

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER EN CALIDAD, DESARROLLO E INNOVACIÓN DE ALIMENTOS

CURSO 2023 – 2024



Universidad de Valladolid

“EL EFECTO DEL USO DE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES PARA MEJORAR LA CALIDAD DE LOS VINOS TINTOS ESPUMOSOS EN EL MARCO DEL CAMBIO CLIMÁTICO”

Autor: Pablo Martín Sanz

Tutores: José Manuel Rodríguez Nogales y Raúl Moyano García

Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal

Índice

1. Abreviaturas	4
2. Resumen y palabras clave	5
3. Abstract and keywords	5
4. Introducción	6
5. Material y métodos.....	8
5.1 Proceso de vinificación	8
5.2 Análisis químico de los vinos espumosos	11
5.3 Análisis estadístico	13
6. Resultados y discusión.	13
6.1 Efecto de la coinoculación del vino base con levaduras <i>S</i> y <i>NS</i>	13
6.2 Efecto de la adición de levaduras inactivas <i>S</i> y <i>NS</i> durante proceso de crianza del vino base.....	17
6.3 Efecto de la crianza sobre levaduras inactivas <i>NS</i> añadidas en el tiraje	21
6.4 Análisis de componentes principales.....	24
7. Conclusiones	27
8. Bibliografía.....	27
9. Anexos	35

1. Abreviaturas

FA: Fermentación alcohólica

NS: No-*Saccharomyces*

S: *Saccharomyces*

TD: *Torulaspota delbruecki*

MP: *Metchnikowia pulcherrima*

LT: *Lachancea thermotolerans*

FML: Fermentación maloláctica

LP: Lías propias

NFA: Nitrógeno fácilmente asimilable

AT: Acidez total

AV: Acidez volátil

IPT: Índice de polifenoles totales

AHC: Ácidos hidroxicinámicos

2. Resumen y palabras clave

El cambio climático está afectando a las características organolépticas y fisicoquímicas de los vinos espumosos, obteniendo vinos con mayor grado alcohólico y menor acidez, entre otras modificaciones. En la actualidad están surgiendo diferentes técnicas para paliar estos efectos, como la crianza de los vinos sobre lías, la cual de manera tradicional se ha realizado sobre cepas *Saccharomyces*. En nuestro estudio se realizaron 3 vinificaciones diferentes con coinoculación de cepas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (NS) para elaborar el vino base (vinificación 1), adición de levaduras inactivas NS en el vino base (vinificación 2) o adición de levaduras inactivas NS en el licor de tiraje (vinificación 3). El objetivo del trabajo consiste en valorar las diferencias fisicoquímicas en los vinos espumosos finales obtenidos en los tres procesos de vinificación, de tal forma que encontremos resultados concluyentes que ayuden a resolver los problemas asociados al cambio climático. Los resultados indicaron diferencias entre las tres vinificaciones, encontrando los vinos espumosos con levaduras inactivas NS en el licor de tiraje (vinificación 3) con menor grado alcohólico y astringencia, siendo los vinos procedentes de la crianza con levaduras inactivas NS (vinificación 2) los que mayor contenido polifenólico presentaron, mientras que los vinos procedentes de la vinificación 1 mostraron características fisicoquímicas dispares.

Palabras clave: *Saccharomyces*, no-*Saccharomyces*, crianza sobre lías, vinos espumosos, cambio climático.

3. Abstract and keywords

Climate change is affecting the organoleptic and physicochemical characteristics of sparkling wines, resulting in wines with higher alcohol content and lower acidity, among other changes. Currently, various techniques are emerging to mitigate these effects, such as aging wines on lees, which has traditionally been done using *Saccharomyces* strains. In our study, three different vinifications were conducted: co-inoculation of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* (NS) strains to produce the base wine (vinification 1), addition of inactive NS yeasts in the base wine (vinification 2), and addition of inactive NS yeasts in the tirage liqueur (vinification 3). The aim of the study is to evaluate the physicochemical differences in the final sparkling wines obtained from the three vinification processes, to find conclusive results that help address the problems associated with climate change. The results indicated differences among the three vinifications, with sparkling wines containing inactive NS yeasts in the tirage liqueur (vinification 3) showing lower alcohol content and astringency, while the wines aged on inactive NS yeasts (vinification 2) had the highest polyphenolic content. The wines from vinification 1 exhibited varied physicochemical characteristics.

Keywords: *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces*, aging on lees, sparkling wines, climate change.

4. Introducción

En la actualidad, el cambio climático está afectando a las características fisicoquímicas y organolépticas de los vinos tintos tranquilos y espumosos. De manera generalizada, se está produciendo un adelanto de la vendimia, con un exceso de maduración de las uvas, lo que provoca una producción de mosto con un elevado grado alcohólico potencial, pH más elevados, menor acidez y carencias nutricionales, alterando también características organolépticas como el aumento de astringencia (Sancho, 2022). En relación con el efecto que el cambio climático está provocando sobre los vinos tintos espumosos y tranquilos, se ha observado un cambio en el color, principalmente en el nivel de antocianos y de proantocianinas, las cuales también influyen en el sabor, aumentando la astringencia. Además, se ha detectado modificaciones en el contenido de polisacáridos debido a la rápida maduración de la uva (Royo, 2015).

Una de las técnicas empleadas para paliar los efectos del cambio climático sobre los vinos consiste en la crianza sobre lías. Estas lías están formadas por células muertas producidas durante la fermentación alcohólica (FA) mezcladas con cristales de bitartrato, bacterias y residuos de células vegetales (Royo, 2015). Estas se generan por medio de un proceso de autodegradación enzimática denominado autólisis, producida cuando la levadura muere, en el que se degradan las membranas y paredes celulares liberando al medio enzimas hidrolíticas junto con biopolímeros celulares. En primer lugar, los glucanos de la pared celular se hidrolizan por las enzimas β -glucanasas endógenas liberando manoproteínas atrapadas, después los glucanos se liberan debido a la actividad residual de las β -glucanasas y finalmente la fracción proteica de las manoproteínas se degrada por proteasas endógenas (Babayán y col., 1985).

En los vinos espumosos el proceso de autólisis da lugar a un aumento en la liberación de aminoácidos proveniente de la degradación de los péptidos durante la fermentación en botella y la crianza sobre lías. Además, la actividad β -glucanasa y proteasa da lugar a una gran liberación de polisacáridos durante el proceso de autólisis. También se produce un aumento en la liberación de ácidos grasos, cuya presencia en los vinos espumosos es de gran importancia ya que aportan características aromáticas y contribuyen junto con los polisacáridos y proteínas a la estabilidad de la espuma. En cuanto a los ácidos nucleicos liberados, se ha observado que la degradación del ADN en el proceso de autólisis depende en gran medida de la cepa de levadura utilizada. Por último, la liberación de compuestos volátiles durante el proceso de autólisis se basa, principalmente, en ésteres, alcoholes terpénicos, aldehídos y alcoholes superiores. Todos estos compuestos liberados durante la autólisis y el posterior envejecimiento del vino sobre estas lías le otorgan unas características fisicoquímicas y organolépticas únicas y específicas en las que influye de manera determinante la cepa de levadura utilizada (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006; Del Barrio-Galán, Medel-Marabolí, et al., 2015)

Además, la crianza sobre lías genera un efecto reductor junto con la liberación de sustancias antioxidantes, como el glutatión procedente de las paredes celulares, las cuales protegen los compuestos aromáticos preservando la frescura y el aroma afrutado incluso durante largos periodos de envejecimiento (Gallardo-Chacón et al., 2010).

Tradicionalmente, la crianza sobre lías se ha utilizado con el objetivo de mejorar el perfil sensorial en los vinos blancos envejecidos en barrica, sin embargo, es una técnica que se puede aplicar a vinos tintos mejorando la suavidad de los taninos como resultado de la interacción entre las manoproteínas y los polisacáridos de las paredes celulares con los polifenoles del vino (Morata et al., 2018).

Una limitación importante que encontramos en la crianza sobre lías es que se trata de un proceso que puede durar desde unos pocos meses hasta años, dependiendo del tipo de uva, la cepa utilizada o las condiciones en las que se lleve a cabo. Debido a este factor en los últimos años están apareciendo técnicas novedosas con el objetivo de que se reduzca el tiempo de liberación de los componentes durante el periodo de crianza (Liu et al., 2016).

Dentro de estas técnicas encontramos el uso de las enzimas β -glucanasas que hidrolizan los β -glucanos de las paredes celulares rompiéndola y liberando los polisacáridos (Palomero et al., 2007). El uso de altas presiones hidrostáticas destruye las membranas favoreciendo la despolimerización (Santos et al., 2016) o la aplicación de altas presiones homogéneas a partir de 100 MPa modifica la estructura celular provocando un aumento en la liberación de ácidos grasos y etil ésteres (Comuzzo et al., 2015).

Una de las técnicas que está ofreciendo mejores resultados es el uso de ultrasonidos, su aplicación durante unos pocos minutos favorece la ruptura celular liberando manoproteínas y polisacáridos, incluso se ha observado que la liberación de polisacáridos es de 2 a 4 veces superior en cepas de levaduras no-*Saccharomyces* (NS) (Kulkarni et al., 2015). El uso de campos eléctricos pulsados también ha demostrado acelerar el proceso de autólisis al igual que la microoxigenación, la cual puede aumentar la estabilidad del color en el vino al realizar la crianza sobre lías (Del Barrio-Galán et al., 2011). Por último, encontramos el uso de microondas que al igual que el resto de las técnicas favorece la ruptura celular y la liberación de polisacáridos (Liu et al., 2016).

Otro gran problema que se encuentra en la crianza sobre lías en vinos tintos consiste en la inestabilidad microbiológica; esto se debe a que después de la fermentación, durante la maceración con semillas y hollejos, las lías están contaminadas con otras levaduras diferentes a las que realizan la fermentación, lo que puede provocar aromas a reducción. Para controlar esto se ha propuesto (Morata et al., 2018) la producción externa de biomasa formada por las levaduras que nos interesan para realizar la crianza sobre lías, lo que eliminará la contaminación microbiana, nos permitirá utilizar levaduras diferentes a *Saccharomyces* (S) y las cepas de levaduras se podrán seleccionar en función de su capacidad autolítica y su impacto sensorial en el vino (Martín et al., 2017; Morata et al., 2018).

De manera tradicional, la crianza sobre lías en vinos tintos espumosos y tranquilos se ha realizado a partir de cepas de levaduras S (Loira et al., 2013), sin embargo en los últimos años están surgiendo estudios en los que se utilizan diferentes cepas de levaduras NS, como el llevado a cabo por Ivit & Kemp (2018), en el que se utilizaron cepas de *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Pichia kluyveri* para realizar la segunda fermentación en botella y la crianza sobre lías en vinos espumosos tintos con el objetivo de reducir el grado alcohólico, la acidez volátil, aumentar el contenido en glicerol o potenciar los aromas varietales. En este mismo estudio se

observó que la capacidad para formar espuma es superior en los vinos elaborados con cepas *NS*, mejorando su estabilidad debido a la mayor capacidad para liberar proteínas y polisacáridos provenientes de la pared celular. Otros estudios mostraron que el uso de cepas como *T. delbrueckii* para realizar la segunda fermentación en botella y posterior crianza de vinos tintos espumosos da lugar a un mayor contenido proteico en el vino final tras el envejecimiento en lías (Tofalo et al., 2022). El estudio realizado por Palomero et al. (2009) evidenció que el uso de cepas de *Saccharomyces ludwigii* y *Schizosaccharomyces pombe* durante la fermentación y la crianza sobre lías dio lugar a una liberación entre 3 y 7 veces superior de polisacáridos que por medio de las cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Los aromas secundarios generados en la fermentación por cepas de levaduras *NS* incluyen alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, fenoles volátiles y compuestos sulfurados que influyen en la percepción sensorial de los vinos (Ivit & Kemp, 2018). Estos compuestos aportan aromas florales y frutales en las notas de cata, que junto con los aromas de los ácidos grasos de cadena corta mejoran la frescura y reducen la neutralidad de los vinos en mayor medida que si se utilizan cepas convencionales de *S* (Morata et al., 2020). El uso de cepas como *Lachancea thermotolerans* pueden aumentar el contenido en ácido láctico lo que mejora la percepción sensorial de los vinos con aromas frutales y cítricos. La crianza sobre estas lías mejora la frescura modulando la acidez, lo que también permite una mejoría en la protección del color al modificar el pH junto con la formación de piranoantocianinas y pigmentos poliméricos estables (Morata et al., 2020).

