



APLICACIÓN DE NUEVAS HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA COMPENSAR LOS EFECTOS NEGATIVOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO SOBRE VINOS ESPUMOSOS (CAVA) Y VINOS TINTOS

Elena González Royo

Dipòsit Legal: T 983-2015

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Tesis Doctoral

**Aplicación de nuevas herramientas
biotecnológicas para compensar los efectos
negativos del cambio climático sobre vinos
espumosos (Cava) y vinos tintos**



Elena González Royo

Tarragona, Febrero de 2015

Tesis doctoral

Elena González Royo

**Aplicación de nuevas herramientas
biotecnológicas para compensar los efectos
negativos del cambio climático sobre vinos
espumosos (Cava) y vinos tintos**

Tesis doctoral

Dirigida por: Dr. Fernando Zamora Marín y Dr. Joan
Miquel Canals Bosch

Departamento de Bioquímica y Biotecnología

Grup de Recerca Tecnologia Enològica



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona, Febrero de 2015



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Fernando Zamora Marín i Joan Miquel Canals Bosch, professors titulats del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFIQUEN

Que aquest treball, titulat "APLICACIÓN DE NUEVAS HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA COMPENSAR LOS EFECTOS NEGATIVOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO SOBRE VINOS ESPUMOSOS (CAVA) Y VINOS TINTOS" que presenta ELENA GONZÁLEZ ROYO per l'obtenció del títol de doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Bioquímica i Biotecnologia d'aquesta Universitat.

Tarragona, 5 de Febrer 2015

Dr. Fernando Zamora Marín

Dr. Joan Miquel Canals Bosch

Esta tesis doctoral ha sido financiada por:

Empresa **LALLEMAND BIO S.L**

CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial), proyecto CENIT-Deméter (Consortios Estratégicos Nacionales de Investigación Tecnológica- Desarrollo de estrategias y métodos vitícolas y enológicos frente al cambio climático. Aplicación de nuevas tecnologías que mejoren la eficiencia de los procesos resultantes).

CICYT (Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología), proyecto AGL2011-9708-C02-01.

Listados de publicaciones Científicas derivadas de la tesis doctoral:

1. González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, K., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J.M., Zamora, F. Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food Res. Technol.* **2014**, 1–14.
2. Esteruelas, M., González-Royo, E., Kontoudakis, N., Orte, A., Cantos, A., Canals, J.M., Zamora, F. Influence of Grape Maturity on the Foaming Properties of Base Wines and Sparkling Wines (Cava). *J Sci Food Agric.* **2014**.
DOI 10.1002/jsfa6922
3. González-Royo, E., Urtasun, A., Gil, M., Kontoudakis, K., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M., Zamora, F. Effect of yeast strain and supplementation with inactive yeast during alcoholic fermentation on wine polysaccharides. *American Journal of Enology and Viticulture.* **2013**, **64**, 268-273.
4. González-Royo, E., Esteruelas, M., Kontoudakis, K., Fort, F., Canals, J.M., Zamora, F. The effect of supplementation with three commercial inactive dry yeasts on the chemical composition and astringency of model wine solution and red wine. Ha sido enviado a la revista *Journal of the Science of Food and Agriculture* para su publicación

Contribuciones a congresos derivados de esta tesis:

Autores: Elena González-Royo; Olga Pascual; Nikolaos Kountoudakis; Mireia Esteruelas; Braulio Esteve-Zarzoso; Albert Mas; Joan Miquel Canals; Fernando Zamora.

Título: Influence of sequential inoculation with *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in foaming properties of base wine.

Tipo de participación: Presentación de comunicación **Congrés:** 37º Congreso mundial de la viña y el vino 2014

Publicación: 9-14 Noviembre

Lugar de celebración: Mendoza (ARGENTINA) **Año:** 2014

Autores: Elena González-Royo; Mireia Esteruelas; Carlos Suarez; José María Heras; Joan Miquel Canals; Fernando Zamora.

Título: Influencia de la Inoculación Secuencial con *Torulaspota delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* y del empleo de levaduras inactivas sobre las propiedades espumantes del vino base.

