



---

# Universidad de Valladolid

Grado en Enología

## **INFLUENCIA DE LA CRIANZA SOBRE LÍAS TRATADAS CON ULTRASONIDOS, EN VINOS ESPUMOSOS TINTOS**

Alumna: Ana Sofia Castañeda Horta

Tutor: Raúl Moyano Gracia

Cotutora: Dra. Josefina Vila Crespo

Julio 2023

## Índice

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	4
3. Objetivo y plan de trabajo.....	6
4. Material y métodos.....	7
4.1 Material de partida .....	7
4.2 Análisis fisicoquímico.....	8
4.3 Análisis estadístico.....	9
5. Resultados y discusión.....	9
5.1 Características fisicoquímicas básicas.....	14
5.2 Compuestos fenólicos.....	15
5.3 Polisacáridos .....	17
5.4 Nitrógeno fácilmente asimilable y proteínas totales.....	17
5.5 Análisis de componentes principales ... ..	18
6. Conclusiones.....	20
7. Bibliografía.....	21

## Abstract

During the last few years, sparkling red wines have gained popularity, attracting the interest of wine lovers and winemakers expanding the wine market and the options available to the consumer. However, the elaboration can be difficult since there are different variables that affect their quality, such as obtaining red grapes with suitable phenolic maturity for the elaboration for the base wine.

During the production of these wines different techniques have been tested aimed at reducing the astringency and greenness contributed by the early harvested grapes. For this, the base wine has been aged on lees, subjecting it to different treatments such as ultrasound and the addition of  $\beta$ -glucanases. In the present study, the analysis of sparkling wines has been carried out after the second fermentation in the bottle and aging on lees for 9 months.

We found that aging on lees, ultrasonic treatment, and the addition of  $\beta$ -glucanases have positive impact on some of these physicochemical parameters, such as the release of polysaccharides and the nitrogen concentration, so they could be useful techniques in the production of sparkling red wine.

**Key words:** sparkling red wine, sparkling wine, aging on lees, lees, ultrasounds.

## 1. Resumen

Durante los últimos años, los vinos tintos espumosos han ganado popularidad captando el interés de amantes del vino, productores, enólogos y bodegueros, expandiendo el mercado vitícola y las opciones disponibles para el consumidor. Sin embargo, su elaboración supone un reto ya que existen diferentes variables que afectan a la calidad, como la obtención de una materia prima con madurez fenólica adecuada para la elaboración del vino base.

Durante la elaboración de los vinos base, se han probado diferentes técnicas dirigidas a reducir la astringencia y verdor aportados por la uva recolectada tempranamente. Para ello se ha realizado la crianza sobre lías del vino base sometiéndolo a distintos tratamientos como los ultrasonidos y la adición de  $\beta$ -glucanases. En el presente estudio se ha realizado la analítica de los vinos espumosos tras la segunda fermentación en botella y una crianza sobre lías durante 9 meses.

Encontramos que tanto la crianza sobre lías, el tratamiento de ultrasonidos y la adición de  $\beta$ -glucanases tienen un impacto positivo en algunos de estos parámetros fisicoquímicos como la liberación de polisacáridos y la cantidad de nitrógeno, por lo cual podrían ser herramientas útiles en la elaboración de vino tinto espumoso.

**Palabras clave:** vino tinto espumoso, vino espumoso, crianza sobre lías, lías, ultrasonidos.

## 2. Introducción

En España, la mayoría de los vinos espumosos son elaborados como blancos y rosados, siendo la producción de vinos espumosos tintos prácticamente inexistente. El mercado de vinos espumosos, sobre todo los de Denominación de Origen Cava, ha crecido durante los últimos años y cubre el porcentaje más alto de las ventas a nivel nacional y de exportación

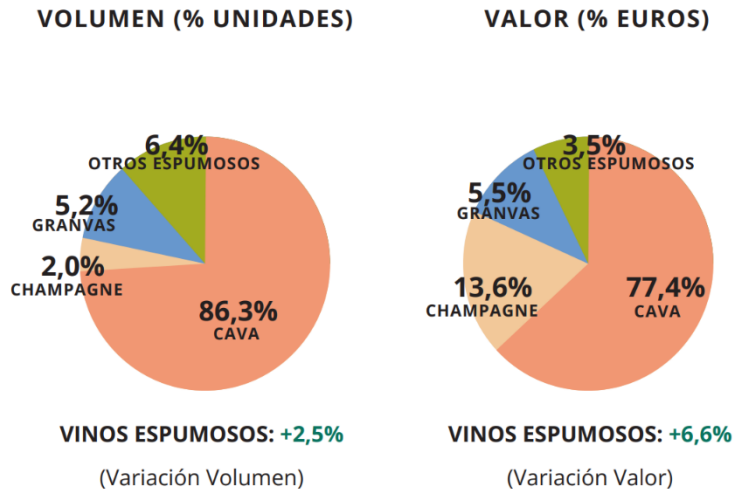


Figura 1. Consumo por categorías de vinos espumosos en el mercado interior y su variación de volumen producido y del valor en euros en el año 2022 (Consejo Regulador D.O. Cava, 2022).

Pérez-Magariño et al. (2019) indican que, aunque su producción es menor comparando con los vinos tranquilos, el impacto económico de este producto es importante por su alto valor añadido. Su elaboración es un proceso largo que sigue diferentes pasos que requieren mano de obra (Pozo-Bayón et al., 2009).

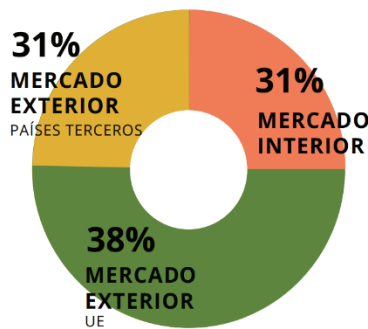


Figura 2. Ventas en el mercado interior y mercado exterior de vinos espumosos Cava (Consejo Regulador D.O. Cava, 2022).

El “Método Champenoise” o “Método Tradicional”, originario de la región de Champagne, Francia para la elaboración de vino espumoso se realiza en dos fases. En la primera obtendremos el denominado “vino base”, que se elabora como un vino tranquilo de manera tradicional. (Zoecklein, 2002). Los vinos elaborados de acuerdo con este método deben realizar una segunda

fermentación en botella seguida de una crianza sobre lías durante 9 meses antes del degüelle (Commission Regulation (EC) No. 606/2009). Para que se lleve a cabo, el vino base se embotella con una mezcla de levaduras seleccionadas y azúcar conocida como licor de tiraje, que debe contener una cantidad de azúcares suficientes para poder conseguir las 6 atm de presión necesarias (Zoecklein, 2002). La selección de levaduras se considera difícil porque durante la segunda fermentación estas deben sobrevivir en condiciones adversas como la baja temperatura, acidez alta, pH bajo y carencia de nutrientes (Borrull et al., 2015). Durante ese tiempo, se forma el CO<sub>2</sub> y posteriormente cuando ha finalizado, da lugar a la crianza sobre lías. (Martínez-Rodríguez y Pueyo, 2009; Pozo-Bayón et al., 2009).

La crianza sobre lías es una técnica que se ha utilizado tradicionalmente en la elaboración de vinos espumosos. Se mantiene al vino en contacto con las lías durante varios meses después de la segunda fermentación, esto favorece la liberación de compuestos de interés (Martínez-Rodríguez y Pueyo, 2009). Ocurre un proceso conocido como autólisis de levaduras que contribuye a la complejidad del vino. Consiste en la hidrólisis de biopolímeros intracelulares por enzimas de levaduras endógenas, esto produce una liberación de aminoácidos, proteínas y polisacáridos, entre otros (Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006).

Sin embargo, aun siguiendo el método tradicional, la producción de vinos espumosos tintos supone un reto, ya que la materia prima idónea debe contener una madurez fenólica suficiente, un grado alcohólico moderado (10.0%- 11,5%), un pH menor a 3,5, y acidez equilibrada (González-Lázaro et al., 2020). Una de las estrategias para elaborar un vino base adecuado para el producto final, es la vendimia anticipada, para así obtener los niveles óptimos de las características mencionadas anteriormente, el problema radica en que puede resultar en un vino con poco color y desequilibrado (Sawyer et al., 2022).

