

Herramienta muy útil para obtener vinos  
espumosos con mejores propiedades espumantes

# INFLUENCIA DE LA INOCULACIÓN secuenciada de *Torulaspota delbreuckii* y *Saccharomyces cerevisiae* sobre las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava)



Aunque resulte obvio, la efervescencia y la estabilidad de la espuma son los principales factores que condicionan la calidad de los vinos espumosos. Sin duda, otros aspectos como el sabor y el aroma juegan también un papel importante, pero la efervescencia y la persistencia de la espuma son atributos diferenciales en los vinos espumosos y por tanto cobran capital importancia en su valoración cualitativa.

**A**l servir una copa de un cava o de cualquier otro vino espumoso, se genera un magnífico espectáculo en el que las burbujas son, sin lugar a dudas, las evidentes protagonistas. Inicialmente la espuma asciende de forma rápida y compacta (Poinsaut, 1991) y después de alcanzar su altura máxima, el nivel de la espuma desciende lentamente y se estabiliza formando una ligera capa en la interfase entre el líquido y el cristal denominada corona. Simultáneamente, la impetuosa efervescencia inicial se apacigua y se alcanza un estado cuasi-estacionario, condicionado por el balance entre las burbujas que ascienden y las que se destruyen en la superficie (Moreno-Arribas y col, 1996). Por consiguiente, la espuma está constituida por un conjunto cambiante de efímeras burbujas que se mantiene en la superficie del líquido gracias a este delicado equilibrio entre formación y destrucción (Zamora, 2003).

Existen diversas bebidas efervescentes en las que se incluyen desde los refrescos hasta la cerveza, pasando evidentemente por los vinos espumosos. Su efervescencia y su espuma son muy diferentes. Así las bebidas refrescantes carbonatadas presentan generalmente una efervescencia muy tumultuosa, con grandes burbujas y una permanencia relativamente corta de la espuma. En el extremo contrario encontramos la cerveza, con una efervescencia pausada, unas burbujas muy pequeñas y una espuma extremadamente persistente. Pues bien, los vinos espumosos se sitúan en el término intermedio. Así un vino espumoso de calidad ha de tener una espuma blanca y compacta generada por la presencia de numerosos cordones o rosarios de burbujas muy finas que al llegar a la superficie forman una corona muy estable (Maujean, 1989; Ligier-Belair, 2001).

> **Laura Medina-Trujillo<sup>1</sup>, Elena González-Royo<sup>1</sup>, Nathalie Sieczkowski<sup>2</sup>, José Heras<sup>2</sup>, Francesca Fort<sup>1</sup>, Joan Miquel Canals<sup>1</sup> y Fernando Zamora<sup>1</sup>,**

> <sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, Universidad Rovira i Virgili

> <sup>2</sup>Lallemand BIO S.L.

Ahora bien, la efervescencia y la espuma no son tan solo atributos visuales de mayor o menor belleza estética, sino que inciden de forma significativa en las sensaciones que se notarán posteriormente en el paladar (Vanrell, 2002). Un refresco de efervescencia tumultuosa y grandes burbujas dará lugar en la boca a una sensación un tanto agresiva. Del mismo modo perderá rápidamente su efervescencia debido a la rápida desgasificación que estos fenómenos conllevan. Por el contrario un buen Cava deberá presentar en boca un agradable cosquilleo acompañado por una sensación de cremosidad de su espuma. Asimismo, su efervescencia deberá ser lo suficientemente persistente como mantener estas sensaciones el tiempo necesario para que el consumidor pueda beber la copa sin premura.

Por estos motivos, una de las principales preocupaciones de los elaboradores de vinos espumosos es encontrar nuevos procedimientos para mejorar la espumabilidad y la persistencia de su espuma. Las propiedades espumantes de los vinos espumosos dependen en gran medida de su composición química, que está estrechamente relacionada con su origen varietal, la madurez de la uva y las condiciones de vinificación (Cilindre y col., 2010; Coelho y col., 2011; Kemp y col., 2015). En este sentido, se ha descrito que la estabilidad de la espuma es favorecida por la presencia de agentes tensoactivos tales como proteínas, manoproteínas y polisacáridos que estabilizan la interfase de la burbuja debido a sus propiedades de superficie (Brissonnet y Maujean, 1993; Vanrell y col., 2005). De hecho, se conoce que todos los tratamientos de vinificación que disminuyen la concentración de proteínas afectan drásticamente las propiedades de la espuma del vino (Vanrell y col., 2007; Pocock y col., 2011). Por consiguiente, las bodegas elaboradoras de vino espumoso saben que han de ser muy cuidadosas con todos los factores que afectan a los niveles de proteína de mostos, vinos de base y vinos espumosos.