Tipo de participación: Poster

Congreso: GIENOL 2013

Publicación: 18-21 Junio

Lugar de celebración: Madrid (ESPAÑA) **Año:** 2013

Autores: Elena González-Royo; Mireia Esteruelas; Nikolaos Kontoudakis; Fransesca Fort; Joan Miquel Canals; Fernando Zamora

Título: Influence of supplementation with inactive yeasts during oak ageing on wine polysaccharide composition

Tipo de participación: Poster

Congreso: Macrowine 2012.

Publicación: 18-21 Junio

Lugar de celebración: Bordeaux (FRANCIA) **Año:** 2012

Autores: Mireia Esteruelas; Elena González-Royo; Leiva B.; Nikolaos Kontoudakis; Franesca Fort; Joan Miquel Canals; Fernando Zamora

Título: Influence of grape maturity on foam characteristics of sparkling base wine (Cava)

Tipo de participación: Poster

Congreso: Macrowine 2012.

Publicació: 18-21 Junio

Lugar de celebración: Bordeaux (FRANCIA) **Año:** 2012

Autores: Elena González-Royo; Andoni Urtasun; Mariona Gil; Nikolaos Kontoudakis; Mireia Esteruelas; Franesca Fort; Joan Miquel Canals; Fernando Zamora

Título: Influence of yeast strain and supplementation with inactive yeast during alcoholic fermentation of wine polysaccharide composition

Tipo de participación: Poster

Congreso: VIIth Symposium in Vino Analytica Scientia 2011

Publicación: 21-23 Junio

Lugar de celebración: Graz (AUSTRIA) **Año:** 2011

Autores: Elena González; Andoni Urtasun; Mariona Gil; Nikolaos Kontoudakis; Mireia Esteruelas; Franesca Fort; Joan Miquel Canals; Fernando Zamora

Título: Influencia de la cepa de levadura y de la suplementación con levaduras inactivas durante la fermentación alcohólica en la composición en polisacáridos del vino

Tipo de participación: Poster

Congreso: XI Congreso Nacional de Investigación Enológica (GIENOL).

Publicación: 1-3 Junio

Lugar de celebración: Cadiz (ESPAÑA) **Año:** 2011

Dedicada a mi Familia y Amigos

*Amo sobre una mesa,
cuando se habla,
la luz de una botella
de inteligente vino.
Que lo beban,
que recuerden en cada
gota de oro
o copa de topacio
o cuchara de púrpura
que trabajó el otoño
hasta llenar de vino las vasijas
y aprenda el hombre oscuro,
en el ceremonial de su negocio,
a recordar la tierra y sus deberes,
a propagar el cántico del fruto*

Pablo Neruda

Fragmento de "Oda al vino"

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de este trabajo.

Es por ello, ante todo quiero agradecer al Dr. Fernando Zamora y al Dr. Joan Miquel Canals por ofrecermela oportunidad de vivir esta experiencia, y sobre todo por la orientación, dedicación y la paciencia mostrada durante estos años.

Especial reconocimiento merece también las sugerencias recibidas por el Dr. Braulio Esteve, que han enriquecido mi trabajo y mi formación.

A mis compañeras y compañeros de grupo que han compartido conmigo el día a día, haciendo más ameno las largas horas de trabajo. En especial, a una gran amiga, la Dra. Mireia Esteruelas por su apoyo y ayuda durante este largo camino.

A mis compañeros de departamento, a los técnicos de docencia y a los técnicos de la bodega, por facilitarme el trabajo siempre que ha estado en su mano.

A Antonio Orte y Antoni Cantos por las horas de trabajo compartidas.

A todo el equipo de TDI por darme la oportunidad de aprender tanto sobre maquinaria enológica, y por tratarme siempre como una más.

A Carlos por el soporte informático acompañado de su mejor sonrisa.

A mis amigos y amigas de Barcelona y Tarragona, por hacerme sonreír en los momentos más duros.

No menos importante es agradecer a mis padres su apoyo incondicional y su infinita paciencia. Gracias por hacer de mí, la persona en la que me he convertido.

Y por supuesto, a mis hermanos y a mi cuñado David por brindarme sus sabios consejos, por tenderme la mano en cada bache, y empujarme en cada subida, en definitiva, por ser los mejores compañeros de vida que podría tener.