En relación con la crianza sobre lías que ocurre después de la segunda fermentación y teniendo en cuenta que estamos hablando de un vino espumoso tinto, algunos de los compuestos liberados durante la autólisis son las manoproteínas, que mejoran la estabilización del color y disminuyen la astringencia (Pérez-Serradilla y de Castro, 2008), son proteoglicanos altamente glicosilados que están compuestos principalmente por manosa (>90%)(Guadalupe et al., 2010)glucosa y proteínas (<10%) (Vidal et al., 2003), por lo tanto, esto ayudaría a minimizar los problemas que puede conllevar una vendimia anticipada.

En la elaboración de vino espumoso el proceso de autólisis es lento ya que ocurre cuando el medio presenta un pH bajo (de 3.0-4.0), a temperaturas entre 15-18°C, las mejores condiciones para que ocurra el proceso de autólisis es un medio con pH 5.0 y una temperatura de 45°C. (Kollár et al., 1993). Por esta razón, se ha despertado el interés de investigar técnicas para reducir el tiempo de crianza sobre lías acelerando el proceso de autólisis (Morata et al., 2019). Para agilizar este proceso se ha recurrido al método llamado “batonnage”, que durante los últimos años, diferentes técnicas han sido investigadas para reemplazarlo, entre ellas, la utilización de preparados de enzimas comerciales (Palomero et al., 2007), la adición de β-glucanasas obtenidas de especies de *Trichoderma* (Humbert-Goffard et al., 2004), la aplicación de tratamiento combinado de ultrasonidos y microondas (Liu et al., 2016), el “batonnage” es una práctica donde se remueve el vino permitiendo la homogenización del contenido facilitando los intercambios entre las lías y el volumen del vino (Doco et al., 2003a).

Mientras que las microondas son ondas no ionizantes que causan el aumento de energía en la matriz producida por la fricción, solo pueden modificar las estructuras moleculares y favorecer la migración de compuestos (Clodoveo et al., 2016), la aplicación de tratamiento de ultrasonidos aumenta el total de coloides, proteínas y polisacáridos con una reducción en el diámetro del tamaño de la partícula (Cacciola et al., 2013).

El tratamiento de ultrasonidos consiste en la aplicación de ondas mecánicas de alta potencia y baja frecuencia de 20 kHz a 100 kHz, esto hace que el gradiente de presión y temperatura aceleran los cambios químicos y físicos causando una ruptura celular (García Martín y Sun, 2013). Los ultrasonidos promueven la autólisis de las levaduras mejorando la extracción de polisacáridos (Cacciola et al., 2013), la extracción de compuestos aromáticos del mosto y del vino (Cocito et al., 1995), y además reducen la cantidad de levaduras *Brettanomyces* y bacterias lácticas (Gracin et al., 2016) mejorando el control microbiológico en general (Gracin et al., 2016). La técnica de aplicación de tratamiento de ultrasonidos no es costosa y es respetuosa con el medio ambiente, ha sido aprobada en muchos campos de la industria alimentaria (Delgado et al., 2009). Sin embargo, durante los últimos años, encontramos investigaciones que se centran en la aplicación del tratamiento a diferentes intensidades y tiempos, por lo que, aún faltan estudios sobre la crianza de lías asistida con ultrasonidos (García Martín et al., 2013).

Aunque se han desarrollado distintas técnicas para la elaboración de los vinos espumosos tintos, no se han encontrado muchos estudios relacionados con la elaboración, composición o cambios que ocurren durante la crianza sobre lías, esto probablemente puede ser por los desafíos que presenta obtener un vino base idóneo con las características apropiadas (Pérez-Magariño et al., 2019).

Como estrategia para mitigar los problemas que conlleva elaborar un vino espumoso tinto de calidad, los distintos tratamientos tales como ultrasonidos y beta-glucanasas fueron aplicados durante la elaboración del vino base, en el cual se estudió el efecto de la crianza sobre lías tratadas con ultrasonidos sobre los parámetros químicos y sensoriales del vino base tinto destinado a la elaboración de un vino espumoso (Navarro, 2022). En el presente trabajo estudiaremos la influencia que ha tenido sobre la elaboración del vino tinto espumoso final.

### 3. Objetivo y plan de trabajo.

Este trabajo es la continuación de un proyecto más grande que comenzó en la vendimia del 2021, cuyo objetivo general es estudiar la influencia sobre la elaboración de un vino espumoso tinto, de la realización de una crianza sobre lías del vino base en diferentes condiciones.

El objetivo principal es conocer la influencia en el vino espumoso final, de los tratamientos realizados sobre las lías que se adicionaron a los vinos base y con las cuales se realizó una crianza de cuatro meses. A su vez, se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

- Conseguir un vino tinto espumoso de calidad y que tenga las características fisicoquímicas adecuadas para la venta al consumidor.
- Realizar la caracterización fisicoquímica de los distintos vinos espumosos tintos elaborados.
- Conocer la influencia de cada tratamiento sobre la elaboración del vino espumoso.

Para ello, una vez finalizada la segunda fermentación en botella y su correspondiente crianza con lías, en el presente trabajo se continuó el proceso de elaboración del vino tinto espumoso con método tradicional según el plan de trabajo siguiente:

- Degüelle de las botellas, para retirar las lías, a los 9 meses de adición del licor de tiraje.
- Caracterización fisicoquímica de los vinos elaborados con los diferentes tratamientos.
- Análisis de los datos obtenidos.

## 4. Material y métodos.

### 4.1. Material de partida.

Como hemos mencionado anteriormente, el vino tinto espumoso parte de uva vendimiada en 2021, donde se obtuvo el vino base que permaneció en contacto con lías durante 4 meses, con los siguientes tratamientos:

- Lías de *Saccharomyces cerevisiae* sometidas a tratamientos de ultrasonidos (US) con distintos niveles de amplitud (30%,60%,90%).
- Lías de *Saccharomyces cerevisiae* adicionadas de  $\beta$ -glucanasas (BG).
- Lías de *Saccharomyces cerevisiae* sometidas a un tratamiento de ultrasonidos y adicionadas de  $\beta$ -glucanasas (30%BG).
- Lías de *Saccharomyces cerevisiae* sin tratar.
- Lías procedentes de la propia fermentación del vino base.
- Control sin lías.

Las lías utilizadas para los tratamientos mencionados anteriormente provienen de levaduras de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* comercializada como levadura seca activa, LALVIN EC1118 (Lallemand S.A., Canadá), estas fueron sometidas al tratamiento correspondiente en un equipo de ultrasonidos UP400S (400 W y 24 KHz) (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemania) equipado con un sonotrodo de 22 mm de diámetro que se sumergió en la muestra a una profundidad de 30 mm. La suspensión de la levadura se introdujo en un recipiente de cristal refrigerado por una corriente de agua fría externa para mantener una temperatura constante de la muestra de 25° C. Se utilizaron tres niveles de amplitud diferentes (30%, 60% y 90%).

A las lías de *Saccharomyces cerevisiae*, se les añadió  $\beta$ -glucanasa (Lallemand S.A. Canadá) a la dosis de 3 g/HL (muestras SCBG y 30%BG). En la muestra 30%BG la adición de esta enzima fue después del tratamiento con ultrasonidos.

Tras los cuatro meses de crianza sobre lías, se realizó la adición de licor de tiraje con una mezcla de 20 g/HL de levaduras LALVIN EC1118 *Saccharomyces cerevisiae* (Lallemand S.A., Canadá) con 24 g/L de sacarosa y 20 g/HL de bentonita. Después del degüelle tras 9 meses de la adición del licor de tiraje, se obtuvieron un total de 8 tipos de vinos espumosos de diferentes tratamientos con repetición de cada uno de ellos (Tabla 1).

**Tabla 1:** Vinos experimentales y códigos.

Muestra Experimental		Código
Control sin lías		C
Control con lías de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sin tratamiento		SC S/TTO
Lías de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tratadas con ultrasonidos de diferentes amplitudes de onda	30% durante 10 min + $\beta$ -glucanasas	30%BG
	30% durante 10 min	30%
	60% durante 10 min	60%
	90% durante 10 min	90%
Lías de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> + $\beta$ -glucanasas		SC BG
Lías propias		LIAS

## 4.2. Análisis fisicoquímico

Los análisis fisicoquímicos a los distintos vinos tintos espumosos se realizaron por duplicado, los polisacáridos totales y proteínas totales se analizaron por triplicado, se utilizaron los siguientes métodos:

Todas las muestras de vino fueron previamente desgasificadas y centrifugadas para poder realizar los análisis.