Por todas estas razones, durante los últimos años se han propuesto diversas estrategias para mejorar las propiedades espumantes de los vinos espumosos, entre las que destacan la suplementación con levaduras secas inactivadas (Pérez-Magarino y col., 2015; Medina-Trujillo y col., 2017b), la selección de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con mayor capacidad autolítica (Martínez-Rodríguez y col., 2001) y más recientemente el uso de levaduras *No-Saccharomyces* en la primera fermentación (González-Royo y col., 2015; Medina-Trujillo y col., 2017a).

En los últimos años han aparecido numerosas publicaciones científicas sobre las ventajas de la inoculación conjunta o secuenciada de levaduras *No-Saccharomyces* tales como *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora spp* y *Pichia kluyveri*, entre otras (Jolly y col., 2014; Benito y col., 2015) para mejorar la calidad y complejidad del vino. Específicamente, se han descrito efectos positivos sobre el aroma, el glicerol, los polisacáridos, las manoproteínas y la acidez volátil (Ciani y Comitini, 2011; Loira y col., 2014; Zara y col., 2014). De hecho, algunas cepas de estas levaduras *no-Saccharomyces* están disponibles en el mercado en forma de levadura seca activa y la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) acaba de aprobar una monografía al respecto en su última asamblea general en Sofía (Bulgaria).

En lo que refiere a la elaboración de vinos espumosos, nuestro grupo de investigación ha propuesto recientemente el uso de una inoculación secuencial de *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* durante la primera fermentación como una herramienta para mejorar las propiedades de la espuma en la producción de vino espumoso (González-Royo y col., 2015; Medina-Trujillo y col., 2017a). En el presente artículo se presentan dichos resultados.



## Materiales y métodos

### 2.1. Elaboración de los vinos base

En la bodega experimental de la Facultad de Enología de la Universidad Rovira i Virgili de Constantí (Tarragona, España) se elaboraron dos vinos monovarietales de uva Macabeo procedente de viñedos pertenecientes a Juve & Camps SL en Espiells [DO Cava; 41° 27'1,8972" (N) y 1° 49' 6,6216" (E)] durante la cosecha 2013. Las uvas fueron vendimiadas manualmente, estrujadas y prensadas (60 % de rendimiento) en una prensa neumática. El mosto fue inmediatamente sulfitado (30 mg de metabisulfito potásico/L) y filtrado mediante un filtro de vacío. El mosto se distribuyó en seis tanques de acero inoxidable de 100 L de capacidad. Tres tanques fueron inoculados de forma convencional con 250 mg/L de una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (QA23, Lallemand Inc., Montreal, Canada). Los otros tres tanques fueron inoculados inicialmente con 250 mg/L de una cepa comercial de *Torulaspora delbrueckii* (Biodiva, Lallemand Inc., Montreal, QC, Canada). Veinticuatro horas más tarde, cuando la densidad del mosto había disminuido unas tres unidades, los tanques fueron reinoculados con 250 mg/L de la cepa control de *Saccharomyces cerevisiae* (QA23, Lallemand Inc., Montreal, QC, Canada). Todas las microvinificaciones se realizaron a 18 ± 1 °C. Una vez finalizada la fermentación alcohólica los vinos fueron trasegados y sulfitados (40 mg/L of metabisulfito potásico). Los vinos se mantuvieron al abrigo del aire a 4 °C hasta el momento de su análisis y la toma de espuma.

### 2.2. Elaboración de los vinos espumosos

Los vinos espumosos (Cavas) fueron elaborados mediante el método tradicional seis meses más tarde. Ambos vinos base fueron suplementados con 22 g/L de sacarosa, 30 mg/L de bentonita (Adjuvant 83; Station Oenotechnique du Champagne, Epernay, France) y 2 x 10<sup>6</sup> células/mL de un cultivo preadaptado de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada (EC1118, Lallemand Inc., Montreal, QC, Canada). Se prepararon 12 botellas de cada tipo de vino (inoculación convencional e inoculación secuenciada). Las botellas fueron tapadas y nueve meses más tarde se procedió al degüello, análisis y cata.