Sin embargo, el uso de cepas de levaduras diferentes a las *S* también ha mostrado efectos negativos en el vino espumoso, como el aumento de precursores de las aminas biógenas como la histidina (Ivit et al., 2018). Además, existen otros problemas al utilizar este tipo de cepas como la dificultad de desarrollo en mostos que dispongan de una microflora autóctona, junto con un efecto sensorial negativo en el vino (Morata et al., 2020).

Este Trabajo de Fin de Máster se encuentra en el marco de la Tesis Doctoral de D. Raúl Moyano "Uso de lías de levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración de vinos espumosos tintos". Nuestro objetivo principal consiste en realizar un análisis del efecto de la crianza del vino base (i) con lías procedentes de la FA con diferentes cepas *NS*, o (ii) con levaduras comerciales *NS* inactivas, y (iii) del uso de levaduras comerciales *NS* inactivas aplicadas en el licor de tiraje sobre las características fisicoquímicas de los vinos tintos espumosos.

5. Material y métodos

5.1 Proceso de vinificación

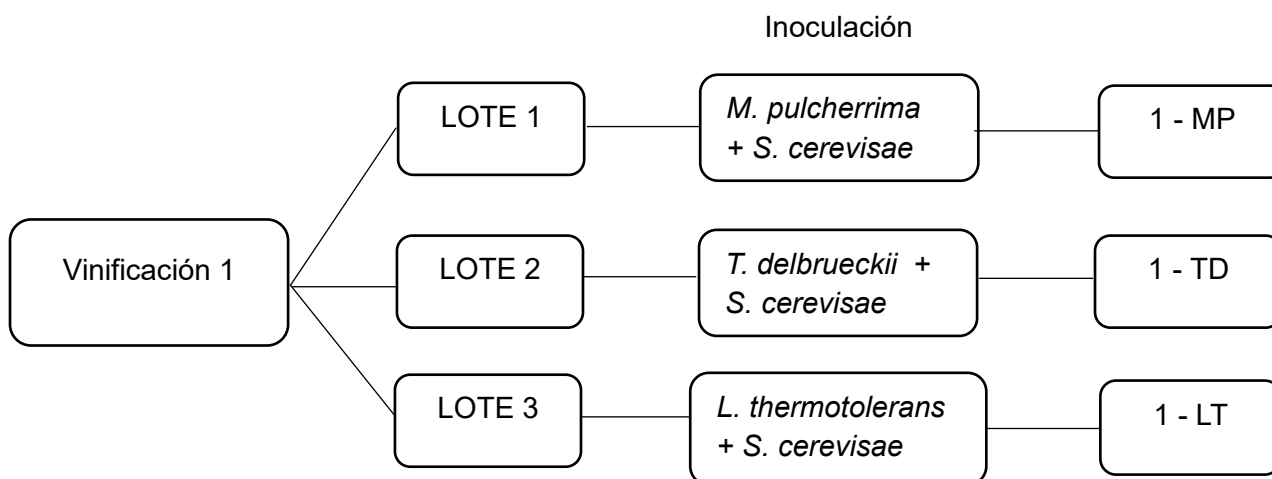
El proceso de vinificación de los vinos espumosos se realizó por medio del método tradicional o *champenoise* realizando una primera FA en depósito para obtener un vino base, junto con una segunda fermentación y crianza sobre lías en botella. Para la realización de la FA y la fermentación maloláctica (FML) se utilizaron levaduras y bacterias procedentes de la casa comercial Lallemant Oenology (Barcelona, España).

Para la obtención de los vinos base se utilizaron 500 kg de uva tinta de la variedad Tempranillo de la localidad de Torquemada (Palencia) de la añada 2022. La vendimia despalillada y estrujada se sulfitó con 30 mg/L de sulfuroso total en forma de metabisulfito potásico. A continuación, se describen los tres tipos de vinificaciones que se realizaron por duplicado.

Vinificación 1

Para la realización de la FA y la FML en los vinos base de la vinificación 1, se separaron tres lotes que diferían en el tipo de inoculación empleada para desarrollar la FA:

- Lote 1: Inoculación secuencial de *Metschnikowia pulcherrima* en una dosis de 25 g/HI y *S. cerevisiae* LALVIN 11188EC (20 g/HI) tras 24 horas. El vino espumoso elaborado a partir de este lote corresponde con la codificación 1 - MP.
- Lote 2: Inoculación secuencial de *Torulaspora delbrueckii* en una dosis de 25 g/HI y *S. cerevisiae* (20 g/HI) tras 24 horas. El vino espumoso elaborado a partir de este lote corresponde con la codificación 1 - TD.
- Lote 3: Inoculación secuencial de *Lachancea thermotolerans* en una dosis de 25 g/HI y *S. cerevisiae* (20 g/HI) tras 24h. El vino espumoso elaborado a partir de este lote corresponde con la codificación 1 - LT.



Esquema 1. Proceso de vinificación 1: coinoculación de *S. cerevisiae* con levaduras NS para realizar la FA de los vinos base.

Para la realización del proceso de FML se inoculó en todos los vinos una cepa de *Oenococcus oeni* BAL VP41 en una dosis de 1 g/HI. Tras finalizar esta, se realizó un trasiego para permanecer con las lías finas.

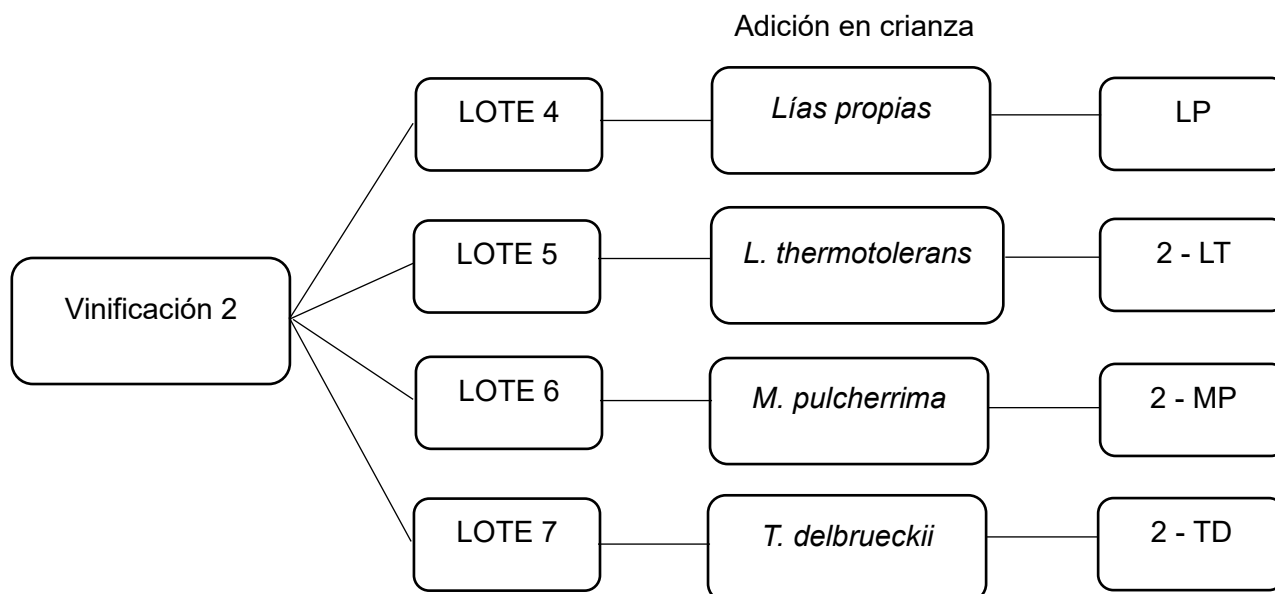
Los vinos base, siguen una posterior crianza sobre las lías durante cinco meses con un removido de las lías semanal.

La elaboración de los vinos espumosos siguió el proceso *champenoise* por lo que se realizó la adición de la levadura *S. cerevisiae* LALVIN 11188EC en una dosis de 20 g/HI, sacarosa a 24 g/l y bentonita Bengel (Agrovin, Ciudad Real, España) a 20 g/HI para la realización del tiraje en botella. A partir de aquí se realizó una crianza de 9 meses en botella de forma horizontal. Pasado este tiempo se realizó el degüelle y como licor de expedición se adicionó el mismo vino espumoso.

Vinificación 2

Para el proceso de vinificación 2 se utilizó el vino base elaborado del Lote 8 en el cual la FA se realizó únicamente con *S. cerevisiae*. Se elaboraron otros 4 lotes más, en los que se utilizarán lías propias de un depósito siempre lleno (Lote 4) o se añadirán levaduras inactivas NS experimentales (Lallemand Oenology) (Lote 5-Lote 7), con un proceso de crianza sobre lías durante cinco meses y un removido semanal de las lías:

- Lote 4: Se utilizarán lías propias de la FA con *S. cerevisiae* en una dosis de 25 g/Hl. El vino elaborado a partir de este lote tendrá la codificación LP.
- Lote 5: Se añadieron levaduras inactivas de *L. thermotolerans* en una dosis de 25 g/Hl. El vino elaborado a partir de este lote tendrá la codificación 2 - LT.
- Lote 6: A este lote se añadieron levaduras inactivas de *M. pulcherrima* en una dosis de 25 g/Hl. El vino elaborado a partir de este lote tendrá la codificación 2 - MP.
- Lote 7: En este lote se añadió levaduras inactivas de *T. delbrueckii* en una dosis de 25 g/Hl. El vino elaborado a partir de este lote tendrá la codificación 2 - TD.



Esquema 2. Proceso de vinificación 2: crianza del vino base con lías de *S. cerevisiae* y levaduras inactivas NS.

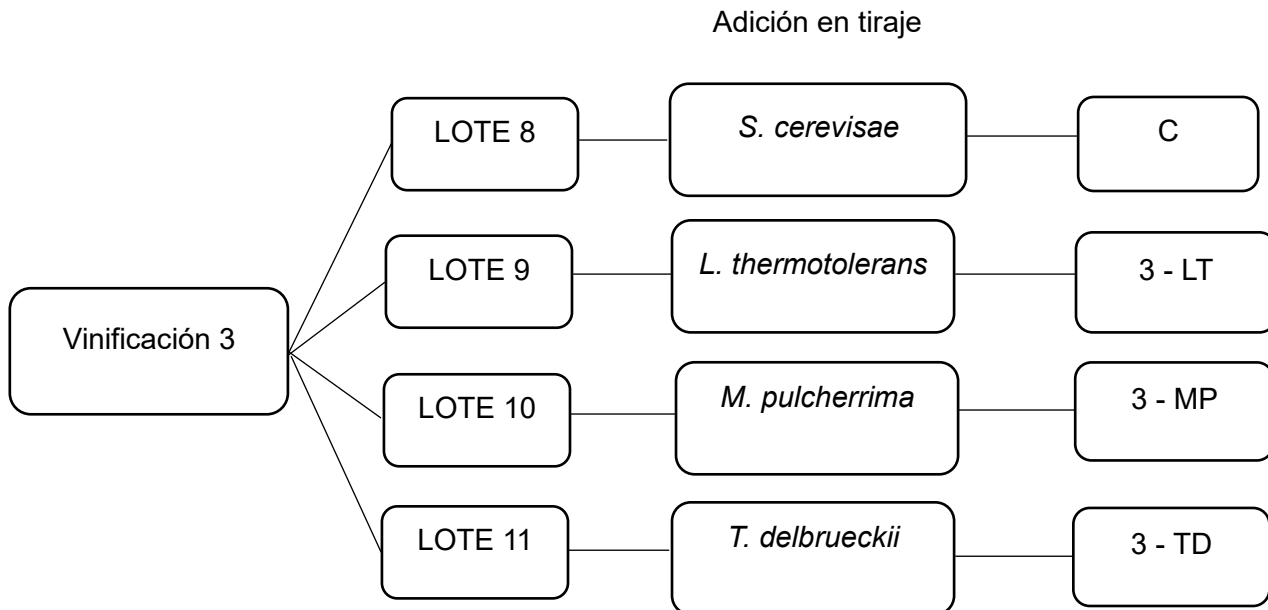
La elaboración de los vinos espumosos fue el mismo que el indicado en la vinificación 1.

