g/l) generando por tanto esa sensación descrita por los consumidores como dulce. Por otro lado, el carácter herbáceo podría deberse a la temprana vendimia que se realizó para elaborar el vino base. Es posible que para reducir este carácter sea conveniente prolongar más el tiempo entre la adición de las manoproteínas en el licor de expedición y su degustación.

Finalmente, el control se encuentra situado en el centro, y está caracterizado por sabor amargo, sensación de astringencia y color violáceo. Respecto al color, este carácter fue el mejor valorado en el vino control por los consumidores en la prueba hedónica como muestra la figura 2, siendo por tanto el color violáceo el más apreciado según la prueba CATA. Los atributos de astringencia y amargor han sido los predominantes en el control, esto ocurre porque al no recibir ningún tipo de tratamiento, el vino no ha suavizado los taninos responsables de la astringencia y del amargor.

## 5. Conclusiones

Tras el estudio de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El uso de coadyuvantes no ha influido en la velocidad de desarrollo de la segunda FAL en botella.
- Los vinos tratados con cortezas de levadura con o sin tanino obtuvieron resultados similares desde el punto de vista físico-químico y hedónico. No hallándose diferencias entre ellas.
- Los vinos con manoproteínas y levaduras inactivas también obtuvieron resultados similares en los análisis físico-químicos. Con mejores resultados de acidez total y persistencia de la espuma que el resto.
- Las  $\beta$ -glucanasas mejoraron las características de espumabilidad y tono, así como el contenido en proteínas y nitrógeno fácilmente asimilable del vino.
- Desde el punto de vista sensorial, los vinos tratados con cortezas de levadura fueron los más aceptados por los consumidores y mejores características de picor y sensación afrutada.
- El vino con  $\beta$ -glucanasas fue el mejor valorado y más equilibrado según los consumidores.
- El vino control no destacó positivamente por ningún parámetro y fue valorado por los consumidores como amargo y, por lo tanto, demostrando que los tratamientos con coadyuvantes han sido efectivos.



## 6. Bibliografía

- Asensio, J. (2018). *Uso de pervaporación en la desalcoholización de vinos blancos*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Valladolid. Disponible en <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/31725>
- Barceló, J. G. (1990). *Técnicas analíticas para vinos. Cap 1-6*. Retrieved from <http://shop.gabsystem.com/data/descargas/Capitulo 1-6.pdf>
- Bate-Smith, E. C. (1981). Astringent tannins of the leaves of Geranium species. *Phytochemistry*, 20(2), 211–216. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85095-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85095-9)
- Bell, S. J., y Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- Benito, L. (2013). *Marketing del vino : ¿ Cuántos colores puede tener el cava ?*. Trabajo fin de Grado. Universidad de la Rioja
- Betés-Saura, C., Andrés-Lacueva, C., y Lamuela-Raventós, R. M. (1996). Phenolics in white free run juices and wines from penedès by high-performance liquid chromatography: changes during Vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10), 3040–3046. <https://doi.org/10.1021/jf9601628>
- Blasco, L., Viñas, M., y Villa, T. G. (2011). Proteins influencing foam formation in wine and beer: The role of yeast. *International Microbiology*, 14(2), 61–71. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.136>
- Brissonnet, F., y Maujean, A. (1991). Identification of some foam-active compounds in champagne base wines. *American journal of enology and viticulture*, 42(2), 97–102. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/42/2/97.short>
- Caridi, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 89(3–4), 417–422. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9050-x>
- Del Barrio-Galán, R., Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Guadalupe, Z., y Ayestarán, B. (2012). Polysaccharide characterization of commercial dry yeast preparations and their effect on white and red wine composition. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.016>
- Dubourdieu, D, y Moine-Ledoux, V. (2007). Propiedades y características de manoproteínas extraídas de levaduras. - *Revista Internet de Viticultura y Enología*, 10, 1–9.
- Dubourdieu, Denis, Villettaz, J.C, Desplanques, C., y Pascal, R.G. (1981). Dégradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. Application à l'amélioration de la clarification des vins issus de raisins pourris. *OENO One*, 15(3), 161. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1981.15.3.1360>
- Dulau, L., y Palacios, A. (1994). Levaduras seleccionadas para la vinificación en tinto. *aditivos, coadyuvantes y correctores en la vinificación en tinto: XVII Cursos Rioja'02*, 97–110.