- pH: se basa en la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en el líquido sometido a ensayo que sería la muestra de vino tinto espumoso desgasificado (Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), 2023).
- Acidez total: es la suma de todas las acideces valorables, cuando se lleva al vino a pH 7 por adición de una solución alcalina valorada. (OIV, 2023).
- Grado alcohólico: por el método de ebulloimetría que se basa en la diferencia de los puntos de ebullición del agua y el etanol tomando como referencia el agua en condiciones ambientales. (García, 1990).
- Acidez volátil: se separa una fracción del acético contenido en la muestra de vino mediante una destilación directa y parcial con posterior valoración con solución alcalina (García, 1990).
- Índice de polifenoles totales (IPT): se basa en la absorción en el ultravioleta de los anillos bencénicos característicos de los compuestos fenólicos con un máximo próximo a 275-280 nm (García, 1990).
- Ácidos hidroxicinámicos: se mide la absorción a 320 nm que tiene la muestra de vino mediante espectrofotometría. (Betés-Saura et al., 1996).
- Flavonoles: se mide la absorción que presenta la muestra a 365 nm mediante espectrofotometría (Betés-Saura et al., 1996).
- Taninos totales: Se miden en el espectrofotómetro a 550 nm en un medio ácido y a altas temperaturas donde se liberan antocianidinas, por rotura de los enlaces intermonoméricos (Bate-smith, 1981).
- Antocianos totales: basado en la decoloración con bisulfito de sodio que es proporcional a la concentración de antocianos libres (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1965).



- Nitrógeno fácilmente asimilable: su fundamento es que el nitrógeno amino libre y el nitrógeno amónico se hacen reaccionar con formaldehído y posteriormente se valora con NaOH (Shively, 2001).
- Proteínas totales: se basa en la capacidad de unión del colorante azul brillante Coomassie con las proteínas. Cuando se produce la unión la absorbancia máxima cambia de 465 nm a 595 nm, lo que conlleva un cambio de color de naranja a azul (Murphey et al., 1989).
- Polisacáridos totales: a la muestra se le añade ácido sulfúrico, en su presencia los polisacáridos se degradan y forman complejos coloreados con fenol que se miden en el espectrofotómetro a 485 nm (Lindner y Shomer, 1984).
- Características cromáticas según Glories: en vinos tintos las características cromáticas se deducen de su espectro de absorción cuyo mínimo es 420 nm y máximo a 520 nm, permitiendo definir su intensidad colorante y su tonalidad (García, 1990).

### 4.3. Análisis de datos

Para la interpretación estadística de los resultados obtenidos a partir de los análisis fisicoquímicos, se ha realizado un análisis de componentes principales (ACP) y una comparación de los datos mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con Least Significant Difference (LSD) que tiene el 95% de significación con el programa Statgraphics Centurion XVIII (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, USA), combinando linealmente los diferentes parámetros descritos con anterioridad a partir del cálculo del valor medio y la desviación estándar de cada una de las repeticiones realizadas en el análisis fisicoquímico.

## 5. Resultados y discusión

En las tablas a continuación (tablas 2, 3 y 4) se presentan los valores medios y la desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos analizados en cada vino experimental una vez concluido el proceso de elaboración de vino tinto espumoso tras el degüelle.

**Tabla 2:** Composición fisicoquímica de los vinos espumosos tintos experimentales. Acidez total (AT), pH, grado alcohólico (GA), acidez volátil (AV), índice de polifenoles totales (IPT), control (CTRL), tratamiento US 30% (30%), tratamiento US 60% (60%), tratamiento US 90% (90%), tratamiento US + BG (30% BG), crianza de lías con *Saccharomyces cerevisiae* (SCTTO), crianza con lías de SC + BG (SCBG), lías propias (LÍAS). Las letras (a,b,c,d,e) son indicadores de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de acuerdo con el estudio de ANOVA.

<b>Muestra</b>	<b>AT</b> g/L Ác. tartárico	<b>pH</b>	<b>GA</b> %vol.	<b>AV</b> g/L Ác. acético	<b>IPT</b>
<b>CTRL</b>	5,1±0,10b	3,45±0,03a	12,0±0,17ab	0,57±0a	41,01±0,40a
<b>30%</b>	4,8 ±0,03a	3,43±0,02a	12,1±0,14ab	0,54±0a	37,82±0,10a
<b>30%BG</b>	4,7 ±0,03a	3,39±0,01a	12,1±0,42a	0,66±0a	37,68±0,12a
<b>90%</b>	5,0 ±0,10b	3,44±0,02a	12,05±0,07ab	0,59±0ab	40,68±0,01a
<b>60%</b>	4,7 ±0,03a	3,39±0,01a	12,1±0,21ab	0,67±0b	37,82±0,10a
<b>SCTTO</b>	5,1±0,10b	3,45±0a	12,2±0,10b	0,53±0a	40,81±0,05a
<b>SC BG</b>	5,1±0,07b	3,39±0,01a	12,2±0,10b	0,55±0a	38,36±0,51a
<b>LÍAS</b>	5,1±0,14b	3,58±0,01b	12,1±0,42ab	0,59±0ab	39,48±2,10a

**Tabla 3:** Composición fisicoquímica de los vinos espumosos tintos experimentales. Tonalidad (TON), antocianos (ANT), polisacáridos totales (PS), nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), control (CTRL), tratamiento US 30% (30%), tratamiento US 60% (60%), tratamiento US 90% (90%), tratamiento US + BG (30% BG), crianza de lías con *Saccharomyces cerevisiae* (SCTTO), crianza con lías + BG (SCBG), lías propias (LÍAS). Las letras (a,b,c,d,e) son indicaciones de grupos homogéneos entre las diferentes muestras.

<b>Muestra</b>	<b>INT</b>	<b>TON</b>	<b>ANT mg/L</b>	<b>PS g/L</b>	<b>NFA mg/L</b>
<b>CTRL</b>	1,13±0,02a	0,68±0,01b	82±1,23a	0,23±0ab	78±0cd
<b>30%</b>	1,16±0,12a	0,70±0,01b	69±0a	0,20±0a	56±0,03a
<b>30%BG</b>	1,16±0,05a	0,69±0,02b	65±0a	0,41±0de	80±0,21b
<b>60%</b>	1,16±0,12a	0,69±0b	65±0a	0,39±0,01cd	80±0,03c
<b>90%</b>	1,24 ±0,08a	0,68±0b	66±0 a	0,54±0e	90±0e
<b>SC BG</b>	1,22±0,01a	0,69±0b	71±0,3a	0,32±0abc	71±0bc
<b>SC S/TTO</b>	1,17±0,11a	0,61±0,05 <sup>a</sup>	74±0a	0,34±0bc	64±0b
<b>LÍAS</b>	1,16±0,01a	0,71±0,03b	87±1,5 <sup>a</sup>	0,49±0de	71±0bc

**Tabla 4:** Composición fisicoquímica de los vinos espumosos tintos experimentales. Taninos (TAN), intensidad colorante (I.C.) ácidos hidroxycinámicos (AH), flavonoles (FL) y proteínas totales (PT), control (CTRL), tratamiento US 30% (30%), tratamiento US 60% (60%), tratamiento US 90% (90%), tratamiento US + BG (30% BG), crianza de lías de *Saccharomyces cerevisiae* (SCTTO), crianza con lías + BG (SCBG), lías propias (LÍAS). Las letras (a,b,c,d,e) son indicaciones de grupos homogéneos entre las diferentes muestras.