### 2.3. Análisis químicos y físicos

Los parámetros estándar de los vinos base y los cavas se realizaron mediante los métodos recomendados por la OIV (2014). Las propie-

dades espumantes se midieron mediante el método Mosalux (Maujean y col., 1990). Las proteínas se determinaron mediante HRSEC-DAD (Canals y col., 1994). Los polisacáridos se analizaron mediante HRSEC-RID (Ayestaran y col., 2004).

### 2.4. Análisis sensorial

Todos las degustaciones se realizaron en la sala de catas de la Facultad de Enología de Tarragona (Universidad Rovira i Virgili), diseñada según la norma UNE 87004.197. La degustación se llevó a cabo con las copas oficiales ISO (ISO 3591.1977). Para evaluar las características organolépticas de las diversas muestras, todos los vinos espumosos fueron probados por un grupo de doce enólogos expertos de la Universidad Rovira i Virgili. Se realizó una prueba triangular sensorial de acuerdo con la norma UNE ISO 4120.1983 para comparar el vino espumoso de la inoculación convencional con el vino espumoso de la inoculación secuencial. El objetivo principal era determinar si los catadores eran capaces de reconocer qué Cava era diferente. El segundo objetivo era determinar qué Cava era preferido por los panelistas que habían identificado correctamente los distintos vinos.

### 2.5. Estadística

Todos los datos físicos y químicos se expresan como el promedio aritmético ± la desviación estándar de tres repeticiones. El análisis de varianza de un factor (ANOVA) y el ensayo de Tukey se llevaron a cabo con el software SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE UU). El nivel de significación del test triangular se determinó por el método de Jackson [29].

## Resultados y discusión

La Tabla 1 muestra los parámetros generales de los vinos de base y de los vinos espumosos. Como era de esperar, el contenido de etanol de los vinos espumosos fue alrededor del 1,3% superior al de los vinos de base. Este aumento corresponde a la transformación del azúcar añadido (22 g/L) en etanol con una relación de transformación de 16,9 g/L por grado de etanol. Dado que ambos vinos de base tenían contenidos de etanol similares, sus correspondientes vinos espumosos también tenían valores similares. En general, la acidez total de los vinos espumosos fue significativamente menor que en los vinos de base y su pH fue significativamente mayor.

Parámetro	Vino Base		Vino Espumoso	
	Convencional	Secuencial	Convencional	Secuencial
Etanol (%)	10,7 ± 0,1 A α	10,7 ± 0,1 A α	12,0 ± 0,1 A β	11,9 ± 0,1 A β
AT (g/L)	5,68 ± 0,01 A β	5,60 ± 0,02 A β	5,25 ± 0,06 A α	5,15 ± 0,06 A α
pH	2,81 ± 0,01 A α	2,80 ± 0,01 A α	3,03 ± 0,01 A β	3,02 ± 0,01 A β
AV (g/L)	0,18 ± 0,01 B α	0,12 ± 0,02 A α	0,22 ± 0,02 A β	0,22 ± 0,04 A β
Glicerol (g/L)	4,70 ± 0,30 A α	5,30 ± 0,14 B α	5,80 ± 0,36 A β	6,37 ± 0,54 A β

Tabla 1. Influencia de la inoculación secuencial (*Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae*) en la primera fermentación sobre los parámetros generales de los vino base y de los vinos espumosos

Todos los datos se expresan como la media aritmética de tres repeticiones ± desviación estándar. AT, acidez total expresada en g de ácido tartárico/L; AV, acidez volátil expresada en g de ácido acético/L. Diferentes letras mayúsculas latinas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre la inoculación convencional y secuencial. Diferentes letras griegas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los vinos de base y sus correspondientes vinos espumosos.