Vinificación 3.

Por último, a partir del vino base obtenido del lote 8 se preparan otros tres lotes más a partir de las levaduras inactivas NS de la vinificación 2, pero adicionadas en el licor de tiraje:

- Lote 8: Siembra única de *S. cerevisiae* LALVIN 11188EC en una dosis de 20 g/Hl. El vino espumoso elaborado a partir de este lote se utilizará como control y se corresponde con la codificación C.

- Lote 9: Se preparó a partir de levaduras inactivas de *L. thermotolerans* en una dosis de 25 g/Hl adicionada en el licor de tiraje. A partir de este lote se elaboró el vino que se corresponde con la codificación 3 - LT.
- Lote 10: Se preparó a partir de levaduras inactivas de *M. pulcherrima* en una dosis de 25 g/Hl añadida en el tiraje. A partir de este lote se elaboraron los vinos con la codificación 3 - MP.
- Lote 11: Se preparó a partir de levaduras inactivas de *T. delbrueckii* en una dosis de 25 g/Hl añadida en el tiraje. A partir de este lote se elaboraron los vinos con la codificación 3 - TD.



Esquema 3. Proceso de vinificación 3: crianza del vino espumoso con levaduras inactivas NS añadidas en el licor de tiraje.

El protocolo de elaboración de los vinos espumosos es el mismo al indicado en la vinificación 1 y 2.

5.2 Análisis químico de los vinos espumosos

Antes de realizar los análisis, todas las muestras de vino fueron sonicadas y centrifugadas (4.000 rpm, 10 min) para la eliminación del CO₂ y así evitar posibles interferencias en el análisis.

5.2.1 Parámetros básicos

- Grado alcohólico

La medición del grado alcohólico de los vinos espumosos se realizó por el método de ebulloimetría (Madrid et al., 2003), por el cual se calcula el % en volumen de alcohol en el vino en función de la diferencia en el punto de ebullición entre el agua y el vino espumoso.

- pH y acidez total (AT)

La medición del pH y la AT se realizó por el método potenciométrico (Nazralla et al., 2009). Se midió el pH por medio de los electrodos del pH-metro y la acidez total por medio de una valoración con NaOH 0,1N hasta alcanzar el pH 7.

- Acidez volátil (AV)

La AV se midió por el método García Tena (García, 1976) que consiste en la separación del ácido acético del vino mediante una destilación directa y parcial, posteriormente valorado con NaOH 0,01 N hasta virar a color rosa con unas gotas de fenoftaleína como indicador.

- Azúcares reductores

La medición de los azúcares reductores se realizó por el método Rebeleim (Madrid et al., 2003) que consiste en la oxidación de los azúcares reductores con una disolución de cobre divalente en medio alcalino y caliente.

5.2.2 Parámetros específicos

- Polisacáridos totales

La medición de los polisacáridos en vino se realizó según el método del fenol-ácido sulfúrico (Lindner & Shomer, 1984) que consiste en la formación de complejos coloreados entre el fenol y los productos de degradación de los carbohidratos en presencia de ácido sulfúrico.

- Proteínas solubles

La determinación de proteínas solubles se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976), el cual se basa en la capacidad del colorante azul brillante de Coomassie de unirse a las proteínas. El máximo de absorbancia del colorante a 465 nm cambia a 595 nm cuando se une a las proteínas.

- Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA)

El NFA se determinó por el método Sorensen, cuyo fundamento se basa en que el nitrógeno amónico y α -amino, reaccionan con formaldehído liberando 2 H⁺ que se valoran con hidróxido sódico (Madrid et al., 2003).

- Índice de gelatina

Para determinar la astringencia del vino espumoso se midió el índice de gelatina. El fundamento se basa en la propiedad de los taninos de formar con las proteínas combinaciones estables (Hidalgo, 2011; Llaudy et al., 2004).

5.2.3 Color y compuestos fenólicos

- Antocianos totales

Los antocianos totales se analizaron según el método fundamentado en la decoloración mediante bisulfito de sodio de los antocianos, en la cual la decoloración es proporcional al contenido en antocianos libres (Ribéreau-Gayon et al., 1965).

- Taninos

La concentración de taninos se midió según el método de referencia de Ribereau-Gayon y Stonestreet (1966) (Hidalgo, 2011), que consiste en la hidrólisis de estos compuestos en un ambiente ácido que libera cationes altamente inestables que precipitan en forma de polímeros de color marrón.

- Índice de polifenoles totales (IPT)

La medición de los IPT se realizó, previa dilución del vino, a 280 nm (Zamora, 2003).

- Ácidos hidroxicinámicos (AHC)

El contenido en flavonoles se midió a 320 nm (Lacueva et al., 1997) y al igual que para los IPT se diluyó la muestra con agua destilada.

- Flavonoles

Para la medición de los flavonoles se midió la absorbancia a 365 nm (Lacueva et al., 1997). Al igual que en los dos casos anteriores se diluyó la muestra.

- Color (Método de CIELAB)

La medición del color se realizó mediante el método de CIELAB (Esparza et al., 2009). Para ello se midió la absorbancia del vino espumoso sin diluir en cubetas de 1 mm de vidrio a 450, 520, 570 y 630 nm y se introdujeron los datos en el programa MSCV para así obtener los parámetros de tono e intensidad de color junto con las coordenadas cromáticas L*, a* y b*.

5.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como media \pm desviación típica junto con sus correspondientes subconjuntos. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) univariante para el cual suponemos que las varianzas eran iguales en todas las medias. Se estudió la interacción y se determinaron las diferencias mediante la prueba de Tukey con un 95% de confianza. También se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con las medias obtenidas de todos los vinos. El análisis ANOVA se realizó mediante el programa estadístico IBM SPSS statistics, v.29 (Chicago, EEUU) mientras que el análisis de componentes principales se llevó a cabo con el programa estadístico Statgraphics Centurion, v.19, Inc (The plains, VA, EE.UU).

6. Resultados y discusión.

Los resultados obtenidos tras el análisis químico de los vinos espumosos se presentan en forma de tabla, expresando la media \pm desviación típica y el subconjunto al que pertenece cada dato.

6.1 Efecto de la coinoculación del vino base con levaduras S y NS.

En este proceso se llevará a cabo la comparación entre los vinos obtenidos en los lotes 1 (1 - MP), 2 (1 - TD) y 3 (1 - LT) coinoculados con cepas de S y NS, y posteriormente criados sobre sus lías y su control, que en este caso es el vino obtenido en el lote 4 (LP), el cuál ha realizado una crianza sobre lías de *S. cerevisiae* únicamente (tabla 1). En

este caso el objetivo consiste en valorar las posibles diferencias existentes en los vinos espumosos finales cuando se realiza la fermentación del vino base con *S* y *NS* o únicamente con *S* y su posterior crianza sobre las lías propias.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de los vinos espumosos procedentes de la vinificación 1.

	LP (Control)	1 - MP	1 - TD	1 - LT
Grado alcohólico (% v/v)	12,7 ± 0,3 b	12,5 ± 0,1 b	12,6 ± 0,1 b	11,8 ± 0,2 a
pH	3,50 ± 0,17 a	3,53 ± 0,06 a	3,53 ± 0,11 a	3,63 ± 0,04 a
AT (g/l)	4,6 ± 0,5 a	4,5 ± 2,1 a	4,4 ± 0,1 a	4,7 ± 0,2 a
AV (g/l)	0,38 ± 0,08 a	0,36 ± 0,04 a	0,34 ± 0,04 a	0,49 ± 0,02 b
Proteínas (mg/l)	479,2 ± 17,5 a	494,3 ± 69,9 a	420,8 ± 32,0 a	431,9 ± 20,4 a
NFA (mg/l)	98,0 ± 7,2 c	95,2 ± 4,6 bc	78,4 ± 4,6 ab	65,8 ± 15,4 a
Azúcares reductores (g/l)	1,10 ± 0,18 a	0,93 ± 0,10 a	1,20 ± 0,16 a	1,23 ± 0,21 a
Polisacáridos (g/l)	7,92 ± 0,45 b	5,86 ± 0,55 a	4,67 ± 0,16 a	4,69 ± 1,04 a
IPT (UA)	49,9 ± 1,2 c	43,5 ± 1,6 b	34,5 ± 1,0 a	34,0 ± 0,3 a
AHC (UA)	21,90 ± 0,56 c	20,73 ± 0,56 b	16,73 ± 0,39 a	17,00 ± 0,32 a
Flavonoles (UA)	7,73 ± 0,29 b	7,30 ± 0,29 b	5,40 ± 0,23 a	5,68 ± 0,15 a
Antocianos (mg/l)	192,4 ± 44,9 c	174,3 ± 12,2 bc	142,4 ± 8,3 ab	107,4 ± 4,8 a
Taninos (g/l)	2,46 ± 0,17 b	2,34 ± 0,21 b	1,89 ± 0,09 a	1,89 ± 0,25 a
Índice de gelatina (%)	58,99 ± 4,10 b	67,59 ± 2,05 c	67,79 ± 1,53 c	24,91 ± 4,99 a
Tono	0,65 ± 0,01 a	0,68 ± 0,01 b	0,68 ± 0,00 b	0,66 ± 0,01 a
Intensidad de color	1,07 ± 0,11 a	1,31 ± 0,12 b	0,90 ± 0,03 a	1,03 ± 0,08 a
L*	68,73 ± 2,36 b	63,83 ± 2,77 a	73,25 ± 0,87 c	69,58 ± 1,76 bc
a*	28,52 ± 1,93 b	29,24 ± 1,48 b	24,32 ± 0,52 a	26,45 ± 0,91 ab
b*	-1,79 ± 0,34 a	-0,08 ± 0,54 b	-0,61 ± 0,27 b	-1,78 ± 0,67 a

AT: acidez total, AV: acidez volátil, NFA: nitrógeno fácilmente asimilable, IPT: índice de polisacáridos totales, UA: unidades arbitrarias, AHC: ácidos hidroxicinánicos

Respecto al grado alcohólico y de acuerdo con Tofalo et al. (2022) el vino que ha sido inoculado únicamente con *S. cerevisiae* (LP) obtuvo un grado alcohólico superior a aquellos que fueron coinoculados con *S* y *NS*, aunque solo se encontró una diferencia estadísticamente significativa con el vino 1 - LT. Se ha descrito una reducción moderada del rendimiento de etanol cuando se utilizan cepas *NS* y *S. cerevisiae* en coinoculación o inoculación secuencial, con reducciones de la concentración de etanol que oscilan entre el 0,2 y el 0,7%, en comparación con la concentración de etanol alcanzada con un único inóculo de *S. cerevisiae* (Contreras et al., 2014; Ferraro et al., 2000; Maio et al., 2012; Sadoudi et al., 2012). Estos descensos en el grado alcohólico no estuvieron asociados con los azúcares reductores ya que su concentración fue muy similar en los cuatro vinos, sino probablemente estas cepas desvíen el metabolismo del carbono de la producción de etanol a otros metabolitos secundarios (Kutyna et al., 2010).

Los vinos coinoculados con *S* y *NS* han presentado un ligero aumento de pH respecto al control, aunque no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre

las muestras de acuerdo con Blasco & Lizama (2019). En contraposición con este mismo estudio observamos que los valores de AT disminuyeron respecto al control, a excepción del vino 1 - LT que aumentó, aunque de manera no significativa. Se ha observado que la inoculación con levaduras *S* y *NS* puede aumentar o reducir la AT de los vinos finales, dependiendo de la especie de levadura y de la proporción de inóculo utilizada (Comitini et al., 2011).

Del mismo modo, los valores de AV son similares respecto al control a excepción del vino 1 - LT que mostró un aumento significativo de este valor, como ocurrió en el estudio de Blasco & Lizama (2019), ya que algunas coinoculaciones mostraron un aumento de AV mientras que en otras apenas varió. En cualquier caso, los valores de AV se encuentran por debajo del valor límite máximo aceptable en la mayoría de los vinos (1 g/L) (Vilela, 2019).