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1. El cambio climático.....	2
2. Los compuestos fenólicos del vino.....	5
2.1. Los Antocianos	7
2.1.1. La Copigmentación.....	10
2.1.2. Combinaciones Antocianos-Flavanoles.....	12
2.1.3. Uniones directas.....	12
2.1.4. Uniones por puentes de Etilo.....	13
2.1.5. Formación de nuevos pigmentos	14
2.2. Los Flavanoles y proantocianidinas.....	15
3. La Astringencia	17
3.1. Otros factores que influyen en la sensación de astringencia.....	19
4. Los polisacáridos de la uva y del vino.....	19
4.1. Polisacáridos procedentes de la uva.....	21
4.1.1. Homogalacturonanos (HG).....	21
4.1.2. Ramnogalacturonano tipo I (RG-I) y sus cadenas laterales.....	22
4.1.3. Ramnogalacturonanos II (RG-II)	23
4.2. Polisacáridos procedentes de microorganismos.....	24
4.2.1. Polisacáridos procedentes de las levaduras.....	24
4.2.1.1. Los Glucanos.....	26
4.2.1.2. La Quitina.....	26
4.2.1.3. Las Manoproteínas.....	27
4.3. Polisacáridos Exógenos.....	28
4.4. Interés enológico de los polisacáridos.....	29
5. Las levaduras del vino y su efecto en la calidad final del producto.	31
5.1. Fermentación alcohólica.....	33
5.1.1. Fermentaciones Espontáneas	34
5.1.2. Uso de inóculos comerciales de levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermentación inducida	37
5.2. Levaduras No- <i>Saccharomyces</i>	42
5.2.1. Reevaluación de las levaduras No- <i>Saccharomyces</i>	44
5.2.2. Uso de inóculos comerciales de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> como una alternativa a la vinificación tradicional.	47

6. Introducción a la crianza sobre lías y nuevas alternativas.	49
6.1. La crianza sobre lías	50
6.2. Alternativas a la crianza sobre lías.....	52
6.2.1. Selección de levaduras en función de su facilidad de autolisado o de producción de algunos componentes.....	52
6.2.2. Preparados comerciales a base de levadura.....	53
6.2.2.1. Extractos de levadura y autolisados.....	54
6.2.2.2. Paredes de levadura y Cortezas de levadura.....	55
6.2.2.3. Manoproteínas	56
6.2.2.4. Levaduras inactivas.....	56
Referencias	59
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	88
III. RESULTADOS	90
Capítulo I. Influencia de la madurez de la uva en las propiedades espumantes de los vinos bases y sus correspondientes Cavas.	91
Capítulo II. Consecuencias enológicas de la inoculación secuencial con levaduras No-<i>Saccharomyces</i> (<i>Torulaspóra delbruekii</i> y <i>Metschnikowia pulcherrima</i>) y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en vino base cava.....	102
Capítulo III. Efecto de la cepa de levadura y de la suplementación con levadura seca inactiva durante la fermentación alcohólica en la concentración de polisacáridos del vino.....	117
Capítulo IV. Efecto de la suplementación con tres levaduras secas inactivas comerciales en la composición química y la astringencia de una solución modelo similar al vino y de un vino tinto.....	124
IV. DISCUSIÓN GENERAL	152
V. CONCLUSIONES	158

I. INTRODUCCIÓN

1. El cambio climático.

En la actualidad es ampliamente reconocido que el proceso de industrialización del planeta que se ha producido desde el XIX, y que implica la creciente dependencia de combustibles fósiles, un aumento en la deforestación de los bosques y el uso generalizado de productos químicos en la agricultura, (Burney y col., 2013) ha dado lugar a un aumento en la concentración de dióxido de carbono y otros gases, como el metano en la atmósfera de la tierra. Estos gases, dan lugar a que parte de la energía de la radiación solar que la superficie planetaria refleja sea retenida en la tierra. Este fenómeno evita que parte de la energía recibida se disipe en el espacio, produciendo a escala planetaria un efecto de calentamiento, denominado efecto invernadero (Crowley, 2000; Alley y col., 2005; Venkataramanan y col., 2011).