<b>Muestra</b>	<b>TAN</b> <b>g/L</b>	<b>IC</b>	<b>AH</b>	<b>FL</b>	<b>PT</b> <b>g/L</b>
<b>CTRL</b>	2,05±0ab	9,65±0,23ab	19,3±0bc	6,36±0ab	0,47±0,04a
<b>30%</b>	1,62±0,01 <sup>a</sup>	9,6±0,03ab	18,95±0,07b	6,30±0,01ab	0,48±0,04a
<b>30%BG</b>	1,75±0,02ab	8,1±0,35ab	17,64±0b	5,61±0ab	0,47±0,05a
<b>60%</b>	1,75±0a	8,1±0,11a	17,73±0a	5,65±0a	0,47±0,01a
<b>90%</b>	2,11 ±0ab	9,8±0,21ab	21,61±0d	8,0±0,01c	0,46±0,03a
<b>SC BG</b>	2,44±0,02b	10,08±0,14ab	19,12±0b	6,32±0ab	0,47±0,02a
<b>SC S/TTO</b>	1,85±0,01ab	9,8±0,26b	19,8±0bc	6,75±0b	0,43±0,06a
<b>LÍAS</b>	1,89±0,02ab	9,3±0,05ab	20,31±0,14c	6,73±0b	0,48±0,06a

## 5.1. Características fisicoquímicas generales

En nuestro estudio (tabla 2) observamos diferentes grupos homogéneos de acidez total y pH, lo que indica que hubo cambios significativos en estos parámetros. En previos estudios realizados por Navarro, (2022) donde se analizaron los parámetros fisicoquímicos del vino base, no se muestran cambios significativos. Nuestros resultados indican que la muestra tratada con lías propias contiene el valor de pH más alto frente a la muestra control, esto se puede deber a que, en la elaboración del vino espumoso tinto, se originan una variedad de distintos cambios químicos, ya sea por la segunda fermentación, la crianza sobre lías o la misma complejidad de su composición, estos cambios afectan a la composición de los vinos espumosos tintos (Sartor et al., 2019). Comparando con la tabla de composición fisicoquímica de los vinos base (Anexo 1), podemos observar que ha habido un aumento del pH y una disminución en la acidez total en el vino espumoso, esto se puede deber a los distintos cambios químicos que se producen en la segunda fermentación (Navarro, 2022). La disminución de acidez total podría deberse al consumo de ácidos por las levaduras, principalmente de ácido málico y pirúvico, también, a la precipitación de hidrogenotartato de potasio a partir de ácido tartárico (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

En cuanto a la acidez volátil (AV) se encuentran diferencias significativas, siendo la muestra tratada con ultrasonidos y beta-glucanasa (30%BG) la que presenta las concentraciones más altas de ácido acético. Nuestros resultados no coinciden con los de Pérez-Magariño et al. (2019) quienes afirman que en su estudio de vino tinto espumoso con variedad Tempranillo, la muestra que no contenía lías mostró un aumento en contenido de (AV). Esto se puede deber a la diferencia de tratamientos entre los dos estudios y las diferentes muestras, también la manipulación de las lías propias pudo repercutir en este parámetro. Por otro lado, Rodríguez-Nogales et al. (2012) encontraron un aumento de acidez volátil en todas las muestras, después de 9 meses de crianza que se realizó posterior a la segunda fermentación de vino espumoso elaborado con la variedad Verdejo; los resultados de las muestras que fueron tratadas con beta-glucanasas (0.48–0.50, 0.55–0.60 y 0.58–0.61 g/l de ácido acético) lo que podría explicar nuestros resultados. En el Anexo 1 se aprecia el aumento de volátil entre el vino base y el vino espumoso tinto, esto podría deberse a que la presencia de heteropolisacáridos durante la fermentación alcohólica favorece el metabolismo glicero-pirúvico por las levaduras, y esto causa una mayor producción de ácido acético (Hidalgo-Togores, 2011).

Podemos observar diferencias significativas respecto al grado alcohólico. Zeng et al. (2008) obtuvieron resultados en un estudio de campos eléctricos aplicados directamente al vino para un envejecimiento más rápido y no encontraron diferencias significativas. Estas diferencias podrían estar relacionadas a las aplicaciones a diferentes frecuencias de ultrasonidos (20 kHz, 40 kHz, 60 kHz) y la duración del tratamiento (Chang, 2005; Chang y Chen, 2002b; Cui et al., 2012; Singleton y Draper, 1963), por lo tanto, los efectos de los ultrasonidos en el parámetro de grado alcohólico no son concluyentes. Por otro lado, comparando el grado alcohólico con el estudio previo de Navarro, (2022) ,donde se elaboró el vino base y no mostró diferencias significativas en este parámetro, podemos observar las diferencias de grado alcohólico frente al vino espumoso tinto y podemos decir que estas diferencias de aumento de grado alcohólico se pueden deber a que está relacionado al contenido de azúcar durante la segunda fermentación (Martínez-Rodríguez y Polo, 2000). Como hemos mencionado antes, diferentes factores afectan

a su composición química (Sartor et al., 2019). En el Anexo 1 podemos observar el aumento de grado alcohólico que presenta el vino espumoso en relación al vino base, este aumento se debe a la crianza sobre lías durante 9 meses después de la segunda fermentación (Ubeda et al., 2019).

## 5.2. Compuestos fenólicos

Las lías se consideran fuente de compuestos fenólicos, estos son retenidos tanto en las paredes celulares de la levadura como por las paredes celulares de la piel y la pulpa de la uva. La pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* está formada por manoproteínas unidas a oligosacáridos, que quedan expuestas al exterior de la célula (Larue et al., 1984; Morata et al., 2003; Vasserot et al., 1997). Los compuestos fenólicos son elementos clave que están relacionados directamente con la calidad de los vinos (Hernández et al., 2006). La concentración total de compuestos fenólicos generalmente decae conforme pasa el tiempo, y depende de diferentes factores tales como la variedad utilizada en el proceso de elaboración del vino (García Martín y Sun, 2013).

La concentración de antocianos (Tabla 3) no presenta diferencias significativas, pero sí se aprecian ligeras diferencias entre las concentraciones de las muestras con tratamiento de ultrasonidos (30%, 60%, 90% y 30%BG) respecto a las demás. Nuestros resultados coinciden con los del estudio de Blanco-Huerta et al. (2023), donde tampoco encontraron diferencias significativas en vinos con crianza sobre lías asistida con ultrasonidos, sin embargo, la muestra que más se caracterizó por este parámetro fue una con tratamiento de ultrasonido de amplitud del 90%, la similitud entre nuestro estudio y el de estos autores concuerda con nuestros resultados, que podría explicarse por la disminución de la adsorción de estos compuestos al modificarse la pared celular de las levaduras en crianza sobre lías asistidas con ultrasonidos (del Fresno et al., 2019).

En la Tabla 4 se pueden apreciar algunas diferencias en la intensidad de color (IC). De acuerdo con otros autores como Ruipérez et al., (2022) que estudiaron el impacto de  $\beta$ -glucanasas y derivados de levadura en la composición fisicoquímica en vinos espumosos blancos de la variedad verdejo, no mostraron diferencias significativas; tampoco en un estudio sobre los efectos de las cepas de *Saccharomyces* en la calidad de los vinos tintos con crianza sobre lías (Loira et al., 2013). En cambio, se observó un incremento de la intensidad de color cuando se analizaron los efectos de la crianza sobre lías con tratamiento de ultrasonidos, lo que podría explicar que el tratamiento aplicado al vino base ha afectado a las muestras 90% y 30% (Kulkarni et al., 2015). Sin embargo, nuestras muestras con más intensidad de color son las que no tienen tratamiento de ultrasonidos, estas diferencias se pueden deber a que, en los vinos espumosos, la intensidad de color tiende a disminuir después de la segunda fermentación, esto se debe a la adsorción de polifenoles a la pared celular de la levadura, estos compuestos fenólicos precipitan y evitan su propia oxidación (Del Barrio-Galán et al., 2011; Márquez et al., 2009)

Los taninos se consideran indicadores de calidad en los vinos tintos, se caracterizan por ser condensados o hidrolizables, se encuentran presentes en el tejido vegetal de la vid y de otras especies vegetales que son importantes para la pigmentación (Smith et al., 2015). La evolución de los taninos en el vino espumoso final depende de las diferentes reacciones que ocurren durante las diferentes etapas de elaboración (Smith et al., 2015).

En los análisis de concentración de taninos se aprecian diferencias significativas entre ellos, se podría decir que los vinos experimentales que provienen de un vino base con crianza sobre lías tratadas con ultrasonidos, tienen una cantidad ligeramente menor a los vinos que no provienen de muestras con tratamiento de ultrasonido, a excepción de 90% donde sí se aprecia un aumento. En otro estudio se encontró que cuando se realiza la aplicación en contacto con aire y oxígeno del tratamiento de ultrasonidos se produce una ligera disminución de la concentración de taninos, lo que podría explicar esta diferencia de concentración en nuestro estudio (García Martín y Sun, 2013). La pared celular de las levaduras juega un papel importante en la adsorción de polifenoles como los taninos (Mekoue Nguela, Sieczkowski, et al., 2015; Mekoue Nguela, Vernhet, et al., 2015), esto podría explicar por qué ha habido una disminución de taninos en las respectivas muestras con tratamiento de ultrasonidos (30%,30%BG y 60%) frente a la muestra control.