Los vinos espumosos se caracterizan por la presencia de espuma, cuya estabilidad se ha estudiado que se encuentra directamente relacionada con el contenido en proteínas y NFA (Condé et al., 2017). Los vinos coinoculados con *S* y *NS* procedentes de la vinificación 1, mostraron niveles de proteínas similares, encontrando un ligero aumento en el vino 1- MP respecto al control, aunque de manera no significativa, en contraposición con el estudio realizado por González-Royo et al. (2015) que encontró niveles superiores en aquellos vinos coinoculados con *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* respecto a *S. cerevisiae*. Esta diferencia se puede deber al menor peso de la fracción molecular de las levaduras *NS* (< 60 kDa), que se encarga de aportar una mayor estabilidad a la espuma formada. En el caso del NFA, al igual que de proteínas, obtuvimos valores inferiores en aquellos vinos coinoculados con cepas *S* y *NS*, llegando a encontrar una disminución estadísticamente significativa en el caso del vino 1 – LT y el vino 1 – TD. Esta disminución se puede deber a que las cepas utilizadas de *NS* consumen mayor cantidad de NFA durante su metabolismo. El estudio realizado por Taillandier et al. (2014) mostró que al realizar una coinoculación secuencial con *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae* no pudo desarrollarse debido a que la cepa *T. delbrueckii* agotó el nitrógeno disponible durante las primeras horas.

Los polisacáridos junto con las manoproteínas liberadas en el proceso de autólisis y su posterior crianza sobre lías contribuyen de manera importante al perfil químico y sensorial del vino. Los polisacáridos pueden unirse a los taninos disminuyendo la astringencia y el amargor, además de ayudar a formar una espuma más estable (Del Barrio-Galán, Cáceres-Mella, et al., 2015). Las manoproteínas son compuestos complejos formados en un 90% por polisacáridos y un 10% por proteínas, estas junto con los polisacáridos tienen la capacidad de absorber compuestos fenólicos aumentando su estabilidad (Del Barrio-Galán et al., 2012). Además, tienen la capacidad de interactuar con los taninos y los antocianos evitando así su precipitación y mejorando la estabilización del color y previniendo su oxidación debido a su afinidad por el oxígeno compitiendo con los polifenoles (Del Barrio-Galán, Medel-Marabolí, et al., 2015).

En los vinos coinoculados con *S* y *NS* se observó una disminución del contenido en polisacáridos final de manera significativa respecto al control. Este resultado se encuentra de acuerdo con González-Royo et al. (2015), quienes encontraron una disminución significativa de este parámetro en aquellos vinos coinoculados con *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* respecto a inoculación única con *S. cerevisiae*.

Entre los vinos comparados en este grupo no hubo diferencias significativas en el contenido de azúcares reductores, siendo estos valores cercanos a 1 g/l, por lo que pueden clasificarse como vinos *brut nature*, ya que el contenido en azúcares residuales fue < 3 g/l de acuerdo con la legislación vigente (Consejo regulador del cava, 2022). Estos valores de azúcares reductores coinciden con el estudio realizado por Tofalo et al. (2022), en el que se observó que los niveles de azúcares residuales en los vinos espumosos inoculados con *S. cerevisiae* y los coinoculados con *S. cerevisiae* y cepas NS como *T. delbrueckii* se encontraban entorno 1 g/l.

La variación en el contenido de polifenoles puede aparecer tras el proceso de crianza sobre lías en vinos espumosos debido a la liberación de manoproteínas durante la autólisis, de tal forma que estas se pueden unir a los compuestos fenólicos dando lugar a fenómenos de precipitación o a la formación de coloides inestables (Sartor et al., 2019).

En la vinificación 1 se ha producido una disminución en el contenido de IPT en los vinos coinoculados con S y NS respecto a los que únicamente han sido inoculados con S. El comportamiento de AHC y flavonoles fue similar al de los IPT encontrando diferencias significativas entre el control y algunos vinos como 1 – LT o 1 – TD en cuanto al contenido en AHC.

En el proceso de vinificación 1 encontramos resultados concluyentes con Carrascosa & Abad (2021) quien observó que al realizar una inoculación con S y NS se produjo una disminución en el contenido de taninos y antocianos totales respecto a la inoculación únicamente con *S. cerevisiae*.

En relación con el contenido en taninos encontramos el índice de gelatina, que hace referencia a la capacidad de estos para precipitar en contacto con proteínas, lo que se encuentra en relación directa con la astringencia, de tal manera que, a mayor índice de gelatina mayor astringencia (Vidal et al., 2003). En el proceso de vinificación 1 encontramos resultados dispares, de acuerdo con Carrascosa & Abad (2021) algunas cepas coinoculadas con S y NS como 1 – LT mostraron una disminución de la astringencia de manera significativa respecto al control debido a su capacidad de unión a las proteínas, sin embargo, otras como 1 – TD o 1 – MP aumentaron de manera significativa la astringencia al coinocular S y NS. Se ha descrito que el efecto de la coinoculación de S y NS sobre la astringencia de los vinos tintos depende en gran medida de la especie de levadura empleada. A modo de ejemplo, mientras que la coinoculación con *Pichia fermentans* / *S. cerevisiae* dio lugar a un vino más astringente, el vino elaborado con *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* resultó ser menos astringente (Romani et al., 2020).

En esta vinificación encontramos resultados similares en cuanto a la intensidad de color de los vinos coinoculados con S y NS de acuerdo con Blasco & Lizama (2019), aunque observamos un aumento de manera significativa en el vino 1 - MP. A diferencia del estudio de Blasco & Lizama (2019) en cuanto al tono encontramos un ligero aumento en aquellos vinos que sufrieron coinoculación con S y NS, llegando a encontrarse valores significativos en algunos vinos como 1 – MP o 1 – TD.

Por último, respecto al color analizamos los parámetros L^* , a^* y b^* , en este caso, encontramos algunas diferencias significativas entre los vinos coinoculados con cepas *NS* y *S*, y los únicamente inoculados con *S*. El vino coinoculado con *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* (1 - TD), mostró un aumento de L^* y de b^* y un descenso de a^* de manera significativa respecto al control, lo que puede deberse a la adsorción de compuestos fenólicos a las paredes celulares (Huang, 1955). Por otro lado, en el caso del vino coinoculado con *L. thermotolerans* (1 - LTL) no se observaron diferencias significativas respecto al control, mientras que en el vino coinoculado con *M. pulcherrima* (1 - MP) se observó una disminución del parámetro L^* y un aumento de los parámetros a^* y b^* , lo cual como hemos explicado anteriormente, se puede deber a la diferencia en la absorción de compuestos fenólicos por las paredes celulares en función de la cepa de levadura utilizada.

Un análisis global de los datos nos indica que el vino espumoso control se caracterizó por presentar altos niveles en los compuestos de la familia de fenoles y polifenoles (ITP, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, taninos y antocianos), así como en la intensidad de color y en el parámetro de color a^* (color rojo). Además, presentó altos valores de NFA, proteínas y polisacáridos totales. Por otro lado, el vino 1 - MP tuvo altos valores para los antocianos y taninos, así como para el índice de gelatina. También tuvo un alto valor para el NFA, el grado alcohólico y el parámetro de color b^* . En cuanto al vino 1 - TD presentó una alta luminosidad (L^*) y tonalidad, así como un alto índice de gelatina. Finalmente, el vino coinoculado con *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* (1 - LT) fue el menos astringente (menor valor de índice de gelatina) con bajos valores en los compuestos fenólicos y polifenólicos, así como en proteínas, NFA y polisacáridos.

6.2 Efecto de la adición de levaduras inactivas *S* y *NS* durante proceso de crianza del vino base.

En la tabla 2 se comparan los vinos espumosos obtenidos en los lotes 5 (2 - LT), 6 (2 - MP) y 7 (2 - TD), cuyos vinos base han sido fermentados con *S. cerevisiae* y, posteriormente, se han añadido levaduras inactivas *NS* para realizar la crianza sobre lías, utilizando como en el caso anterior el vino obtenido en el lote 4 como control, el cual tiene una crianza con lías de *S. cerevisiae*. En este caso el objetivo es valorar las diferencias en los vinos espumosos finales cuando se ha realizado la FA del vino base con *S. cerevisiae* en todos los casos, pero la crianza sobre lías se ha realizado por medio de lías de levaduras de *S* o *NS*.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de los vinos espumosos procedentes de la vinificación 2.

	LP (Control)	2 - LT	2 - MP	2 - TD
Grado alcohólico (% v/v)	12,7 ± 0,3 a	12,4 ± 0,2 a	12,4 ± 0,1 a	12,7 ± 0,4 a
pH	3,50 ± 0,17 a	3,67 ± 0,05 a	3,63 ± 0,15 a	3,77 ± 0,13 a
AT (g/l)	4,6 ± 0,5 b	4,1 ± 0,1 ab	3,9 ± 0,2 a	4,0 ± 0,1 a
AV (g/l)	0,38 ± 0,08 a	0,33 ± 0,02 a	0,33 ± 0,04 a	0,32 ± 0,03 a
Proteínas (mg/l)	479,2 ± 17,5 a	398,3 ± 95,5 a	490,6 ± 50,9 a	481,6 ± 14,1 a
NFA (mg/l)	98,0 ± 7,2 a	110,6 ± 10,8 a	96,6 ± 8,4 a	95,2 ± 16,5 a
Azúcares reductores (g/l)	1,10 ± 0,18 ab	0,73 ± 0,50 a	1,10 ± 0,14 ab	1,78 ± 0,61 b
Polisacáridos (g/l)	7,92 ± 0,45 b	4,53 ± 0,46 a	4,34 ± 0,41 a	4,32 ± 0,51 a
IPT (UA)	49,9 ± 1,2 a	49,2 ± 2,0 a	49,2 ± 2,6 a	53,0 ± 3,2 a
AHC (UA)	21,90 ± 0,56 a	20,78 ± 0,37 a	20,78 ± 1,25 a	22,98 ± 1,60 a
Flavonoles (UA)	7,73 ± 0,29 ab	7,25 ± 0,27 a	7,45 ± 0,53 a	8,58 ± 0,72 b
Antocianos (mg/l)	192,4 ± 44,9 a	238,2 ± 29,3 a	170,8 ± 34,7 a	213,3 ± 8,3 a
Taninos (g/l)	2,46 ± 0,17 a	2,88 ± 0,57 a	2,72 ± 0,15 a	2,80 ± 0,87 a
Índice de gelatina (%)	58,99 ± 4,09 a	68,55 ± 2,20 b	57,62 ± 5,33 a	65,24 ± 3,30 ab
Tono	0,65 ± 0,01 a	0,63 ± 0,01 a	0,65 ± 0,02 a	0,64 ± 0,02 a
Intensidad de color	1,07 ± 0,11 a	1,24 ± 0,12 a	1,11 ± 0,13 a	1,26 ± 0,11 a
L*	68,73 ± 2,36 a	65,23 ± 2,70 a	68,03 ± 3,12 a	64,55 ± 2,54 a
a*	28,52 ± 1,93 a	31,54 ± 2,52 a	28,75 ± 2,75 a	31,19 ± 2,05 a
b*	-1,79 ± 0,34 a	-1,14 ± 0,09 a	-1,24 ± 0,31 a	-1,42 ± 0,34 a

AT: acidez total, Av: acidez volátil, NFA: nitrógeno fácilmente asimilable, IPT: índice de polisacáridos totales, UA: unidades arbitrarias, AHC: ácidos hidroxicinámicos

A diferencia de lo observado en la tabla 1, las diferencias entre las características fisicoquímicas de los vinos sometidos a una crianza con lías inactivas S y NS fueron menores a las encontradas al realizar la coinoculación con S y NS y posterior crianza sobre sus lías. Desde el punto de vista estadístico, únicamente se observaron diferencias entre las muestras para AT, azúcares reductores, polisacáridos, flavonoles e índice de gelatina.

En consonancia con el estudio realizado por Domingo et al. (2022) no se encuentran diferencias significativas en el grado alcohólico entre los vinos criados con lías S y NS, Este resultado es lógico ya que la crianza sobre lías se realizó sobre el mismo vino base fermentado con la levadura *S. cerevisiae*, por lo que no se espera diferencias para el grado alcohólico.

El pH de acuerdo con Domingo et al. (2022) ha sufrido un ligero aumento en aquellos vinos criados con cepas NS respecto al control, aunque no de manera significativa. Por otro lado, encontramos que la AT es menor en aquellos vinos que sufrieron crianza sobre

lías *NS* respecto al control que tuvo crianza sobre lías de *S*, de acuerdo con Ivit et al. (2018). Tradicionalmente las cepas de levaduras *NS* han mostrado una mayor producción de ácido acético (Domizio et al., 2011), sin embargo, recientes estudios (Ivit & Kemp, 2018) y de acuerdo con nuestros resultados, aquellos vinos que han sufrido crianza sobre lías *NS* como *M. pulcherrima* muestran unos niveles inferiores de AV, aunque no sea de manera significativa.