Además del efecto invernadero, también ha habido un aumento en la concentración de clorofluorocarburos en la atmósfera, estos gases han participado en el deterioro de la capa de ozono, favoreciendo el aumento en la radiación solar, especialmente en la zona ultravioleta del espectro electromagnético (Venkataramanan y col., 2011).

Todos estos fenómenos han favorecido el cambio climático que estamos viviendo en la actualidad, y que se prevé que se agrave en las siguientes décadas.

El IPCC (Panel Intergubernamental por el cambio climático) (IPCC, 2013) describe que el cambio climático implica, no sólo, un calentamiento global que incluye atmósfera y océano, sino que también da lugar a patrones de precipitación alterados. Esto es debido al aumento de las temperaturas, que estimulan el derretimiento de los hielos polares y las capas de nieve a gran altitud, no sólo afectando al nivel del mar, sino que también afecta en gran medida a las corrientes oceánicas, que son el gran creador de patrones meteorológicos y climáticos (Tate, 2001). Según el IPCC se prevé que aumenten las precipitaciones en latitudes septentrionales y en el ecuador, además de aumentar la frecuencia de casos extremos y variabilidad climática.

Todo ello, tiene un efecto directo sobre la actividad agrícola, en general (Carter y col., 1991; Porter y col., 1991; Quiroga y col., 2009), siendo el caso de la viticultura

especialmente sensible, debido a que este sector está restringido a un estrecho rango climático (Kenny y col., 1992; Schultz y col., 2000; Tate, 2001; Jones y col., 2005).

Esta variabilidad climática que se prevé a corto y largo plazo, pondría en riesgo este cultivo en algunas zonas meridionales, del hemisferio norte, tradicionalmente conocidas por la producción de vinos de calidad, dando lugar a un desplazamiento del cultivo hacia zonas más septentrionales y a zonas de mayor altitud. Zonas, en las que era impensable el cultivo de vid (Jones y col., 2005; Jones y col., 2010).

En este contexto, se ha observado que el cambio climático tiene un efecto directo sobre la calidad de la uva, y por lo tanto sobre la calidad del vino final (Tate, 2001)

Uno de los efectos que se ha observado en uva tinta, es un desfase del grado de madurez tecnológica de la uva, con el grado de madurez fenólica o madurez de pieles y semillas. Alcanzándose la madurez tecnológica en menos tiempo que la madurez fenólica (Zamora, 2002).

La madurez tecnológica permite disponer de información sobre el grado alcohólico, el pH y la acidez total, pero la elaboración de vinos de calidad precisa no sólo una adecuación de la proporción de azúcares y ácidos, sino también, niveles apropiados de compuestos fenólicos y aromáticos. Los compuestos fenólicos de la uva, los cuales detallaremos más adelante, son responsables del color, sabor, cuerpo y estructura de los vinos tintos. Se ha observado que estos compuestos no evolucionan de la misma manera que los azúcares durante la madurez, y generalmente su concentración máxima no coincide con la máxima concentración de azúcares. En consecuencia, bajo las condiciones que comporta el cambio climático, primaveras seca y veranos muy cálidos, se producen vinos con alta graduación alcohólica, acidez más baja y pH más alto, pero no maduros fenólica y aromáticamente. Este fenómeno conlleva que estos vinos sean desequilibrados, demasiado amargos o astringentes, con colores pobres o irregulares, y con aromas más vegetales. Además debido a su alto pH, estos vinos presentan un mayor riesgo de desarrollo de microorganismos indeseables (Zamora, 2002; Zamora, 2003).

Por ese motivo, se ha convertido en un gran dilema la decisión del momento óptimo de vendimia, en función de si se quiere recolectar la uva cuando la concentración de alcohol y ácidos es adecuada, o por lo contrario, recolectarla cuando la uva ha llegado a una correcta maduración fenólica y/o aromática.

Si la elección se basa en la primera posibilidad es probable que, aunque la concentración de etanol sea la adecuada, la uva no esté lo suficientemente madura desde el punto de vista fenólico y aromático. Sin embargo, si se decide por la segunda opción, es posible que la concentración de alcohol sea demasiado elevada, afectando también a la calidad del vino final.