Se encontraron diferencias significativas en lo que respecta a la tonalidad, las muestras con tratamiento de ultrasonidos tienen valores mayores respecto a las demás con excepción de lías propias. De acuerdo con otros autores, afirman que este parámetro aumenta en muestras de vino con tratamiento de ultrasonidos (del Fresno et al., 2018), aunque los tratamientos son diferentes, su estudio podría explicar nuestros resultados de las muestras 30%,30%BG,60% y 90%.

Los flavonoides más comunes en la composición de los vinos son flavan-3-oles, antocianinas y flavonoles (Jackson, 1994). Sus efectos de copigmentación son los más importantes para los vinos tintos (Boulton, 2001; Gordillo et al., 2012). Son estabilizadores del color en cantidad y calidad por las reacciones de copigmentación por asociación molecular entre glucósidos de antocianina, ciertos ácidos fenólicos como los ácidos hidroxicinámicos y derivados de flavonoles, entre otros; estas causan que los pigmentos muestren un mejor color y mejoran su preservación a largo plazo (Boulton, 2001; Cheynier et al., 2006).

En la tabla 4, podemos observar diferencias significativas y que la concentración más alta de flavonoles la contiene la muestra 90%, las muestras 30%, 30%BG y 60% presentan una concentración más baja respecto a la muestra control. Los flavonoles generalmente constituyen el 85% del contenido fenólico total ( $\geq 1$  g/L) en vinos tintos. García Martín y Sun, (2013) afirman que no se ha reportado información en como estos compuestos son afectados por el tratamiento de ultrasonidos y que sus efectos no son concluyentes. Sin embargo, (Rodríguez-Nogales et al., 2012) observó una disminución en los flavonoles de vinos espumosos blancos tratados con coadyuvantes, esta disminución puede deberse a la formación de un complejo coloidal manoproteína-polifenol (Guadalupe et al., 2007).

Por otro lado, autores como Sartor et al. (2019) en un estudio de crianza sobre lías después de la segunda fermentación, encontraron que la concentración de algunos ácidos hidroxicinámicos decrecía, se mostró una disminución de estos ácidos entre los 9 y 12 meses durante la crianza sobre lías. En nuestro estudio también encontramos a las muestras 30%, 30%BG y 60% con contenido menor de ácidos hidroxicinámicos frente a la muestra control (Tabla 4), aunque el tiempo de crianza es mayor en este estudio con relación al nuestro, estos cambios podrían deberse a las reacciones de hidrólisis de las formas esterificadas de estos compuestos hidroxicinámicos libres, o a la participación de sus formas libres en reacciones de polimerización con antocianinas, dando lugar a la formación de piranoantocianinas. (Garrido y Borges, 2013; Marquez et al., 2013).

### 5.3 Polisacáridos

El componente que se libera en mayor cantidad durante la autólisis de las levaduras son los polisacáridos, concretamente las manoproteínas son los componentes mayoritarios de los polisacáridos extracelulares en levaduras (Fornairon-Bonnefond et al., 2002). Autores como Pérez-Serradilla y de Castro, (2008) afirman que la producción y liberación de una fracción de polisacáridos depende de la cepa de levadura. Las manoproteínas liberadas durante la crianza del vino es un fenómeno progresivo y lineal; el contacto del vino con las lías no es suficiente para liberarlas (Doco et al., 2003).

Como podemos observar en la Tabla 3, se encuentran diferencias entre las distintas muestras. 30%BG y 90% tienen una concentración de polisacáridos mayor respecto a las demás, pero no con respecto a lías, y podemos decir que hay una diferencia significativa. En estudios donde fueron elaborados vinos espumosos con diferentes adyuvantes añadidos como  $\beta$ -glucanasas, se encontró que la muestra tratada contiene una concentración mayor de polisacáridos respecto a un vino control (Ruipérez et al., 2022). Otros autores también reportaron que la adición de  $\beta$ -glucanasas en vinos espumosos aumentan los niveles de polisacáridos (Rodríguez-Nogales et al., 2012). Estos dos estudios sostienen nuestros resultados de las muestras 30%BG y SCBG frente a la muestra control. Por otro lado, Fresno et al., (2018) encontró que las muestras con tratamiento de ultrasonidos después de 135 días de crianza sobre lías tienen mayor concentración de polisacáridos frente a una muestra control. Lo que explica los resultados de nuestras muestras que fueron tratadas con US, 30%BG y 90%.

Las  $\beta$ -glucanasas son enzimas hidrolíticas que degradan los  $\beta$ -glucanos, que son uno de los mayores componentes de la pared celular de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, estos preparados de enzimas se utilizan para acelerar la liberación de compuestos como los polisacáridos y las manoproteínas durante la crianza sobre lías (Palomero et al., 2007), esto podría explicar nuestros resultados de nuestras muestras tratadas con ultrasonidos que parecen ejercer un efecto similar.

### 5.4 Nitrógeno fácilmente asimilable y proteínas totales

El nitrógeno juega un papel importante en la elaboración de vinos espumosos, sobre todo ayuda a las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* a sobrevivir las condiciones adversas del medio en el que se encuentran (Martínez-Moreno et al., 2012), tales como alto contenido de etanol (10%-12% v/v), un pH bajo (2,9-3,2), temperaturas bajas (10-15°C) y una acidez total de (5-7 g/L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Ganss et al., 2011). La cantidad de nitrógeno que existe en el mosto de uva y la cantidad de nitrógeno que es consumido durante la primera fermentación, influyen de manera estricta en la cantidad de nitrógeno del vino base (Martí-Raga et al., 2016).

En un estudio de Martínez-García et al., (2017) se observó que el contenido de nitrógeno fácilmente asimilable decrece y vuelve a aumentar al final de la segunda fermentación, esto se puede explicar con el consumo de aminoácidos libres de las levaduras. Durante este proceso, se restituye una gran parte de estos compuestos como respuesta fisiológica a falta de nutrientes, esto hace que aumenten los valores de nitrógeno fácilmente asimilable en el vino (Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006; Martínez-Rodríguez y Polo, 2000). En nuestro trabajo podemos encontrar diferencias en cuanto al contenido de NFA; se observan concentraciones más elevadas en las muestras 30%BG, 60%, 90%. Y en el Anexo 1 observamos las diferencias de nitrógeno fácilmente asimilable entre el vino base y el vino espumoso (Navarro, 2022).



García Martín et al. (2013) concluyó que la aplicación de ultrasonidos a las lías produjo un aumento exponencial de la concentración de proteínas totales al inicio del tratamiento, sin embargo, fue seguido de una fase de decrecimiento y el previo aumento de esta no fue significativo, lo que podría explicar nuestros resultados obtenidos de las muestras tratadas con ultrasonidos frente a la muestra control.

### 5.5 Análisis de componentes principales

Una vez realizado el tratamiento de datos y observando los parámetros con diferencias estadísticamente significativas, se realizó un análisis de componentes principales (ACP), con el objetivo de caracterizar los diferentes tratamientos realizados en función de los distintos parámetros fisicoquímicos en los que se hallaron diferencias significativas en la prueba Least Significant Difference (LSD) Anova con ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 5. Pesos de los Componentes**

	<b>Componente 1</b>	<b>Componente 2</b>
<b>AT</b>	0,439433	0,01061
<b>pH</b>	0,181421	0,153914
<b>GA</b>	0,194677	-0,297654
<b>AV</b>	-0,270649	0,362294
<b>TON</b>	-0,257378	0,377479
<b>PS</b>	0,18087	0,39841
<b>NFA</b>	0,146333	0,419108
<b>TAN</b>	0,22819	0,153414

En la Figura 3, se muestran las distribuciones de los vinos espumosos, así como los parámetros fisicoquímicos. La componente principal 1 (CP1) muestra el 32,61% de la variabilidad de los datos, y se encuentra correlacionada positivamente con los parámetros de acidez total, pH, grado alcohólico, polisacáridos totales, concentración de taninos, y correlacionado negativamente con los parámetros de acidez volátil y tonalidad (Tabla 5).