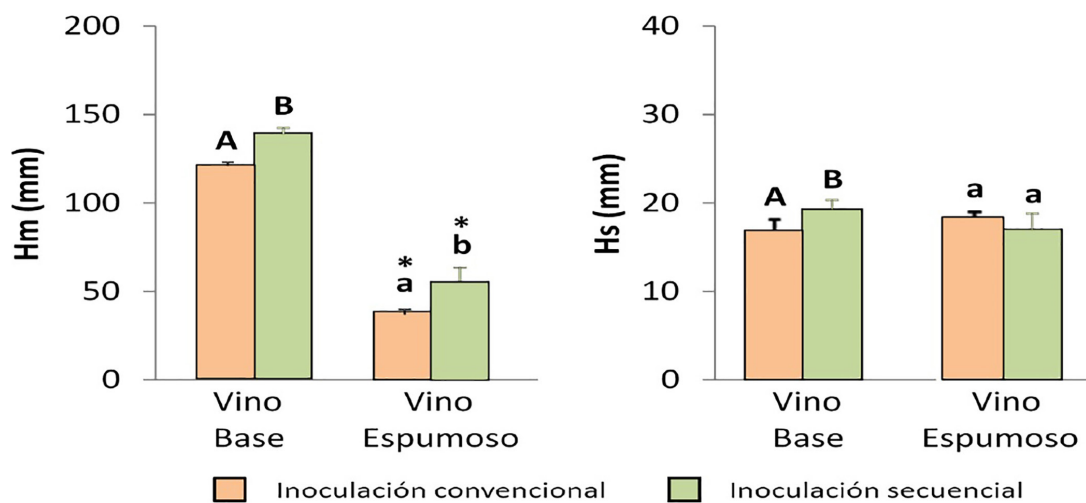


Figura 1. Influencia de la inoculación secuencial (*Torulasporea delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae*) en la primera fermentación sobre las propiedades espumantes de los vinos base y los vinos espumosos

Todos los datos se expresan como la media aritmética de tres repeticiones ± desviación estándar. Hm: altura máxima de la espuma; Hs: altura estable de la espuma. Diferentes letras mayúsculas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos de base. Diferentes letras minúsculas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos espumosos. \*: Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos de base y los vinos espumosos

Estos datos también son lógicos porque el aumento de etanol provoca una disminución en la solubilidad de bitartrato potásico (Boulton et col., 1996). La acidez volátil y la concentración de glicerol aumentaron después de la segunda fermentación y fueron significativamente mayores en los vinos espumosos. En general, estos cambios entre vinos de base y vinos espumosos están de acuerdo con los datos publicados anteriormente (Pueyo y col., 1995; Esteruelas y col., 2015).

Todos los datos se expresan como la media aritmética de tres repeticiones ± desviación estándar. AT, acidez total expresada en g de ácido tartárico/L; AV: acidez volátil expresada en g de ácido acético/L. Diferentes letras mayúsculas latinas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre la inoculación convencional y secuencial. Diferentes letras griegas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos de base y sus correspondientes vinos espumosos.

La Figura 1 muestra las propiedades de la espuma de la base y de los vinos espumosos medidos mediante el método Mosalux. Como era de esperar, la altura máxima de la espuma (HM) fue significativamente menor en ambos vinos espumosos que en sus vinos de base correspondientes. Esta disminución, que ya ha sido descrita previamente (Esteruelas y col., 2015), se puede atribuir al aumento del contenido de etanol, que ejerce un efecto negativo sobre la espumabilidad del vino, y a la absorción de proteínas por la bentonita añadida como coadyuvante para favorecer el removido de las lías (Vanrell y col., 2007). Nuestros datos por lo tanto confirman que la toma de espuma disminuye la altura máxima de la espuma. Sin embargo, no parece afectar a la altura estable de la espuma (HS) ya que vinos base y cava presentaron niveles similares en este parámetro.

Todos los datos se expresan como la media aritmética de tres repeticiones ± desviación estándar. Hm: altura máxima de la espuma; Hs: altura estable de la espuma. Diferentes letras mayúsculas indican la

existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos de base. Diferentes letras minúsculas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos espumosos. \*: Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos de base y los vinos espumosos

Mucho más interesante es señalar que el vino base y el vino espumoso elaborado mediante inoculación secuencial de *Torulasporea delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* presentó valores de HM significativamente superiores a sus correspondientes vino base y cava procedentes de la inoculación convencional. En el caso de HS, sí que se observó que los calores eran significativamente mayores en el vino base procedente de la inoculación secuencial, pero esas diferencias desaparecieron en los cava.

La Figura 2 muestra la composición en proteínas de los vinos de base y los vinos espumosos. Como era de esperar, el contenido total de proteínas de los vinos espumosos era muy inferior al de los vinos base. Esta fuerte disminución en el contenido total de proteínas de los vinos espumosos fue significativa tanto en el caso de la inoculación convencional como el de la secuencial y se observaba en todas las fracciones de peso molecular, especialmente la fracción de bajo peso molecular (LMW). Esta drástica disminución de proteínas es atribuible a su absorción por la bentonita utilizada como un coadyuvante de removido (Vanrell y col., 2007). Esta disminución en la concentración proteica es probablemente una de las principales razones por las que HM es menor en los vinos espumosos que en sus correspondientes vinos base.