Todos estos efectos se han estudiado principalmente desde el punto de los vinos tintos, por los claros efectos que tienen sobre ellos, pero es obvio que también tienen un claro efecto en la producción de vinos blancos, base cava, y espumosos, ya que, la maduración de la uva está relacionada con la composición de la uva, y ésta tiene un efecto directo en la calidad de los vinos blancos y espumosos (Brissonet y col., 1993; Pueyo y col., 1995; Moreno-Arribas y col., 2000; Vanrell y col., 2007). Así por ejemplo, Comelles y col., 1991 observaron el efecto negativo que presenta el etanol sobre la espuma. Por otro lado, se ha descrito que durante la maduración de la uva, se produce un incremento en aminoácidos, proteínas (Nunan y col., 1998), y polisacáridos (Gil y col., 2012). Todos estos compuestos parecen tener un efecto directo sobre la calidad de la espuma, (Andrés-Lacueva y col., 1996; Moreno-Arribas y col., 2000). Además, se ha descrito que los aminoácidos son precursores de aromas (Feuillant y col., 1982), por lo que su incremento puede favorecer la calidad aromática de los vinos. Por otro lado, los múltiples beneficios organolépticos, y tecnológicos de los polisacáridos, sobre los vinos blancos, base cava y espumosos, también han sido ampliamente estudiados.

En el caso de vinos base cava, uno de los grandes dilemas también se presenta en el momento de decidir cuándo recolectar la uva, debido a los efectos ya descritos que tiene el cambio climático sobre la maduración tecnológica de las uvas.

Estos vinos se caracterizan por tener un grado alcohólico alrededor de 10,5 y una acidez total elevada. Como se ha explicado anteriormente, el cambio climático comporta que si recolectásemos la uva muy verde obtendríamos vinos con una graduación alcohólica insuficiente pero con una acidez total correcta, mientras que si por lo contrario, esperásemos a que la uva tuviera la graduación alcohólica que necesitamos, su acidez total sería demasiado baja y su pH elevado, lo que sin duda afectaría a la calidad del vino base final y del cava en segunda instancia (Jones y col., 2005).

Por ese motivo, en la actualidad, decidir el momento óptimo de vendimia, para la producción de vinos de calidad, se ha convertido en un dilema, tanto en uva tinta como blanca.

En este contexto, parece que todas las técnicas que nos permitan mejorar la calidad de los vinos, pueden ser útiles, no sólo para diferenciar el producto, sino también para paliar algunos de los efectos que nos está comportando y nos comportará el cambio climático, en los países como el nuestro, donde parece ser que tendrá una mayor repercusión en el cultivo de la vid (Jones y col., 2005; Jones y col., 2010).

2. Los compuestos fenólicos del vino.

Los compuestos fenólicos desempeñan un papel importante en la calidad de las uvas y vinos, especialmente en vinos tintos, siendo uno de los principales parámetros determinantes de su calidad. Estos compuestos también están presentes en vinos blancos si bien en menor cantidad (Ribéreau-Gayón, 2003). Los compuestos fenólicos influyen en algunos atributos sensoriales tales como el color, el cuerpo, la astringencia y el sabor amargo (Gawel, 1998; Gawel y col., 2000; Vidal y col., 2003a; He y col., 2012a; He y col., 2012b; Quijada-Morín y col., 2014).

Por un lado, los antocianos son responsables del color del vino tinto, mientras que los taninos participan en algunas de las propiedades organolépticas más importantes, como son el cuerpo, la untuosidad y en especial sobre la astringencia y el sabor amargo (Quijada-Morín y col., 2014). Asimismo contribuyen al color como copigmentos y permiten su estabilización gracias a combinaciones estables con los antocianos (Liu y col., 2000; Remy-Tanneau y col., 2003; Berké y col 2005).

Los compuestos fenólicos provienen de diferentes partes del racimo, y son extraídos durante el proceso de vinificación. Su contenido y estructura va cambiando a lo largo de la crianza y envejecimiento, debido a procesos de oxidación, interacción con otras moléculas, precipitación, etc.