Por otro lado, el componente principal 2 (CP2) muestra el 26,26% de la variabilidad de los datos y se encuentra correlacionado positivamente con los parámetros de acidez total, pH, acidez volátil, tonalidad, polisacáridos totales, NFA y concentración de taninos; y negativamente con el parámetro de grado alcohólico (Tabla 5).

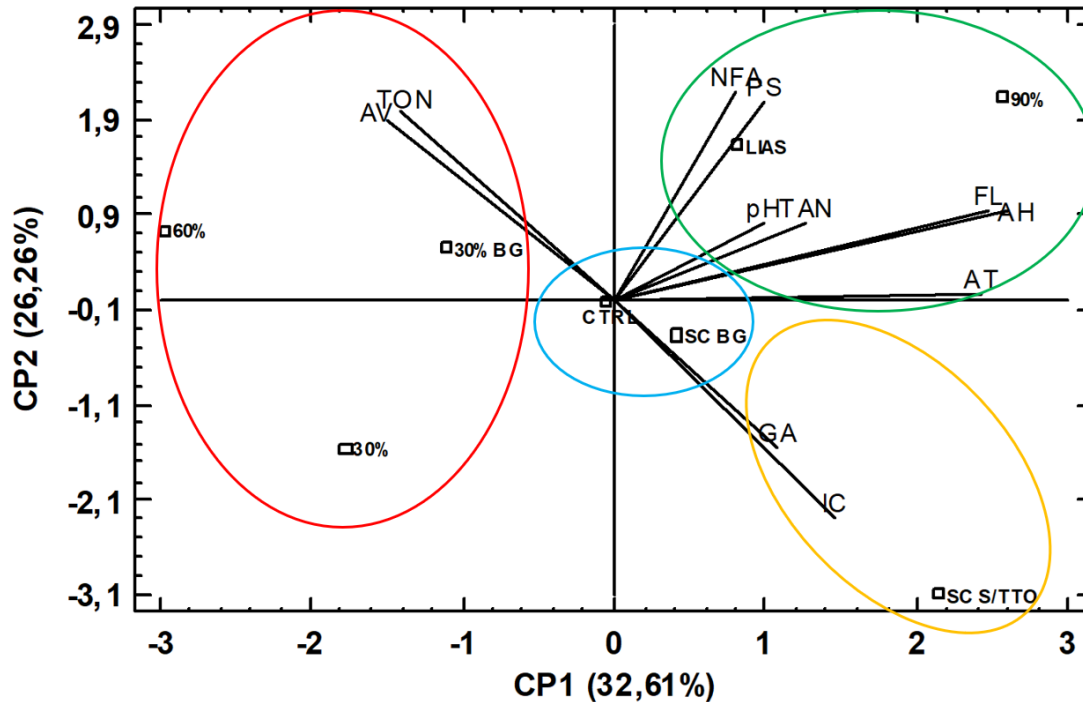


Figura 3. Bigráfica de Análisis de Componentes Principales (ACP). Representación de las muestras y de los parámetros fisicoquímicos que mostraron diferencias significativas en el análisis de ANOVA, en función de Componentes Principales 1 (CP1) y Componentes Principales

En primer lugar, en la zona delimitada por los valores negativos para CP1, encontramos las muestras 30%, 30%BG y 60% siendo caracterizadas por los parámetros fisicoquímicos de tonalidad y acidez volátil. Comprobando las tablas 2 y 3 podemos observar que son las muestras con los valores más altos en estos parámetros y estos resultados coinciden con el análisis de ANOVA, con Rodríguez-Nogales et al. (2012) y del Fresno et al. (2018). Sin embargo, nuestro estudio busca mitigar los problemas que conlleva elaborar un vino espumoso tinto y no nos interesa encontrar un aumento en estos parámetros, ya que un aumento de acidez volátil, por ejemplo, afecta negativamente a la calidad del vino.

Encontramos al segundo grupo englobando la muestra control y SCBG, las cuales no están siendo caracterizadas por ningún parámetro. Aunque visualmente apreciamos a la muestra CTRL y SCBG en diferentes puntos con respecto al grado alcohólico, en la Tabla 2 podemos apreciar que no hay diferencias en este parámetro entre las dos muestras. Esto pone de manifiesto que los demás tratamientos realizados sí han influido en los parámetros analizados.

En la zona delimitada por los valores positivos para CP1 y negativos para CP2 encontramos el tercer grupo donde la muestra SC S/TTO está siendo caracterizada por los parámetros de grado alcohólico e intensidad colorante. Si comprobamos la tabla 1 y 2, se puede ver que los resultados coinciden con el análisis ANOVA ya que fueron las muestras que presentaron mayores valores en los parámetros anteriormente citados. Esto concuerda con los datos obtenidos de grado alcohólico de Navarro, (2022) y Ubeda et al. (2019), e intensidad de color (Del Barrio-Galán et al., 2011; Márquez et al., 2009).

En la zona de valores positivos para ambos componentes encontramos por un lado a la muestra 90% que se vio caracterizada por acidez total, flavonoles, ácidos hidroxicinámicos y antocianos, estos tres últimos conforman una parte importante de la composición polifenólica de los vinos tintos. Visualizando las tablas 3 y 4, podemos comprobar que estos vinos presentan los mayores valores en estos parámetros. Nuestros resultados concuerdan respectivamente con Ribéreau-Gayon et al. (2003), García Martín y Sun, (2013), Sartor et al. (2019), Blanco-Huerta et al. (2023). Analizando estadísticamente la Figura 3, y comparándola con el estudio de ANOVA, podemos decir que el tratamiento con la amplitud de 90% de ultrasonidos, favoreció positivamente al vino espumoso tinto, ya que los parámetros fisicoquímicos por los que es caracterizada, acidez total, flavonoles, ácidos hidroxicinámicos y antocianos, conforman una parte importante de la composición polifenólica de los vinos tintos.

Por otro lado, en la misma zona se encuentra la muestra tratada con lías propias que se caracteriza por mayores valores en la concentración de polisacáridos y NFA, lo que concuerda con los resultados mencionados en el apartado anterior de Navarro, (2022), que analizó los parámetros fisicoquímicos de los vinos tintos espumosos. Estos parámetros fisicoquímicos también se consideran importantes desde el punto de vista sensorial y de estabilidad de los vinos espumoso tintos, ya que las manoproteínas, son los componentes mayoritarios de los polisacáridos extracelulares en levaduras (Fornairon-Bonnefond et al., 2002).

## 6. Conclusiones

La aplicación de tratamiento de ultrasonidos a las lías de vinos base que a su vez realizan una crianza sobre lías y la adición de beta-glucanasas pueden ser una herramienta útil para la elaboración de vinos espumosos tintos, ya que aceleran el proceso de autólisis de las levaduras.

Con este análisis de datos podemos decir que las amplitudes de onda al 30%, 60% y la combinación de ultrasonidos + beta-glucanasas (30%BG) no han sido suficientes para conseguir los mejores resultados, por otro lado, se consiguieron mejores resultados al aplicar el tratamiento de ultrasonidos a una amplitud de onda del 90%.

El tratamiento al 90% de amplitud, ha favorecido la ruptura de la pared celular. Sin embargo, la adición de beta-glucanasas sin tratamiento de ultrasonidos, y con tratamiento al 30% de amplitud, no ha sido suficiente para mejorar significativamente la composición del vino, posiblemente, un tratamiento de ultrasonidos a una amplitud de onda mayor o igual que 90%, asistido de una adición de beta-glucanasas hubiese mostrado resultados más favorables.

Sin embargo, es necesario realizar más estudios sobre la influencia de aplicación de tratamiento de ultrasonidos y la adición de beta- glucanasas en la elaboración de vinos tintos espumosos.