Todos los datos se expresan como la media aritmética de tres repeticiones ± desviación estándar. HMw: fracción proteica de alto peso molecular ( $Mw > 80$  kDa); Imw: fracción proteica de peso molecular intermedio ( $80$  kDa  $> Mw > 60$  kDa); LMw: Fracción proteica de bajo peso molecular ( $Mw < 60$  kDa). Diferentes letras mayúsculas indican

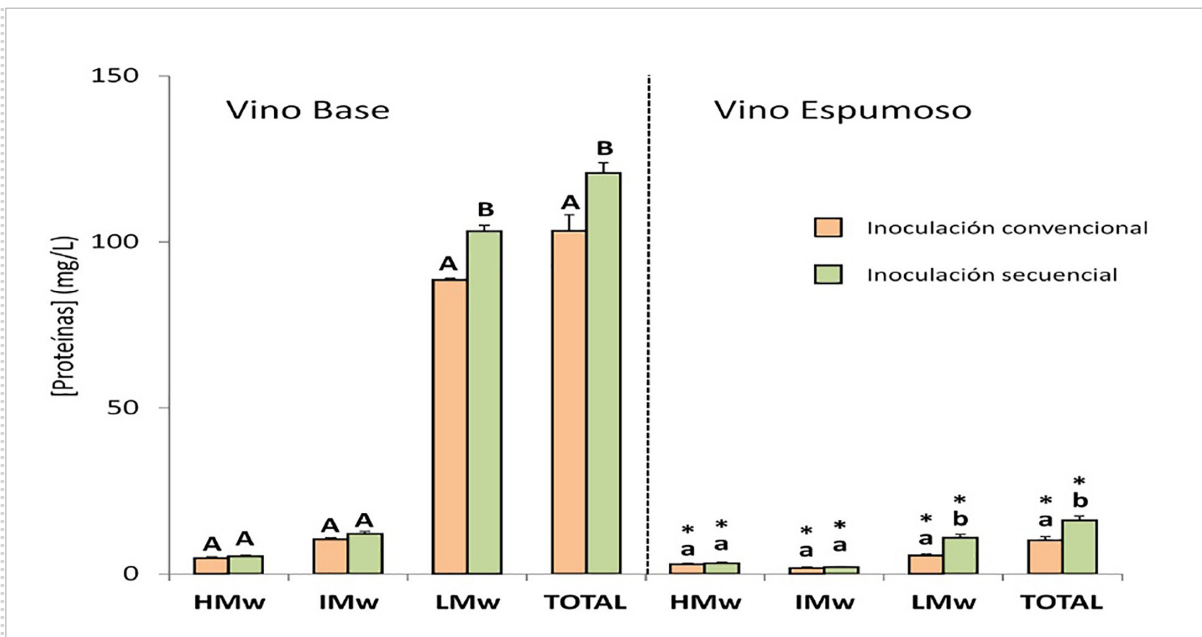


Figura 2. Influencia de la inoculación secuencial (*Torulasporea delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae*) en la primera fermentación sobre las proteínas de los vinos base y los vinos espumosos

Todos los datos se expresan como la media aritmética de tres repeticiones ± desviación estándar. HMw: fracción proteica de alto peso molecular (Mw > 80 kDa); Imw: fracción proteica de peso molecular intermedio (80 kDa > Mw > 60 kDa); LMw: Fracción proteica de bajo peso molecular (Mw < 60 kDa). Diferentes letras mayúsculas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los vinos de base. Diferentes letras minúsculas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los vinos espumosos. \*: Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los vinos de base y los vinos espumosos