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos constan de uno o más anillos aromáticos que contiene uno o varios grupos hidroxilo (-OH) y una cadena lateral

funcional (-R). Según su estructura química la mayoría de autores distinguen dos grupos: fenoles flavonoides, con un esqueleto del tipo 2-fenil benzopirona y fenoles no flavonoides que son principalmente ácidos fenoles (Figura 1) (Cheynier y col., 2003; Ribéreau-Gayón y col.2003).

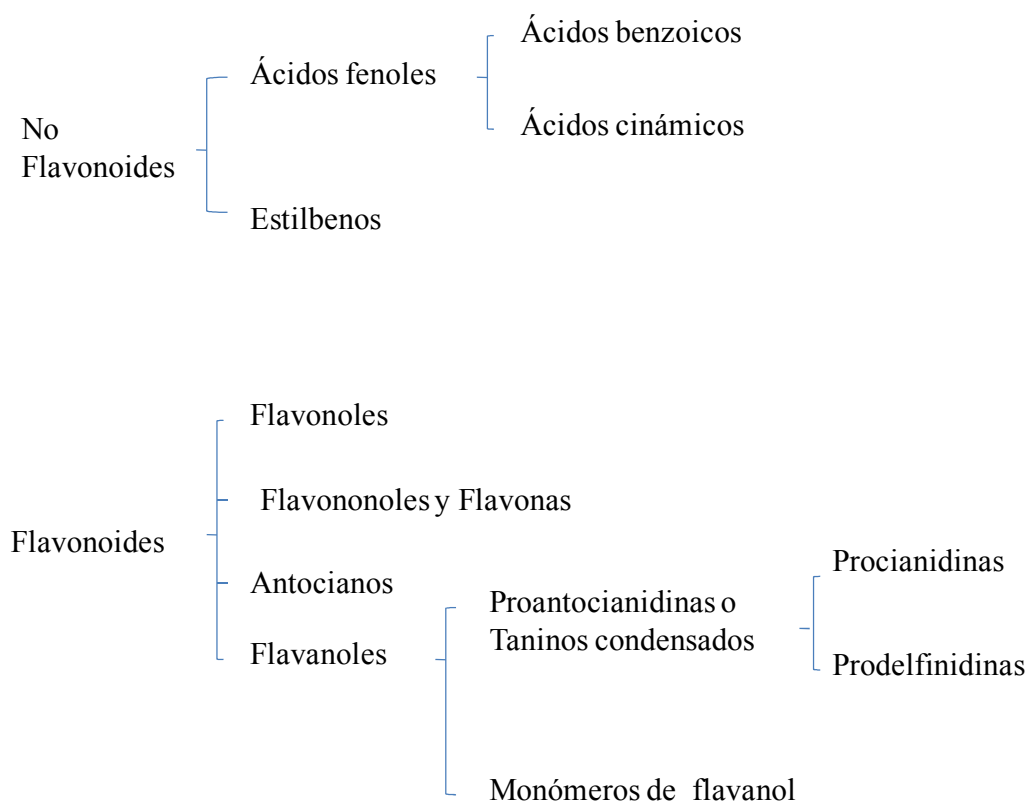


Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos.

Como se ha explicado en apartado anterior, el cambio climático tiene un efecto importante sobre estas moléculas. El principal efecto se produce sobre los antocianos del vino, afectando al color del vino tinto, y las proantocianidinas también denominados taninos condensados, que tienen también una cierta influencia sobre el color, pero sobre todo tienen una gran importancia gustativa. Esto es debido a que durante el proceso de maduración de la uva estos compuestos se acumulan. Se ha descrito que después del envero los antocianos y los taninos de las pieles aumentan progresivamente hasta alcanzar un máximo, tras el cual se mantienen estables o disminuyen ligeramente (Ryan y col., 2003). Sin embargo, los taninos de las semillas siguen otra tendencia. Su concentración aumenta durante el periodo herbáceo de la baya, alcanzando un máximo

justo después del envero, para posteriormente decrecer durante la maduración de la baya (Kennedy y col., 2000; Liu y col., 2010).

Por otro lado, también se ha estudiado la evolución de la sensación de astringencia de los taninos de pieles y semillas durante la maduración, y se ha observado que no siguen el mismo perfil, así mientras la astringencia de los taninos de las pieles disminuye con la madurez, la de los taninos de la semilla no presentan cambios (Glories y col., 1993; Llaudy y col., 2008).