Como hemos explicado anteriormente, el contenido en proteínas juega un papel crucial en la estabilización de la espuma en este tipo de vinos. El proceso de crianza sobre lías lleva consigo la liberación de proteínas procedentes de la degradación de la pared celular. Se ha observado que el contenido en proteínas en vinos tintos sometidos a un proceso de crianza sobre lías de levaduras *NS* es mayor respecto al vino con lías de *S. cerevisiae* (Belda, et al., 2016). En nuestro caso no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los vinos criados con *S* y *NS*, aunque en alguna cepa (*M. pulcherrima*, 2 - MP) sí que se observó un ligero aumento. Respecto al NFA en este grupo tampoco se observaron apenas diferencias entre el vino control con crianza con lías *S. cerevisiae* y los vinos criados con *NS*. Sin embargo, se ha observado que la crianza sobre lías juega un papel importante en la liberación de compuestos nitrogenados al vino y en su complejidad, ya que cuanto mayor es el tiempo de contacto con las lías, los compuestos nitrogenados liberados se encuentran menos polimerizados, y por tanto la cantidad de NFA aumentaría (Martínez-Rodríguez & Polo, 2000).

En cuanto al contenido en azúcares reductores, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los vinos criados sobre cepas *S* y *NS*. Lo que indica que no hubo una desviación del proceso de crianza sobre lías. Otros autores han encontrado un aumento en el contenido de azúcares residuales en vinos blancos tras el uso de cepas *NS* (Ivit et al., 2018).

En nuestro estudio se observó una diferencia significativa en la cantidad de polisacáridos liberados al vino entre los vinos en crianza con lías *NS* y *S*, siendo superior en esta última. Este hecho no coincide con Palomero et al. (2009), que observó que el contenido en polisacáridos era superior en los vinos con crianza en lías *NS* debido a una mayor liberación por parte de las paredes celulares. Estos resultados están en consonancia con los encontrados en la vinificación 1, donde los vinos espumosos elaborados con los vinos base coinoculados presentaron un menor contenido en polisacáridos que el vino control.

Se ha descrito una unión de los compuestos fenólicos, tales como los antocianos, taninos y los AHC, a las lías durante el proceso de crianza sobre lías, lo que afecta al perfil sensorial del vino disminuyendo así el amargor. Esta unión provoca que al medir estos parámetros se observe una disminución en su concentración respecto al vino base sin crianza (Mazauric & Salmon, 2005). Este proceso es dependiente del tiempo que las lías estén en contacto con el vino. Según aumenta el tiempo de contacto con las lías, la capacidad para consumir oxígeno de los polifenoles aumenta levemente, mientras que la capacidad de las lías de levaduras de consumir oxígeno disminuye de manera sustancial, lo que otorga una mayor estabilidad a dichos compuestos (Mazauric & Salmon, 2005).

En la tabla 2 podemos observar que el contenido en IPT, AHC y flavonoles por lo general disminuye en los vinos criados con cepas *NS*, a excepción del vino 2 - TD que se inoculó con levaduras inactivas de *T. delbruecki*, en la que se observó un aumento de todos estos parámetros, aunque de manera no significativa. Esta disminución no fue tan acusada como la observada en los vinos coinoculados de la vinificación 1. Este hecho está en consonancia con Domingo et al. (2022) que observó que los vinos con crianza en lías *S* obtuvieron valores superiores a aquellos vinos que se criaron con cepas *NS* en dichos parámetros. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras para los antocianos y taninos, observamos que, en general, el contenido en antocianos y taninos aumentó en aquellos vinos que sufrieron crianza sobre lías *NS*.

La *American Society for Testing and Materials* (ASTM) define la astringencia como el conjunto de sensaciones que tienen lugar en la superficie de la boca como resultado de la exposición a sustancias como los taninos (ASTM, 2004). La unión de los taninos a los polisacáridos liberados durante la crianza ayuda a disminuir la astringencia del vino tinto (Vidal et al., 2003). En la vinificación 2 se produjo un aumento del índice de gelatina, parámetro empleado como marcador de la astringencia, al utilizar cepas *NS* respecto a *S*, con diferencias estadísticamente significativas en el vino 2 - LT (con lías de *L. thermotolerans*) respecto al control. Estos resultados están en contraposición con los encontrados con la vinificación 1, donde el vino espumoso procedente del vino base coinoculado con de *L. thermotolerans* presentó la menor astringencia.

La crianza del vino no solo se relaciona con la estabilización del color, sino con su pérdida, lo cual va a depender del proceso de crianza, características fisicoquímicas en las que se lleve a cabo o características intrínsecas de las levaduras como su capacidad de absorción en función de la porosidad (Gomez-Cordoves & Gonzalez-Sanjose, 1995).

Conforme con Belda et al. (2016) y Palomero et al., (2009) se produjo un aumento en la intensidad de color en aquellos vinos en los que se realizó crianza sobre lías *NS*, aunque no de manera significativa. Esto se puede deber a la mayor capacidad de adsorción de compuestos colorantes en la pared celular de las cepas *NS* lo que podría afectar aumentando la intensidad de color en el vino. Por el contrario, en cuanto al tono no se encontraron apenas diferencias entre el control y el resto de los vinos.

De acuerdo con Del Barrio - Galán et al. (2019), la crianza sobre lías ha demostrado influencia en los parámetros de color L^* , a^* y b^* respecto a vinos que no sufren crianza. En dicho estudio se realizó una crianza sobre lías en vinos blancos utilizando cepas de *S. cerevisiae* inactivas y se observó un aumento de estos parámetros al final del periodo de crianza, lo que se puede explicar al aumento en el consumo de oxígeno de las lías que protege al vino del pardeamiento y de la oxidación. Sin embargo, no se han hallado en nuestro estudio diferencias en estos parámetros entre vinos que sufren crianza con diferentes cepas de levaduras.

Atendiendo a los parámetros donde se ha observado una diferencia estadísticamente significativa entre las muestras, podemos observar que el vino control presentaba altos niveles de AT y polisacáridos. Por otro lado, el vino 2 - LT presentó una alta astringencia,

mientras, el vino 2 - TD tenía un mayor contenido en flavonoles y azúcares reductores y el vino 2 - MP obtuvo bajos valores de astringencia.

6.3 Efecto de la crianza sobre levaduras inactivas *NS* añadidas en el tiraje

Finalmente, en la tabla 3 se realiza la comparación entre los vinos espumosos obtenidos en los lotes 8 (C), 9 (3 - LT), 10 (3 - MP) y 11 (3 - TD), los cuales se elaboraron a partir del vino base del lote 8 (C) que fue fermentado con *S. cerevisiae* y no sufrió crianza sobre lías, para posteriormente en los lotes 9-11 añadir en el licor de tiraje levaduras inactivas *NS*. El objetivo consiste en valorar las diferencias entre los vinos espumosos finales cuando se añaden lías de levaduras de *NS* en el licor de tiraje frente a cuando no son añadidas.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de los vinos espumosos procedentes de la vinificación 3.

	C (Control)	3 - LT	3 - MP	3 - TD
Grado alcohólico (% v/v)	11,2 ± 0,2 a	11,6 ± 0,1 b	11,7 ± 0,1 b	11,7 ± 0,2 b
pH	3,52 ± 0,11 a	3,65 ± 0,13 a	3,64 ± 0,15 a	3,67 ± 0,02 a
AT (g/l)	4,6 ± 0,1 c	4,4 ± 0,1 bc	4,1 ± 0,1 a	4,3 ± 0,2 ab
AV (g/l)	0,72 ± 0,08 a	0,67 ± 0,03 a	0,68 ± 0,05 a	0,68 ± 0,02 a
Proteínas (mg/l)	390,2 ± 14,3 a	547,4 ± 214,0 a	413,4 ± 33,4 a	409,7 ± 25,2 a
NFA (mg/l)	70,7 ± 2,7 c	61,6 ± 0,0 ab	66,5 ± 4,8 bc	58,1 ± 2,7 a
Azúcares reductores (g/l)	0,40 ± 0,08 a	0,95 ± 0,44 a	0,75 ± 0,19 a	0,78 ± 0,39 a
Polisacáridos (g/l)	4,76 ± 0,80 a	5,00 ± 0,43 a	4,45 ± 0,60 a	6,71 ± 0,38 b
IPT (UA)	35,3 ± 0,4 a	45,9 ± 1,6 b	43,4 ± 0,8 b	44,5 ± 3,7 b
AHC (UA)	15,93 ± 0,17 a	20,30 ± 0,44 b	19,40 ± 0,32 b	20,10 ± 1,68 b
Flavonoles (UA)	4,93 ± 0,10 a	6,75 ± 0,10 b	6,50 ± 0,12 b	6,80 ± 0,65 b
Antocianos (mg/l)	113,8 ± 16,5 a	115,7 ± 8,7 a	110,0 ± 3,0 a	108,9 ± 5,7 a
Taninos (g/l)	2,61 ± 0,07 b	2,09 ± 0,33 a	2,33 ± 0,05 ab	2,25 ± 0,08 ab
Índice de gelatina (%)	69,75 ± 1,74 c	55,37 ± 6,06 b	20,52 ± 3,95 a	72,579 ± 0,88 c
Tono	0,67 ± 0,00 a	0,67 ± 0,00 a	0,68 ± 0,00 a	0,67 ± 0,00 a
Intensidad de color	0,95 ± 0,21 a	1,02 ± 0,12 a	1,09 ± 0,13 a	1,06 ± 0,08 a
L*	71,98 ± 5,19 a	70,08 ± 2,81 a	68,58 ± 2,99 a	69,33 ± 1,87 a
a*	23,22 ± 2,13 a	24,73 ± 1,18 a	25,36 ± 1,37 a	24,35 ± 0,77 a
b*	-1,47 ± 0,15 a	-1,44 ± 0,28 a	-1,14 ± 0,41 a	-1,38 ± 0,18 a

AT: acidez total, Av: acidez volátil, NFA: nitrógeno fácilmente asimilable, IPT: índice de polisacáridos totales, UA: unidades arbitrarias, AHC: ácidos hidroxicinámicos

En cuanto al grado alcohólico, encontramos que en los vinos en los que se añadieron levaduras inactivas *NS* en el tiraje se produjo un aumento de manera significativa. El estudio realizado por Del Barrio - Galán et al. (2011) utilizó en el proceso de crianza sobre lías la adición de derivados de levaduras inactivas con el objetivo de valorar la influencia en las características del vino Verdejo final; en su caso no se observó

diferencias en cuanto al grado alcohólico en aquellos vinos que se añadieron lías y el control que no sufrió ningún tratamiento.

En cuanto al pH no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los vinos criados con *S* y los vinos a los que se añadieron lías *NS* en el tiraje, sin embargo y de acuerdo con Moyano-Gracia et al. (2023) se ha estudiado que la crianza sobre lías favorece un ligero aumento de este parámetro atribuido a la formación de complejos insolubles de tartrato cálcico y potásico. En el estudio realizado por Sartor et al. (2019) se llevó a cabo la adición de manoproteínas en el licor de tiraje no observando cambios en el pH ni en la AT del vino espumoso final. En nuestro caso se añadieron levaduras inactivas *NS* en el licor de tiraje, las cuales como hemos explicado anteriormente favorecen la liberación de manoproteínas y otros polisacáridos de la pared celular, observando una disminución significativa en los vinos 3 – MP y 3 – TD en los que se añadieron lías *NS*. En cuanto a la AV se ha demostrado que el uso de cepas *NS* facilita su disminución cuando se lleva a cabo la segunda fermentación y crianza con estas cepas (Ivit & Kemp, 2018). En nuestro caso las levaduras inactivas *NS* se añadieron en el tiraje y la fermentación se realizó con *S. cerevisiae*, sin embargo, hemos podido observar una ligera disminución en la AV, aunque no es significativa.