## 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. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x>
- 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)
- Betés-Saura, C., Andrés-Lacueva, C., & Lamuela-Raventós, R. M. (1996). Phenolics in White Free Run Juices and Wines from Penedès by High-Performance Liquid Chromatography: Changes during Vinification. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Blanco-Huerta, C., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., Moyano, R., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2023). Impact of Ageing on Ultrasound-Treated Lees on Volatile Composition and Sensory Properties of Red Sparkling Base Wine. *Beverages*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/beverages9010023>
- Borrull, A., Poblet, M., & Rozès, N. (2015). New insights into the capacity of commercial wine yeasts to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection. *Food Microbiology*, 48, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.006>
- Boulton, R. (2001). The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. In *Am. J. Enol. Vitic* (Vol. 52, Issue 2).
- Cacciola, V., Batllò, I. F., Ferraretto, P., Vincenzi, S., & Celotti, E. (2013). Study of the ultrasound effects on yeast lees lysis in winemaking. *European Food Research and Technology*, 236(2), 311–317. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1893-6>
- Chang, A. C. (2005). Study of ultrasonic wave treatments for accelerating the aging process in a rice alcoholic beverage. *Food Chemistry*, 92(2), 337–342. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.027>
- Chang, A. C., & Chen, F. C. (2002). The application of 20 kHz ultrasonic waves to accelerate the aging of different wines. *Food Chemistry*, 79(4), 501–506. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00226-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00226-1)
- Cheyrier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 298–305.
- Clodoveo, M. L., Dipalmo, T., Rizzello, C. G., Corbo, F., & Crupi, P. (2016). Emerging technology to develop novel red winemaking practices: An overview. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, 41–56. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2016.08.020>
- Cocito, C., Gaetano, G., & Delfini, C. (1995). Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasound. *Food Chemistry*, 52(3), 311–320. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)92830-D](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)92830-D)

- Commission Regulation (EC) No. 606/2009 laying down certain detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No. 479/2008 as regards the categories of grapevine products, oenological practices and the applicable restrictions. (n.d.).
- Consejo Regulador D.O. Cava. (2022). D.O. Cava, datos económicos 2022.
- Cui, Y., Lv, W., Liu, J., & Wang, B. (2012). Effect of different ending fermentation technologies on microbial-stability of Italian Riesling low alcohol sweet white wine. In *Advanced Materials Research* (Vols. 393–395). <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.393-395.1165>
- Del Barrio-Galán, R., Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Williams, P., & Doco, T. (2011). Effect of aging on lees and of three different dry yeast derivative products on verdejo white wine composition and sensorial characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12433–12442. <https://doi.org/10.1021/jf204055u>
- del Fresno, J. M., Loira, I., Morata, A., González, C., Suárez-Lepe, J. A., & Cuerda, R. (2018). Application of ultrasound to improve lees ageing processes in red wines. *Food Chemistry*, 261, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.041>
- del Fresno, J. M., Morata, A., Escott, C., Loira, I., Cuerda, R., & Suárez-Lepe, J. A. (2019). Sonication of yeast biomasses to improve the ageing on lees technique in red wines. *Molecules*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030635>
- Delgado, A. E., Zheng, L., & Sun, D.-W. (2009). Influence of Ultrasound on Freezing Rate of Immersion-frozen Apples. *Food and Bioprocess Technology*, 2(3), 263–270. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0111-9>
- Doco, T., Vuchot, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2003a). Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(3), 150–157.
- Doco, T., Vuchot, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2003b). Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(3), 150–157.
- Fornairon-Bonnefond, C., Camarasa, C., Moutounet, M., & Salmon, J.-M. (2002). New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: a bibliographic review. *OENO One*, 36(2), 49–69. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2002.36.2.974>
- Ganss, S., Kirsch, F., Winterhalter, P., Fischer, U., & Schmarr, H. G. (2011). Aroma changes due to second fermentation and glycosylated precursors in Chardonnay and Riesling sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2524–2533. <https://doi.org/10.1021/jf103628g>
- García, J. (1990). Técnicas analíticas para vino . GAB Sistema de Analítica.
- García Martín, J. F., Guillemet, L., Feng, C., & Sun, D.-W. (2013). Cell viability and proteins release during ultrasound-assisted yeast lysis of light lees in model wine. *Food Chemistry*, 141(2), 934–939. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.081>

- García Martín, J. F., & Sun, D. W. (2013). Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends in Food Science & Technology*, 33(1), 40–53. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2013.06.005>
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2), 1844–1858. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>
- González-Lázaro, M., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestaran, B., Bueno-Herrera, M., López de la Cuesta, P., & Pérez-Magariño, S. (2020). Evaluation of grape ripeness, carbonic maceration and pectolytic enzymes to improve the chemical and sensory quality of red sparkling wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2618–2629. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10291>
- Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F. J., Escudero-Gilete, M. L., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2012). Comprehensive colorimetric study of anthocyanic copigmentation in model solutions. Effects of pH and molar ratio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(11), 2896–2905. <https://doi.org/10.1021/jf2046202>
- Gracin, L., Jambrak, A. R., Juretić, H., Dobrović, S., Barukčić, I., Grozdanović, M., & Smoljanić, G. (2016). Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Applied Acoustics*, 103, 143–147. <https://doi.org/10.1016/J.APACOUST.2015.05.005>
- Guadalupe, Z., Martínez, L., & Ayestarán, B. (2010). Yeast mannoproteins in red winemaking: Effect on polysaccharide, polyphenolic, and color composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(2), 191–200.
- Guadalupe, Z., Palacios, A., & Ayestarán, B. (2007). Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4854–4862. <https://doi.org/10.1021/jf063585a>
- Hernández, T., Estrella, I., Carlavilla, D., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2006). Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2), 116–125. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2005.10.061>
- Hidalgo-Togores, J. (2011). *Tratado de enología*. Mundi Prensa.
- Humbert-Goffard, A., Saucier, C., Moine-Ledoux, V., Canal-Llaubères, R.-M., Dubourdieu, D., & Glories, Y. (2004). An assay for glucanase activity in wine. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(6), 537–543. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.017>
- Jackson, R. S. (1994). *Wine science. Principles and applications*. Academic Press.
- Kollár, R., Šturdík, E., & Šablatúrová, E. (1993). Biochemical, morphological and cytochemical studies of enhanced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica*, 38(6), 473–478. <https://doi.org/10.1007/BF02814398>
- Kulkarni, P., Loira, I., Morata, A., Tesfaye, W., González, M. C., & Suárez-Lepe, J. A. (2015). Use of non-*Saccharomyces* yeast strains coupled with ultrasound treatment as a novel

- technique to accelerate ageing on lees of red wines and its repercussion in sensorial parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1255–1262.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.046>
- Larue, F., Geneix, C., Lafon-lafourcade, S., Bertrand, A., & Ribéreau-gayon, P. (1984). *Premières observations sur le mode d'action des écorces de levure* (Vol. 18).
- Lindner, P., & Shomer, I. (1984). Interference of azide in assays of carbohydrates. *Food Chemistry*, 14(2), 141–153. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0308-8146\(84\)90053-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0308-8146(84)90053-0)
- Liu, L., Loira, I., Morata, A., Suárez-Lepe, J. A., González, M. C., & Rauhut, D. (2016). Shortening the ageing on lees process in wines by using ultrasound and microwave treatments both combined with stirring and abrasion techniques. *European Food Research and Technology*, 242(4), 559–569. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2566-z>
- Loira, I., Vejarano, R., Morata, A., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O., González, M. C., & Suárez-Lepe, J. A. (2013). Effect of *Saccharomyces* strains on the quality of red wines aged on lees. *Food Chemistry*, 139(1), 1044–1051.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.020>
- Marquez, A., Serratos, M. P., & Merida, J. (2013). Pyranoanthocyanin Derived Pigments in Wine: Structure and Formation during Winemaking. *Journal of Chemistry*, 2013, 713028.  
<https://doi.org/10.1155/2013/713028>
- Márquez, T., Millán, C., Souquet, J.-M., & Salmon, J.-M. (2009). Effect of different yeast strains and their culture conditions on the prevention of wine model solution browning by yeast lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3771–3779.  
<https://doi.org/10.1021/jf803839s>
- Martínez-García, R., García-Martínez, T., Puig-Pujol, A., Mauricio, J. C., & Moreno, J. (2017). Changes in sparkling wine aroma during the second fermentation under CO<sub>2</sub> pressure in sealed bottle. *Food Chemistry*, 237, 1030–1040.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.066>
- Martínez-Moreno, R., Morales, P., Gonzalez, R., Mas, A., & Beltran, G. (2012). Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *FEMS Yeast Research*, 12(4), 477–485.  
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00802.x>
- Martínez-Rodríguez, A. J., & Polo, M. C. (2000). Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1081–1085. <https://doi.org/10.1021/jf991047a>
- Martínez-Rodríguez, A. J., & Pueyo, E. (2009). SparklingWines and Yeast Autolysis. In M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 61–80). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_4)
- Martí-Raga, M., Marullo, P., Beltran, G., & Mas, A. (2016). Nitrogen modulation of yeast fitness and viability during sparkling wine production. *Food Microbiology*, 54, 106–114.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.009>