- García, M. J., Aleixandre, J. L., Álvarez, I., y Lizama, V. (2009). Foam aptitude of Bobal variety in white sparkling wine elaboration and study of volatile compounds. *European Food Research and Technology*, 229(1), 133–139. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1034-z>
- Hidalgo J. (2019a). *Tratado de enología: tomo I*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Hidalgo J. (2019b). *Tratado de enología: tomo II*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Huerta, S. de. (2019). *Estudio del sistema de diálisis para la desalcoholización parcial de vinos blancos*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Valladolid. Disponible en <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/36709>
- Lindner, P., y Shomer, I. (1984). Interference of azide in assays of carbohydrates. *Food Chemistry*, 14(2), 141–153. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(84\)90053-0](https://doi.org/10.1016/0308-8146(84)90053-0)
- Lucero, C. C. (2009). *Manual de técnicas analíticas para mostos y vinos. Hernán F.V* (INTA, Ed.). San Juan Argentina: INCA Editorial.
- Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., y Pérez-Magariño, S. (2015). Role of major wine constituents in the foam properties of white and rosé sparkling wines. *Food Chemistry*, 174, 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.080>
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., y Ewert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4009–4017. <https://doi.org/10.1021/jf990449f>
- McMahon, K. M., Culver, C., Castura, J. C., y Ross, C. F. (2017). Perception of carbonation in sparkling wines using descriptive analysis (DA) and temporal check-all-that-apply (TCATA). *Food Quality and Preference*, 59, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.01.017>
- Meza, M. (2012). *Efecto de una manoproteína sobre la interacción tanino-proteína salival*. Tesis Pregrado. Universidad de Chile. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/111127>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., y Suárez, J. A. (2003). Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 4084–4088. <https://doi.org/10.1021/jf021134u>
- Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Nieto, F. J., Martín-Álvarez, P. J., y Polo, M. C. (2000). Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chemistry*, 70(3), 309–317. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00088-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00088-1)
- Murphey J.M.; Powers J.R.; Spayd S.E. (1989). Estimation of soluble protein concentration of white wines using coomassie brilliant blue G-520. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(0537), 189–193. Retrieved from <https://www.ajevonline.org/content/40/3/189>
- Navascués (2006). El papel de las manoproteínas en la elaboración de vinos de calidad. *viticultura y enología en la D.O ribera del duero: [ponencias del VI curso de verano viticultura y enología en la D.O. ribera del duero, 2006]*, 73–78.

- Noguera, F., Seijo J. (1973). *Los grandes vinos: (Ensayo sistemático para el estudio de los vinos españoles): los vinos alicantinos, mistelas, anís y aguardientes* (Ediciones). Alicante.
- Nunez, Y. P., Carrascosa, A. V., González, R., Polo, M. C., y 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. <https://doi.org/10.1021/jf050191v>
- OIV. (2011). *Méthode OIV-MA-AS313-15 pH*. 4–6.
- OIV. (2012). *Recueil international des methodes d'analyses – OIV Evaluation de la teneur en sucre -réfractométrie Méthode OIV-MA-AS2-02 Méthode Type I*. 1–22.
- OIV. (2014). *El enfoque de la OIV*. Retrieved from <http://www.oiv.int/public/medias/95/les-vins-effervescents-es-complet.pdf>
- OIV. (2015a). Acidité totale. *Recueil International Des Methodes D'Analyses*, (Méthode OIV-MA-AS313-01), 5–7. Retrieved from <http://www.oiv.int/public/medias/3727/oiv-ma-as313-01.pdf>
- OIV. (2015b). Annex : maximum acceptable limits. *International code of oenological practices*.
- Peña, P. M. y D. R. (2001). Evolución de la composición de las uvas tintas durante la maduración. *Alimentaria: revista de Tecnología Higiene de los alimentos*, 326, 139–145.
- Poncet-Legrand, C., Doco, T., Williams, P., y Vernhet, A. (2007). Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: Effect of polysaccharide molecular weight. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(1), 87–91.
- Pozo-Bayón, M., Andújar-Ortiz, I., y Moreno-Arribas, M. V. (2009). Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Research International*, 42(7), 754–761. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.004>
- Pozo-Bayón, M. Á., Martínez-Rodríguez, A., Pueyo, E., y Moreno-Arribas, M. V. (2009). Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends in Food Science and Technology*, 20(6–7), 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.03.011>
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., y Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine - Effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 17–23. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00034-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00034-0)
- Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., Gómez, M., y Vila-Crespo, J. (2012). Antioxidant properties of sparkling wines produced with  $\beta$ -glucanases and commercial yeast preparations. *Journal of Food Science*, 77(9), 1005–1010. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02857.x>
- Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., y Vila-Crespo, J. (2012). Effect of the addition of  $\beta$ -glucanases and commercial yeast preparations on the chemical and sensorial characteristics of traditional sparkling wine. *European Food Research and Technology*, 235(4), 729–744. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1801-0>

- Shively, C. E., y Henick-Kling, T. (2001). Comparison of two procedures for assay of free amino nitrogen. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(4), 400 LP – 401. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/52/4/400.abstract>
- Suárez J.A. (2003). *Microbiología enológica: fundamentos de vinificación* Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Suárez J.A, Morata A., Calderon F., Somolinos S., Gonzalez M.C., (2005). *Utilización de levaduras seleccionadas en la crianza sobre lías de vinos tintos* (No. 26). ETS Ingenieros Agronomos Universidad Politécnica de Madrid: Tecnología del vino: tratamientos y equipos para viticultura y enología.
- Suárez J.A., y Barrado, A. M. (2015). *Levaduras para vinificación en tinto*. Ed. AMV ediciones. Madrid
- Torresi, S., Frangipane, M. T., Garzillo, A. M. V., Massantini, R., y Contini, M. (2014). Effects of a  $\beta$ -glucanase enzymatic preparation on yeast lysis during aging of traditional sparkling wines. *Food Research International*, 55, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.034>
- Trujillo, L. M. (1996). *Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos ( Cava ); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas*. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili. Disponible en <http://hdl.handle.net/20.500.11797/TDX2570>
- UNE-EN ISO 8589 (2010). Análisis sensorial. Guía general para el diseño de salas de cata.
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.