En cuanto al contenido en proteínas, en el proceso de vinificación 3 hubo un aumento en aquellos vinos que sufrieron crianza sobre levaduras inactivas *NS* respecto al control, aunque no fueron estadísticamente significativas. Este hecho se debe a que, durante el proceso de crianza, las lías en contacto con el vino liberan proteínas procedentes de la pared celular (Morata et al., 2018). En contraposición con nuestros resultados, el estudio realizado en vinos espumosos blancos por Lambert-Royo et al. (2022) mostró que los vinos a los que se añadieron lías de *T. delbrueckii* en el tiraje presentaron unos niveles de proteínas inferiores respecto al control. Estos autores explican que es un hecho no habitual y que puede deberse a la metabolización de las proteínas procedentes del vino base y de las levaduras inactivas durante la segunda fermentación, aunque también explica que pudo deberse a la pérdida de las proteínas durante el removido y el degüelle.

Por otro lado, los niveles de NFA fueron menores cuando se realizó crianza sobre lías *NS* frente a *S. cerevisiae*, al igual que ocurrió en la vinificación 1 en la que el vino únicamente inoculado con *S. cerevisiae* presentó unos niveles de NFA superiores a los vinos coinoculados. Este hecho está en desacuerdo con Tofalo et al. (2022) que observó que la coinoculación del vino base con levaduras *NS* (*T. delbrueckii* o *Starmerella bacillaris*), junto con *S. cerevisiae* incrementaba el nivel de NFA en relación con una inoculación clásica, probablemente por una autólisis más rápida de estas levaduras *NS*.

Como hemos explicado anteriormente, la crianza sobre lías puede aumentar el contenido en polisacáridos en los vinos debido a la liberación de compuestos procedentes de la pared celular. El estudio realizado por Del Barrio-Galán, Medel-Marabolí, et al. (2015) demostró que al utilizar diferentes cepas de tipo *Saccharomyces* en la fermentación junto con la posterior crianza sobre sus lías aumentaba el contenido final de polisacáridos respecto al vino base. El estudio realizado por Lambert-Royo et al. (2022) nos permite valorar el incremento en cuanto a polisacáridos en el vino espumoso final tras la adición de lías *NS* en el tiraje respecto al control en el que no se añadieron lías en el tiraje y solo se realizó la fermentación con *S. cerevisiae* y la crianza sobre sus lías. En dicho estudio se encontró un aumento cuando se añadieron lías de

T. delbrueckii en el tiraje, aunque el aumento no fue de manera significativa. Estos resultados se encuentran en consonancia con nuestro estudio, ya que, aunque encontramos resultados muy dispares, al añadir lías de *T. delbrueckii* (3 – TD) en el licor de tiraje encontramos un aumento significativo respecto al control. Otro estudio llevado a cabo por Domizio et al. (2014) mostró que al utilizar cepas como *T. delbrueckii* aumentaba el contenido de polisacáridos en el vino final, debido a su liberación por parte de la pared celular. Aunque en este estudio se realizó la fermentación con dicha cepa, la liberación se produce al descomponerse la pared celular, por lo que se trata de un hecho interesante a la hora de realizar la crianza sobre lías.

La crianza sobre lías favorece la liberación de azúcares reductores procedentes de la membrana y los diferentes componentes celulares; en nuestro estudio pudimos observar un aumento en su contenido tras la crianza sobre lías NS, aunque de manera no significativa (Ivit et al., 2018).

Las lías procedentes de levaduras NS tiene la capacidad de liberar mayor cantidad de polisacáridos que las lías procedentes de levaduras *S. cerevisiae* (Palomero et al., 2009). Este hecho es interesante para valorar el contenido en IPT, AHC y flavonoles ya que de acuerdo con Escott et al. (2016) el envejecimiento sobre lías NS favorece la liberación de biopolímeros como manoproteínas y polisacáridos los cuales ejercen un efecto protector sobre los antocianos, responsables del color.

Este hecho podría explicar que, en nuestro estudio, en aquellos vinos con levaduras inactivas NS tuvieran unos niveles superiores en todos estos parámetros respecto al vino control. El hecho de que los valores de IPT, AHC y flavonoles sean superiores en los vinos 3 – TD, 3 – MP y 3 – LT, también podría explicarse por un mayor contenido final de lías respecto al control. Esto provocaría una mayor liberación de compuestos que pueden unirse a los polifenoles, AHC y flavonoles lo que permitiría una menor oxidación de estos (Mazauric & Salmon, 2005).

Durante el proceso de autólisis, y por consiguiente en las lías obtenidas, se produce una liberación de polisacáridos que pueden polimerizarse con los antocianos y taninos, disminuyendo el contenido final en el vino y comunicando al vino una agradable sensación de untuosidad y volumen. Además, estos taninos se pueden unir a las manoproteínas procedentes de las lías, contribuyendo a la estabilidad tartárica bloqueando las reacciones de cristalización (Martín et al., 2006). En el proceso de vinificación 3 encontramos una disminución del contenido en taninos tras la crianza sobre levaduras inactivas NS. En el caso de los antocianos, en algunos casos como los vinos 3 - MP y 3 - TD se ha producido una ligera disminución respecto al control, aunque de manera no significativa.

La polimerización de los taninos contribuye a la reducción de la astringencia del vino. En nuestro caso la astringencia se midió mediante el índice de gelatina encontrando resultados dispares. En nuestro estudio en los vinos 3 – LT, 3 – MP y 3 – TD se añadieron lías NS en el tiraje que pueden favorecer la liberación de compuestos que disminuyan la astringencia. Aunque en nuestro estudio encontramos resultados dispares, los vinos 3 – LT y 3 - MP sufrieron una disminución estadísticamente significativa del índice de gelatina y por tanto de la astringencia. Sin embargo, el vino 3 - TD tuvo un aumento del índice de gelatina tras la crianza sobre lías NS respecto al control, pero sin diferencia estadísticamente significativa.

Encontramos un ligero aumento en el valor de intensidad de color en aquellos vinos criados sobre lías *NS* de acuerdo con Belda et al. (2016) y Palomero et al. (2009), aunque sin diferencia estadísticamente significativa, lo que se puede atribuir a la adsorción de compuestos colorantes por las paredes celulares evitando su precipitación y oxidación. El tono o matiz nos indica la importancia del color rojo frente al amarillo, y su valor es inversamente proporcional a la intensidad (Zamora Marín, 2003). En nuestro estudio no encontramos a penas diferencias entre los vinos.

El estudio realizado por Lapuente Martínez & Sáenz Bastida (2015) mostró que los vinos que sufrieron crianza sobre lías durante 8 meses aumentaron los tonos rojos, mientras que aquellos sin crianza en lías mostraron un aumento en los tonos tejas. En nuestro estudio todos los vinos sufrieron crianza sobre lías, sin embargo, al observar los resultados en cuanto a tono, intensidad de color y los valores L^* , a^* y b^* , no hay apenas diferencias entre el control y el resto de los vinos, por lo que podemos concluir que la adición de lías *NS* en el tiraje no modificó las características cromáticas. Aunque según Ivit et al. (2018) la elaboración de vinos espumosos y su posterior crianza sobre lías *NS* favorece la disminución del tono respecto a aquellos elaborados y criados sobre lías *S*.

Como conclusión la adición de lías *NS* en el tiraje no tuvo influencia en los parámetros cromáticos L^* , a^* , b^* , ni en el tono, ni en la intensidad de color. Las mayores diferencias se encontraron en los componentes fenólicos, con un aumento significativo en los valores de IPT, AHC y flavonoles junto con una disminución de la astringencia respecto al control, valores que son de gran importancia para mantener las características sensoriales de los vinos durante la crianza y mejorar las propiedades organolépticas.

6.4 Análisis de componentes principales

Para completar el estudio de los resultados obtenidos se realizó un análisis de componentes principales (ACP), utilizando una bi-gráfica en la que se muestra el diagrama de dispersión de las diferentes muestras junto con el ACP de los parámetros fisicoquímicos analizados.

El propósito de este análisis consiste en obtener un número reducido de combinaciones lineales de las 19 variables que expliquen la mayor variabilidad en los datos. En nuestro caso, se han extraído 5 componentes, ya que estos son los que tuvieron *eigen* valores mayores o iguales a 1 (tabla 4, anexos). El conjunto de ellos explica el 88,3% de la variabilidad de los datos. En la tabla 5 (anexos) se encuentran los pesos de los distintos componentes extraídos.

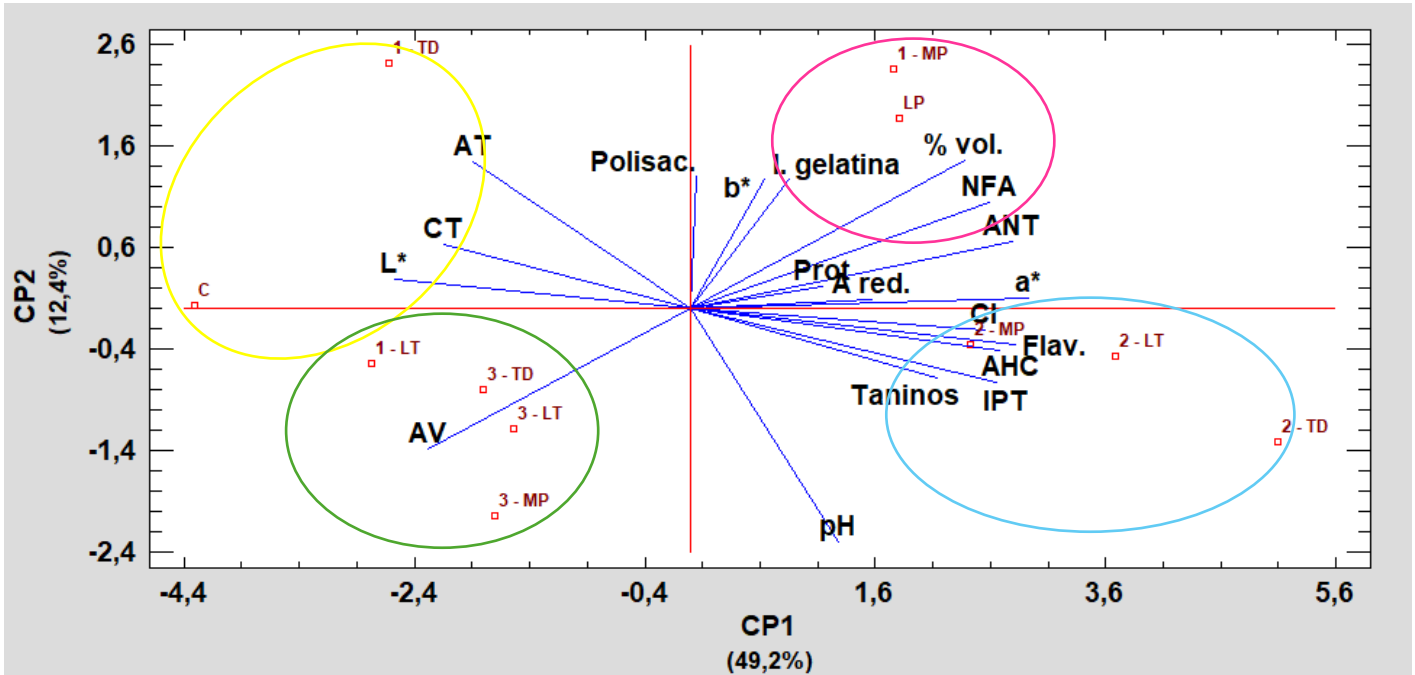


Gráfico 1. Análisis de componentes principales de los diferentes vinos analizados junto con el diagrama de dispersión. AT: acidez total, Av: acidez volátil, NFA: nitrógeno fácilmente asimilable, IPT: índice de polisacáridos totales, AHC: ácidos hidroxicinánicos, CT: Color tono, CI: Color intensidad, Flav: Flavonoles.

El bigráfico se construyó con las CP1 y CP2; la CP1 representa un 49,2% de la variabilidad de los datos y la CP2 un 12,4%, en total representan el 61,6% de la variabilidad total de los datos. Los parámetros que más contribuyen en la CP1 son L*, CT, a*, CI, ANT, Flav, IPT y taninos ya que son aquellos vectores que forman menor ángulo con el eje X y se encuentran a mayor distancia del origen, estos se encuentran relacionados con el color del vino. Por otro lado, los parámetros que contribuyen en mayor medida en la CP2 son los polisacáridos, b* y el índice de gelatina, ya que forman el menor ángulo con el eje Y.