- Mekoue Nguela, J., Sieczkowski, N., Roi, S., & Vernhet, A. (2015). Sorption of grape proanthocyanidins and wine polyphenols by yeasts, inactivated yeasts, and yeast cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 660–670. <https://doi.org/10.1021/jf504494m>
- Mekoue Nguela, J., Vernhet, A., Sieczkowski, N., & Brillouet, J. M. (2015). Interactions of Condensed Tannins with *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells and Cell Walls: Tannin Location by Microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(34), 7539–7545. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02241>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., & 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>
- Morata, A., Palomero, F., Loira, I., & Suárez-Lepe, J. A. (2019). Chapter 11 - New Trends in Aging on Lees. In A. Morata (Ed.), *Red Wine Technology* (pp. 163–176). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00011-6>
- Murphey, J. M., Powers, J. R., & Spayd, S. E. (1989). Estimation of Soluble Protein Concentration of White Wines Using Coomassie Brilliant Blue G-250.
- Navarro, I. (2022). Efecto de la crianza sobre lías tratadas con ultrasonidos en la calidad de vinos tintos. Universidad de Valladolid, Campus Palencia. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/55964/TFG-L3195.pdf?sequence=1>
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). (2023). Compendio de métodos internacionales de análisis de vinos y mostos.
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.062>
- Pérez-Magariño, S., Bueno-Herrera, M., López de la Cuesta, P., González-Lázaro, M., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2019). Volatile composition, foam characteristics and sensory properties of Tempranillo red sparkling wines elaborated using different techniques to obtain the base wines. *European Food Research and Technology*, 245(5), 1047–1059. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3209-y>
- Pérez-Serradilla, J. A., & de Castro, M. D. L. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food Chemistry*, 111(2), 447–456. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.04.019>
- Pozo-Bayón, M. Á., Martínez-Rodríguez, A., Pueyo, E., & 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 & Technology*, 20(6), 289–299. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.03.011>
- Ribéreau-Gayon, P., Glories Y, M. A., & Dubourdieu, D. (2003). *Tratado de enología, Tomo 2: Química del vino. Estabilización y tratamientos.*



- Ribéreau-Gayon, P., & Stonestreet, E. (1965). Determination of anthocyanins in red wine. *Bulletin de La Societe Chimique de France*, 9, 2649–2652. <http://europemc.org/abstract/MED/5848688>
- Rodriguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., & Vila-Crespo, J. (2012). Effect of the addition of  $\beta$ -glucanases and commercial yeast preparations on the chemical and sensorial characteristics of traditional sparkling wine. *European Food Research and Technology*, 235(4), 729–744. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1801-0>
- Ruipérez, V., Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., & Vila-Crespo, J. (2022). Impact of  $\beta$ -glucanases and yeast derivatives on chemical and sensory composition of long-aged sparkling wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 107, 104385. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104385>
- Sartor, S., Toaldo, I. M., Panceri, C. P., Caliarì, V., Luna, A. S., de Gois, J. S., & Bordignon-Luiz, M. T. (2019). Changes in organic acids, polyphenolic and elemental composition of rosé sparkling wines treated with mannoproteins during over-lees aging. *Food Research International*, 124, 34–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.012>
- Sawyer, S., Longo, R., Solomon, M., Nicolotti, L., Westmore, H., Merry, A., Gnoinski, G., Ylia, A., Dambergs, R., & Kerlake, F. (2022). Autolysis and the duration of ageing on lees independently influence the aroma composition of traditional method sparkling wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 28(1), 146–159. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12527>
- Shively, C. E. (2001). Comparison of two procedures for assay of free amino nitrogen [Journal]. *American Journal Of Enology And Viticulture*, 52(4), 400–401.
- Singleton, V. L., & Draper, D. E. (1963). Ultrasonic treatment with gas purging as a quick aging treatment for wine.
- Smith, P. A., Mcrae, J. M., & Bindon, K. A. (2015). Impact of winemaking practices on the concentration and composition of tannins in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 601–614. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12188>
- Ubeda, C., Kania-Zelada, I., del Barrio-Galán, R., Medel-Marabolí, M., Gil, M., & Peña-Neira, Á. (2019). Study of the changes in volatile compounds, aroma and sensory attributes during the production process of sparkling wine by traditional method. *Food Research International*, 119, 554–563. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.032>
- Vasserot, Y., Caillet, S., & Maujean, A. (1997). Study of Anthocyanin Adsorption by Yeast Lees. Effect of Some Physicochemical Parameters. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(4), 433–437. <https://doi.org/10.5344/ajev.1997.48.4.433>
- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P. (2003). The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 439–447. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00152-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00152-8)
- Zeng, X. A., Yu, S. J., Zhang, L., & Chen, X. D. (2008). The effects of AC electric field on wine maturation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 463–468. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2008.03.002>

Zoecklein, B. (2002). A review of méthode champenoise production. Virginia Cooperative Extension Service.

## Anexos

Anexo 1. Tabla de composición química de los vinos base experimentales (Navarro, 2022).

Parámetros		Control sin lías	Control con lías SC	Tratamiento de US 30% durante 10 min	Tratamiento de US 60% durante 10 min	Tratamiento de US 90% durante 10 min
		C	SC	30%	60%	90%
Acidez total (g/L)	AT	5,3 ± 0,0	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,2	5,3 ± 0,1	5,5 ± 0,1
pH	pH	3,39 ± 0,04	3,50 ± 0,08	3,37 ± 0,26	3,35 ± 0,37	3,37 ± 0,03
Grado alcohólico (% v/v)	GA	11,4 ± 0,3	11,4 ± 0,0	11,5 ± 0,0	11,4 ± 0,0	11,4 ± 0,2
Acidez volátil (g/L)	AV	0,44 ± 0,06	0,42 ± 0,04	0,43 ± 0,05	0,47 ± 0,05	0,50 ± 0,03
Antocianos (mg/L)	ANT	190 ± 44	195 ± 52	176 ± 69	138 ± 19	197 ± 61
Polisacáridos neutros (g/L)	PN	2,64 ± 0,33	2,11 ± 0,51	2,18 ± 0,39	2,03 ± 0,06	2,46 ± 0,43
Proteínas solubles (g/L)	PS	0,40 ± 0,04	0,39 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,38 ± 0,02
Nitrógeno fácilmente asimilable (mg/L)	NFA	92 ± 5	96 ± 4	93 ± 4	96 ± 10	100 ± 7
Taninos (g/L)	TAN	2,00 ± 0,26	2,23 ± 0,56	2,29 ± 0,58	1,70 ± 0,15	1,89 ± 0,27

Anexo 2. Tabla de composición química de los vinos base experimentales (Navarro, 2022).

Parámetros		Control sin lías	Control con lías SC	Tratamiento de US 30% durante 10 min	Tratamiento de US 60% durante 10 min	Tratamiento de US 90% durante 10 min
		C	SC	30%	60%	90%
% Amarillo	%Am	30,06 ± 0,33	30,05 ± 0,35	30,04 ± 0,21	30,29 ± 0,08	30,05 ± 0,34
% Rojo	%R	54,31 ± 0,65	54,42 ± 0,60	54,60 ± 0,84	53,92 ± 0,20	54,77 ± 1,22
% Azul	%Az	15,63 ± 0,32	15,53 ± 0,26	15,36 ± 0,63	15,79 ± 0,12	15,18 ± 0,88
Intensidad colorante	IC	0,55 ± 1,43	0,55 ± 1,39	0,55 ± 2,58	0,56 ± 0,17	0,55 ± 2,78
Tonalidad	TON	12,30 ± 0,01	12,64 ± 0,01	12,33 ± 0,01	10,96 ± 0,00	12,60 ± 0,02
Índice de polifenoles totales (280 nm)	IPT	7 ± 0	7 ± 1	7 ± 1	6 ± 0	7 ± 1
Ácidos hidroxicinámicos (280 nm)	AHC	20,55 ± 1,41	21,5 ± 1,9	20,8 ± 1,1	22,1 ± 2,6	21,1 ± 2,2
Flavonoles (280 nm)	Flav	6,88 ± 0,53	7,13 ± 0,74	6,93 ± 0,53	7,40 ± 1,20	7,05 ± 1,06