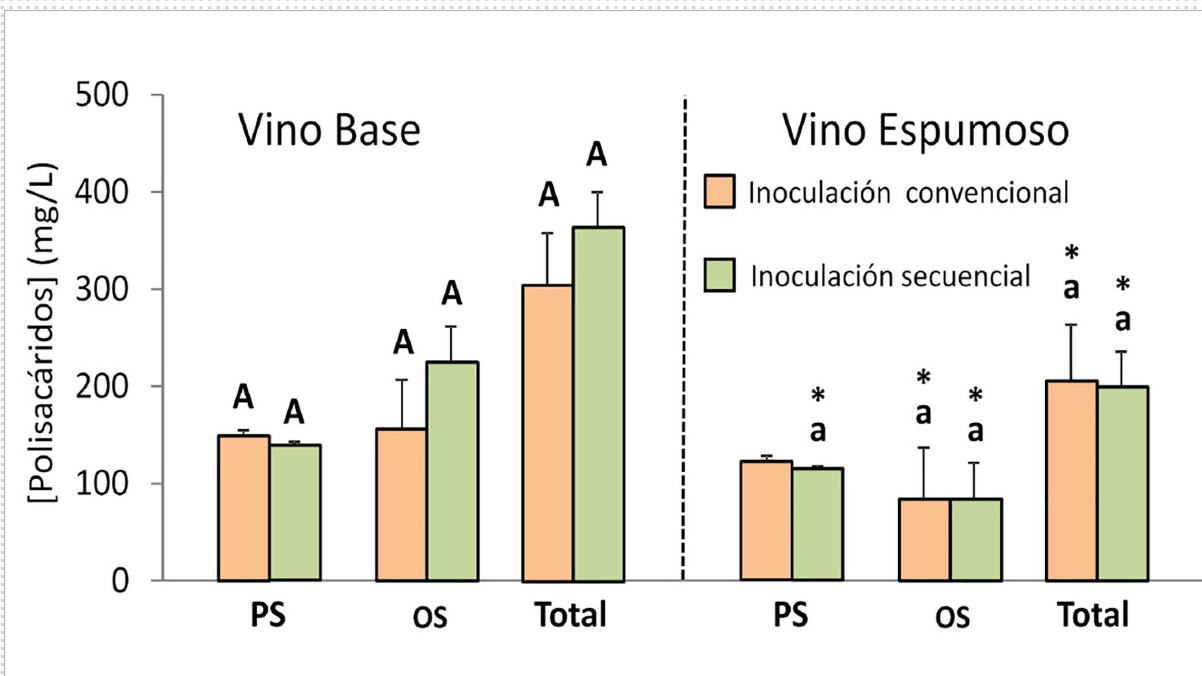


Figura 3. Influencia de la inoculación secuencial (*Torulasporea delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae*) en la primera fermentación sobre los polisacáridos y oligosacárido de los vinos base y los vinos espumosos.

Todos los datos se expresan como la media aritmética de tres repeticiones ± desviación estándar. PS: polisacáridos (PM > 5 kDa); SO: Oligosacáridos: (PM: < 5 kDa). Diferentes letras mayúsculas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los vinos base. Diferentes letras minúsculas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los vinos espumosos. \*: Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los vinos de base y los vinos espumosos.

la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos de base. Diferentes letras minúsculas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos espumosos. \*: Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos de base y los vinos espumosos.

La Figura 3 muestra la composición en polisacáridos de los vinos de base y los espumosos. De nuevo, la concentración de polisacáridos en los vinos espumosos fue significativamente menor que en sus correspondientes vinos de base y esta disminución se observó en todas las fracciones de peso molecular. Resultados similares han sido reportados por otros autores (Moreno-Arribas y col., 2000; Martínez-Lapuente y col., 2013), que han atribuido esta disminución a la precipitación. Dado que el etanol disminuye la solubilidad de algunos polisacáridos, el aumento de la concentración de etanol causado por la segunda fermentación puede explicar este fenómeno. Otra posible explicación es la absorción de algunos polisacáridos por la bentonita utilizada como agente aclarador o incluso por las células muertas de levadura.

Todos los datos se expresan como la media aritmética de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. PS: polisacáridos (PM > 5 kDa); SO: Oligosacáridos: (PM: < 5 kDa). Diferentes letras mayúsculas indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos base. Diferentes letras minúsculas indican la existencia

de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos espumosos. \*: Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los vinos de base y los vinos espumosos.

De todo lo expuesto se puede concluir que la inoculación secuencial con *Torulaspota delbreuckii* y *Saccharomyces cerevisiae* puede ser una herramienta muy útil para obtener vinos espumosos con mejores propiedades espumantes. Específicamente, la inoculación secuencial produjo vinos base con una altura máxima de la espuma (HM) significativamente mayor que los obtenidos mediante inoculación convencional, probablemente porque la autólisis de las células de *T. delbreuckii* en el vino base liberó mayores cantidades de proteínas, especialmente de la fracción de bajo peso molecular. Esta tendencia de mayor concentración de proteína y mejor HM se mantuvo en los vinos espumosos de la inoculación secuencial aunque, lógicamente, ambos valores se redujeron por la toma der espuma.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por CDTI (Programa CIEN) 'Nuevas estrategias vitivinícolas para la sostenibilidad y el incremento de la competitividad del sector en el mercado internacional (VINySOST 2014)'. Los autores también quieren agradecer a la bodega Juvé & Camps SA por proporcionar las uvas con las que se desarrolló este estudio. •

Para consultar los datos bibliográficos del artículo, visite: [www.interempresas.net/A188304](http://www.interempresas.net/A188304)