Aquellos parámetros analizados entre los que sus correspondientes vectores formen ángulos de pocos grados son parámetros que se encuentran relacionados entre sí, mientras que si entre dos parámetros el ángulo que forman sus vectores es muy grande significa que no estarán relacionados. El gráfico muestra que los vectores de CI, Flav, AHC, IPT y taninos se encuentran cercanos entre sí de tal forma que estas variables están relacionadas, sin embargo, el ángulo que forman con otros parámetros como L*, CT, AV o AT es muy grande lo que indica que no hay relación. Del mismo modo, el ángulo que forman los vectores de las proteínas, azúcares reductores y a* es pequeño, por lo que podemos decir que se encuentran relacionados, por el contrario, el ángulo que forman con la AV es muy grande, lo que explica que no se relacionan con este parámetro. Existen algunos parámetros como la AV o el pH que no se encuentran relacionados con ningún otro, ya que los ángulos que forman con el resto son muy grandes.

Como observamos en el gráfico, el vino 1 - LT y los vinos con levaduras inactivas NS añadidas en el licor de tiraje procedentes de la vinificación 3 (3 - TD, 3 - LT y 3 - MP) se caracterizan por tener un mayor valor de AV encontrándose todos en el tercer cuadrante. Estos presentan un menor valor en índice de gelatina, grado alcohólico, NFA y ANT

principalmente, en comparación con las muestras LP y 1 - MP que se caracterizan por valores más elevados en grado alcohólico o NFA y menor respecto a la AV. Los tres vinos procedentes de la vinificación 3 se encuentran separados de su control (C), encontrándose este último en el primer cuadrante caracterizándose por un valor más elevado en L*.

Los tres vinos con levaduras *NS* añadidas en el vino base procedentes de la vinificación 2 (2 - MP, 2 - LT y 2 - TD) se caracterizan por tener los valores más elevados en CI, IPT, AHC, taninos y ANT encontrándose todos en el cuarto cuadrante separados de su vino control (LP) el cual se encuentra en el cuadrante 2. Encontramos que el vino 2 - TD es el que mayor valor tiene en IPT, AHC, taninos y ANT de todas las muestras analizadas. Estos parámetros se encuentran estrechamente relacionados con el color del vino. Por el contrario, los vinos procedentes de la vinificación 2 muestran los valores más bajos en AT, CT y L* en comparación con el resto.

Las muestras 1 - TD y C se caracterizan por tener valores elevados respecto a la AT, CT y L* al contrario que las muestras 2 - MP, 2 - LT y 2 - TD. La muestra C además, se caracteriza por tener el valor más bajo de proteínas y azúcares reductores de manera significativa respecto al resto de vinos.

Como podemos observar en el gráfico, los vinos procedentes de la vinificación 1 en los que se realizó coinoculación con levaduras *S* y *NS* y su posterior crianza sobre lías, presentan diferencias notables en cuanto a sus características fisicoquímicas, encontrándose dispersos entre los cuadrantes 1, 2 y 3.

El objetivo de nuestro estudio se centra en realizar una comparación de las características fisicoquímicas de los vinos espumosos finales tras ser elaborados por 3 métodos diferentes de vinificación.

Tras realizar el análisis de componentes principales pudimos observar que aquellos vinos en los que se realizó la coinoculación con levaduras del tipo *S* y *NS* y la posterior crianza sobre sus lías procedentes de la vinificación 1 presentaron características fisicoquímicas dispares encontrándose distribuidos por los cuadrantes 1 (1 - TD), 2 (1 - MP), 3 (1 - LT) y su control (LP) en el cuadrante 2. De acuerdo con Oliveira & Ferreira (2019) el vino en el que se inoculó *L. thermotolerans* junto con *S. cerevisiae* (1 - LT) presentó un valor superior en AV respecto al coinoculado con *T. delbrueckii* (1 - TD), mientras que este presentó un valor superior en cuanto a AT.

Los vinos en los que se añadieron las levaduras *NS* inactivas en el vino base procedentes de la vinificación 2 se caracterizaron por influir de manera más importante en los parámetros relacionados con los componentes fenólicos del vino como los IPT, AHC, flavonoles y taninos, presentando valores superiores a su control (LP) y al resto de los vinos. Este hecho puede ser interesante a la hora de valorar que tipo de vinificación queremos seguir para la elaboración de los vinos espumosos tintos, ya que por ejemplo un elevado contenido en taninos puede aumentar la astringencia y el amargor de nuestro vino (Ma et al., 2014). Además, el contenido polifenólico contribuye de manera importante en el color en el vino, sobre todo si se destina a largos periodos de crianza, ya que estas moléculas pueden sufrir reacciones de oxidación, condensación o polimerización dando lugar a cambios de color, estabilidad coloidal o incluso el sabor (Giovinazzo & Grieco, 2015). Es por esto por lo que la adición de lías

NS en el vino base, tal y como realizamos en la vinificación 2, podría ayudar a mantener la estabilidad del color, y por lo tanto los vinos obtenidos serían más aptos para la crianza en largos periodos de tiempo, que los vinos obtenidos en las vinificaciones 1 y 3.

Por último, encontramos los vinos en los que se añadieron lías NS en el licor de tiraje procedentes de la vinificación 3. Los tres vinos 3 – TD, 3 – MP y 3 – LT se caracterizan por tener una AV superior al resto de los vinos y a su control (C), si bien, sin llegar a un valor por encima de 1 g/l que pudiera aportar aromas a vinagre. Encontramos que los vinos en los que se añadieron levaduras inactivas en el tiraje presentan un grado alcohólico significativamente inferior al resto de los vinos procedentes de la vinificación 1 y 2, este resultado es interesante para nuestro estudio ya que con el cambio climático los vinos cada vez presentan un mayor grado alcohólico (Mira de Orduña, 2010), por lo que una solución podría ser la adición de estas lías NS en el tiraje. Por otro lado, en general, los vinos de la vinificación 3 también presentan un valor en el índice de gelatina inferior a los vinos de las vinificaciones 1 y 2, lo que aporta características positivas a nivel organoléptico disminuyendo la astringencia en boca producida por la unión de los taninos a proteínas (Sartini et al., 2011).

7. Conclusiones

La elaboración de vinos espumosos a partir de un vino base coinoculado con cepas *Saccharomyces* y NS y su posterior crianza sobre lías ha dado como resultado vinos espumosos con características fisicoquímicas dispares.

Los vinos espumosos en los que se añadieron lías NS en el proceso de crianza mostraron un aumento significativo en el contenido polifenólico e intensidad de color, lo cual es beneficioso para la estabilidad del color y la aptitud para la crianza del vino espumoso a largo plazo.

La adición de lías NS en el licor de tiraje favoreció la disminución del grado alcohólico y un menor índice de gelatina, contribuyendo a una menor astringencia.

Recomendamos seguir investigando sobre la crianza sobre lías NS en la elaboración de vinos espumosos y tranquilos, ya que los resultados muestran numerosas posibles ventajas para la elaboración de vinos contrarrestando los efectos negativos del cambio climático y mejorando sus características fisicoquímicas y sensoriales. Sería beneficioso explorar más a fondo los efectos de las diferentes estrategias de vinificación sobre la calidad organoléptica, la composición volátil y la estabilidad de los vinos.

8. 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>
- American Society for Testing and Materials. (2004). Standard definitions of terms relating to sensory evaluation of materials and products. *Annual book of ASTM standards*, American Society for Testing and Materials (Ed.).

- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderón, F., & Benito, S. (2016). Resumen de la influencia de las levaduras no convencionales en la crianza del vino sobre lías. *Yeast*, 33(7), 329–338. <https://doi.org/10.1002/yea.3165>
- Belda, I., Ruiz, J., & Navascués, E. (2016). Levaduras no convencionales en crianza sobre lías. *La Semana Vitivinícola*, 3485, 2298–2302. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5569548> (Acceso 24 de abril de 2024)
- Blasco, D., & Lizama, V. (2019). Coinoculación de levaduras No-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* en vinos de las variedades merlot, garnacha y cabernet sauvignon. Efecto sobre la composición de polifenoles. 15–16. Trabajo de fin de grado (Universidad Politécnica de Valencia) <https://riunet.upv.es/handle/10251/123886?show=full> (Acceso 13 de marzo de 2024)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Carrascosa, A. (2021). Efecto de la combinación de levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* previamente seleccionadas con respecto a los parámetros generales y composición polifenólica de vinos tintos elaborados con merlot, cabernet sauvignon y garnacha. Trabajo de fin de máster (Universidad Politécnica de Valencia). <https://riunet.upv.es/handle/10251/173900> (Acceso 3 de febrero de 2024)
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(5), 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Comuzzo, P., Calligaris, S., Iacumin, L., Ginaldi, F., Palacios Paz, A. E., & Zironi, R. (2015). Potential of high pressure homogenization to induce autolysis of wine yeasts. *Food Chemistry*, 185, 340–348. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.03.129>
- Condé, B. C., Bouchard, E., Culbert, J. A., Wilkinson, K. L., Fuentes, S., & Howell, K. S. (2017). Soluble protein and amino acid content affects the foam quality of sparkling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(41), 9110–9119. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02675>
- Consejo regulador del cava. (2022). *Manual de etiquetado del cava*. https://www.cava.wine/documents/361/DO_CAVA_MANUAL_ETIQUETADO_DEL_CAVA_2022_8e3iakX.pdf (acceso el 20 de mayo de 2024)
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1670–1678. <https://doi.org/10.1128/AEM.03780-13>
- Del Barrio - Galán, R., Medel - Marabolí, M., Gómez, A., & Heras, J. M. (2019). Application of a specific inactive yeast, developed as an alternative to aging on lees of white wines. *Enovicultura*, 17–18. https://www.researchgate.net/publication/333652446_Aplicacion_de_una_levadura_inactivada_especifica_desarrollada_como_alternativa_a_crianza_sobre_lias_de_vinos_b

[ancos Efecto sobre el contenido polisacaridico y fenolico el color y la calidad sensorial](#) (Acceso 5 de junio de 2024)

- Del Barrio - Galán, R., Pérez - Magariño, S., Ortega - Heras, M., Williams, P., & Docoo, T. (2011). Effect of aging on lees and of three different dry yeast derivative products on verdejo white wine composition and sensorial characteristics. *Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59, 23, 12433–12442 <https://doi.org/10.1021/jf204055u>
- Del Barrio-Galán, R., Cáceres-Mella, A., Medel-Marabolí, M., & Peña-Neira, Á. (2015). Effect of selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains and different aging techniques on the polysaccharide and polyphenolic composition and sensorial characteristics of Cabernet Sauvignon red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(10), 2132–2144. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6932>
- Del Barrio-Galán, R., Medel-Marabolí, M., & Peña-Neira, Á. (2015). Effect of different aging techniques on the polysaccharide and phenolic composition and sensory characteristics of Syrah red wines fermented using different yeast strains. *Food Chemistry*, 179, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.075>
- Del Barrio-Galán, R., Ortega-Heras, M., Sánchez-Iglesias, M., & Pérez-Magariño, S. (2012). Interactions of phenolic and volatile compounds with yeast lees, commercial yeast derivatives and non toasted chips in model solutions and young red wines. *European Food Research and Technology*, 234(2), 231–244. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1633-3>
- Del Barrio-Galán, R., Pérez-Magariño, S., & Ortega-Heras, M. (2011). Techniques for improving or replacing ageing on lees of oak aged red wines: The effects on polysaccharides and the phenolic composition. *Food Chemistry*, 127(2), 528–540. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.01.035>
- Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L. F., & Barile, D. (2014). Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiology*, 43, 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.005>
- Domingo, S. (2022). Estudio del impacto de la crianza sobre lías de diferentes cepas de levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* en un vino tinto base. Trabajo de fin de grado (Universidad de Valladolid) <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/55595> (Acceso 23 de febrero de 2024)
- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.020>
- Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L., & Charpentier, C. (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(3), 153–159. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2001.tb00204.x>
- Escott, C., Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., & Suarez-Lepe, J. A. (2016). Characterization of polymeric pigments and pyranoanthocyanins formed in microfermentations of non-

Saccharomyces yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 121(5), 1346–1356.
<https://doi.org/10.1111/jam.13255>

- Esparza, I., Santamaría, C., Calvo, I., & Fernández, J. M. (2009). Significance of CIELAB parameters in the routine analysis of red wines Relevancia de los parámetros CIELAB en el análisis de rutina de vinos tintos. *CYTA - Journal of Food*, 7(3), 189–199.
<https://doi.org/10.1080/19476330903068001>
- Ferraro, L., Fatichenti, F., & Ciani, M. (2000). Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 35, 1125–1129. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00148-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00148-5)
- Gallardo-Chacón, J. J., Vichi, S., Urpí, P., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2010). Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine sur lie aging. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1–2), 48–53.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.07.027>
- García, J. (1976). Metodología de análisis de vinos y derivados. Sociedad Expendedora del Panadés (Ed). Villafranca del Panadés (Barcelona)
- Giovinazzo, G., & Grieco, F. (2015). Functional properties of grape and wine polyphenols. *Plant Foods For Human Nutrition*, 70(4), 454–462. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0518-1>
- Gómez-Cordoves, C., & González-San José, M. L. (1995). Interpretation of color variables during the aging of red wines: Relationship with families of phenolic compounds. *American Chemical Society*, 43, 557–561.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf00051a001>
- González, M. L. (2005). Transferencia de color de la uva al vino. *Revista Enológica ACE*, 61. https://www.acenologia.com/ciencia72_01/ (Acceso 23 de enero de 2024)
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J. M., & Zamora, F. (2015). Oenological consequences of sequential inoculation with yeasts other than *Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for the production of sparkling wines. *European Food Research and Technology*, 240(5), 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>
- Hidalgo Togores, J. (2011). *Tratado de enología* (Vol. 1). Mundi-Prensa (Ed). Madrid (España)
- Huang, H. (1955). Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *Agricultural and Food Chemistry*, 3(2), 141–146. <https://doi.org/doi.org/10.1021/jf60048a006>
- Ivit NN, Kemp B. The Impact of Non-Saccharomyces Yeast on Traditional Method Sparkling Wine. *Fermentation*. 2018; 4(3):73. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030073>
- Ivit, N. N., Loira, I., Morata, A., Benito, S., Palomero, F., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). Making natural sparkling wines with non-*Saccharomyces* yeasts. *European Food Research and Technology*, 244(5), 925–935. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-3015-y>

- 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/10.1016/J.LWT.2015.07.046>
- Kutyna, D. R., Varela, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., & Stanley, G. A. (2010). Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends in Food Science and Technology*, *21*(6), 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.03.004>
- Lacueva, A., Lamuela-Raventós, R., & Buxaderas, S. (1997). Influence of variety and aging on foaming properties of cava (sparkling wine). *J. Agric. Food Chem.* 1997, *45*, 7, 2520–2525 . <https://doi.org/10.1021/JF960905P>
- Lambert-Royo, M., Ubeda, C., Del Barrio-Galán, R., Sieczkowski, N., Miquel Canals, J., Peña-Neira, Á., & Gil i Cortiella, M. (2022). The diversity of effects of yeast derivatives during sparkling wine aging. *Food Chemistry*, *390*, 133–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133174>
- Lindner, P., & Shomer, I. (1984). Interference of azide in assays of carbohydrates. *Food Chemistry*, *14*, 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>
- Llaudy, M. C., Canals, R., Canals, J. M., Rozés, N., Arola, L., & Zamora, F. (2004). New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(4), 742–746. <https://doi.org/10.1021/jf034795f>
- Loira, I., Vejarano, R., Morata, A., Ricardo-Da-Silva, J. M., Laureano, O., González, M. C., & Suárez-Lepe, J. A. (2013). Efecto de las cepas de *Saccharomyces* sobre la calidad de los vinos tintos sobre lías. *Food Chemistry*, *139*(1–4), 1044–1051. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.020>
- Ma, W., Guo, A., Zhang, Y., Wang, H., Liu, Y., & Li, H. (2014). A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends in Food Science and Technology*, *40*(1), 6–19. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.001>
- Madrid, J., Madrid Vicente, A., & Moreno-Tejero, G. (2003). Análisis de vinos, mostos y alcoholes (J. Madrid Cenzano, A. Madrid Vicente, & G. Moreno Tejero, Eds.). AMV ; Mundi Prensa (Ed). Madrid (España)
- Maio, D., Genna, G., Gandolfo, V., Amore, G., Ciaccio, M., & Oliva, D. (2012). Presence of *Candida zemplinina* in sicilian musts and selection of a strain for wine mixed fermentations. *South African Journal of Oenology and Viticulture*, *33*(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.21548/33-1-1309>
- Martín, Muñoz, F., & Morata, S. (2017). Levaduras secas activas (LSA) autóctonas de la DOC San Rafael-Mendoza: Resistencia al proceso de liofilización.

https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/lsa_autoctonas_de_la_doc_san_rafael-mendoza_2017.pdf (Acceso 16 de mayo de 2024)

- Martín, P., Alonso González, A., Lázaro De diego, J., Zamora Marín, F., Hidalgo Togores, J., Vicente Martín, A., Calvo Alonso, O., & Plaza Torres, F. (2006). *Viticultura y enología en la D.O. Ribera de Duero*. Consejo Regulador de la Denominación de Origen Ribera del Duero (Ed.).
- 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>
- Mazauric, J. P., & Salmon, J. M. (2005). Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: I. Analysis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(14), 5647–5653. <https://doi.org/10.1021/jf050308f>
- Mira, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, *43*(7), 1844–1855. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.001>
- Morata, A., Escott, C., Bañuelos, M. A., Loira, I., Del Fresno, J. M., González, C., & Suárez-lepe, J. A. (2020). Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to the freshness of wine. *Biomolecules*, *10*(1), 34. <https://doi.org/10.3390/biom10010034>
- New trends in aging on lees. En: *Red Wine Technology*, 163-176. Morata, A. (Ed.), Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Moyano-Gracia, R., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., Rodríguez-Nogales, J. M., & Fernández-Fernández, E. (2023). Effect of Yeast Derivatives and β -Glucanases on Ageing over Lees Process of Tempranillo Red Sparkling Wine. *Fermentation*, *9*(12), 1012. <https://doi.org/10.3390/fermentation9121012>
- Nazralla, J. J. B., Paladino, S. C., Hernán, I., Vila, F., Lucero, C. C., & Vila, H. F. (2009). Manual de técnicas analíticas para mostos y vinos. Inta (Ed.), Mendoza, Argentina <https://core.ac.uk/download/pdf/335289779.pdf> (Acceso 28 de marzo de 2024)
- Oliveira, I., & Ferreira, V. (2019). Modulating fermentative, varietal and aging aromas of wine using non-*Saccharomyces* yeasts in a sequential inoculation approach. *Microorganisms*, *7*(6), 164. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060164>
- Palomero, F., Morata, A., Benito, S., Calderón, F., & Suárez-Lepe, J. A. (2009). New genera of yeasts for over-lees aging of red wine. *Food Chemistry*, *112*(2), 432–441. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.05.098>
- 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/10.1016/J.FOODCHEM.2007.01.062>
- Ribéreau-Gayon, Pascal., Glories, Y., & Maujean, A. (1965). *Treatise on oenology. Wine chemistry, stabilization and treatments*. Dunod (Ed). Burdeos, Francia.

- Romani, C., Lencioni, L., Bartolini, A. B., Ciani, M., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2020). Pilot scale fermentations of sangiovese: An overview on the impact of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Fermentation*, 6(3), 63. [Fhttps://doi.org/10.3390/FERMENTATION6030063](https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6030063)
- Royo, E. G. (2015). Aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas para compensar los efectos negativos del cambio climático en los vinos espumosos (cava) y tintos. Tesis doctoral, (Universitat Rovira i Virgili). <https://www.tdx.cat/handle/10803/296437#page=1> (Acceso 12 de junio de 2024)
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J. J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., & Alexandre, H. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology*, 32(2), 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>
- Sáenz, E. (2015). Influencia de la crianza en presencia y en ausencia de lías en la composición de polisacáridos y en las características sensoriales de vinos espumosos blancos y rosados. Trabajo de fin de grado (Universidad de la Rioja) https://digital.csic.es/bitstream/10261/194556/3/Influencia_crianza.pdf (Acceso 14 de mayo de 2024)
- Sancho Galán, P. (2022). Estrategias vitivinícolas para la adaptación al cambio climático en una zona de clima cálido. Tesis doctoral (Universidad de Cádiz) <https://rodin.uca.es/handle/10498/27551> (Acceso 7 de febrero de 2024)
- Santos, M. C., Nunes, C., Jourdes, M., Teissedre, P. L., Rodrigues, A., Amado, O., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2016). Evaluation of the potential of high pressure technology as an enological practice for red wines. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.11.018>
- Sartini, E., Parpinello, G. P., Galassi, S., & Versari, A. (2011). Characterization of uva Longanesi red wine by selected parameters related to astringency. *International Journal of Food Properties*, 14(5), 1081–1089. <https://doi.org/10.1080/10942910903580934>
- Sartor, S., Toaldo, I. M., Panceri, C. P., Caliari, 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/10.1016/j.foodres.2018.11.012>
- Taillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A., & Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: Influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 1959–1967. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Rossetti, A. P., Gaggiotti, S., Piva, A., Olivastri, L., Cichelli, A., Compagnone, D., & Arfelli, G. (2022). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts to improve traditional sparkling wines production. *Food Microbiology*, 108. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104097>
- 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/10.1016/J.FOODRES.2018.10.032>

Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(6), 564–573. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1394>

Vilela, A. (2019). Use of nonconventional yeasts for modulating wine acidity. *Fermentation*, 5(1), 27. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010027>

Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., & Côte-Real, M. (2008). Reduction of volatile acidity of wines by selected yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5), 881–890. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1616-x>

Zamora Marín, F. (2003). Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. AMV (Ed.), Madrid, España.

9. Anexos

Tabla 4. Componentes principales, eigen valor y porcentaje de varianza.

Componente Número	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	9,34836	49,202	49,202
2	2,34706	12,353	61,555
3	1,85817	9,780	71,335
4	1,75009	9,211	80,546
5	1,47807	7,779	88,325
6	0,95074	5,004	93,329
7	0,560271	2,949	96,278
8	0,510736	2,688	98,966
9	0,14665	0,772	99,738
10	0,0498571	0,262	100,000
11	2,93583E-15	0,000	100,000
12	5,42103E-16	0,000	100,000
13	4,48836E-16	0,000	100,000
14	2,28418E-16	0,000	100,000
15	5,70961E-17	0,000	100,000
16	-6,13962E-17	0,000	100,000
17	-3,0224E-16	0,000	100,000
18	-5,79485E-16	0,000	100,000
19	-7,16507E-16	0,000	100,000

Tabla 5. Peso de los diferentes componentes extraídos.

	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4	Componente 5
Grado alcohólico (% v/v)	0,252319	0,328162	0,0826648	-0,118297	-0,198352
pH	0,136113	-0,517162	0,103441	-0,128719	-0,0296272
AT (g/l)	-0,201159	0,326307	0,0422632	0,245894	-0,12841
AV (g/l)	-0,243136	-0,309996	0,00992739	0,255646	0,249798
Proteínas (mg/l)	0,121106	0,0487859	0,527791	0,125614	0,019648
NFA (mg/l)	0,27485	0,234829	-0,254103	-0,0654526	-0,0533697
Azúcares reductores (g/l)	0,167499	0,0211642	0,389904	-0,217076	-0,40695
Polisacáridos (g/l)	0,00514733	0,293966	0,124204	0,620253	0,0129468
Intensidad de color	0,27097	-0,0479005	0,0460757	-0,0283836	0,284647
Tono	-0,228371	0,142061	0,28249	-0,127974	0,415555
IPT (UA)	0,28189	-0,162798	0,0718913	0,254728	0,0875698
AHC (UA)	0,284711	-0,0929992	0,211719	0,247575	0,0968043
Flavonoles (UA)	0,299668	-0,0791728	0,201155	0,175937	0,0520581
Antocianos (mg/l)	0,297072	0,148376	-0,215733	-0,0156943	-0,0779372
Taninos (g/l)	0,226559	-0,153207	-0,407607	0,0882517	0,179654
Índice de gelatina (%)	0,0900165	0,285493	-0,214958	0,136096	0,288198
L*	-0,27365	0,0666412	-0,0503437	0,00543645	-0,247618
a*	0,311298	0,0247541	-0,0729261	-0,0593862	-0,0823953
b*	0,0675287	0,286265	0,175709	-0,43277	0,498909

AT: acidez total, Av: acidez volátil, NFA: nitrógeno fácilmente asimilable, IPT: índice de polisacáridos totales, UA: unidades arbitrarias, AHC: ácidos hidroxicinámicos