La biosíntesis de los antocianos empieza durante el envero, incrementándose a lo largo de la maduración hasta llegar a un máximo. Posteriormente, durante la fase de sobremaduración de la baya, su concentración empieza a descender (Fernandez-López y col., 1992; Ryan y col., 2003).

Por lo tanto, podemos concluir que vinos elaborados con uvas no muy maduras presentarán una alta proporción de taninos de las pieles, y un color pobre o irregular. Por el contrario, los vinos tintos que se elaboran con uvas muy maduras poseerán una gran proporción de taninos de pieles y una baja proporción de taninos de semilla por lo cual serán menos astringentes (Llaudy y col., 2008; Gil y col., 2012).

Para conocer mejor la importancia de estos compuestos fenólicos, que tienen una influencia directa sobre el color y sobre las características organolépticas de los vinos, a continuación se aborda su descripción más detallada centrándonos únicamente en las familias de los antocianos y de los taninos condensados, ya que son los componentes de mayor influencia sobre la calidad del vino final.

2.1. Los Antocianos

Representan una parte importante tanto cualitativa como cuantitativa de los flavonoides de las uvas tintas y en consecuencia de los vinos resultantes. Son los responsables del color rojo-azulado de las uvas tintas y por lo tanto del color del vino tinto (He y col., 2012a; He y col., 2012b). Su localización en la mayor parte de las uvas se limita a los hollejos, si bien en las variedades tintoreras también están presentes en la pulpa (Souquet y col., 1996; Cheynier y col., 2003).

En las variedades de *Vitis vinifera* se distinguen 5 moléculas en función de los niveles de hidroxilación y metilación de los constituyentes de las posiciones 3' y 5' del anillo aromático; cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina, de las cuales, la malvidina acostumbra a ser la mayoritaria en la mayor parte de variedades. En *Vitis vinifera* se encuentran en forma de heterósidos formados por la combinación de un aglicón (antocianidina) que se encuentra unido a una molécula de glucosa en la posición 3. Así mismo la glucosa puede estar esterificada con diferentes ácidos, ácido acético, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico (Figura 2).

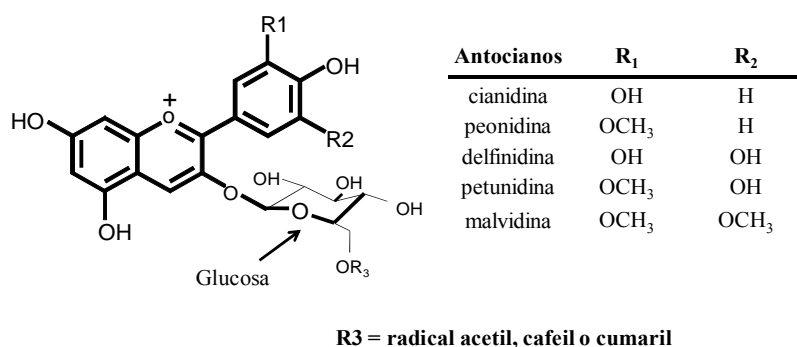


Figura 2. Estructura química de los antocianos monoglucósidos de la uva.

Su concentración se ve influenciada por el grado de maduración de la uva, como se ha descrito en el apartado anterior, pero además otros factores afectan a su tasa de acumulación de la uva, como es la temperatura (Kliewer y col., 1972; Spayd y col., 2002), la insolación (Dokoozlian y col., 1996; Matus y col., 2009), la cantidad de agua disponible (Ginestar, C y col., 1998; Yeves y col., 2011; Romero y col., 2013) y las prácticas vitícolas realizadas al viñedo (Gil y col., 2013; Romero y col., 2015). Todos estos factores afectan a la concentración final de estos compuestos en vino, por lo que las alteraciones climáticas tendrán una gran influencia en su concentración. Asimismo, las prácticas enológicas aplicadas durante la vinificación, tales como el tiempo y temperatura de maceración/fermentación, la frecuencia y volumen de remontado, el empleo de enzimas pectolíticas, etc., (Zamora, 2003; Gil y col., 2012; Río-Segade y col., 2014).

El color que presentan estas moléculas, dependerá del equilibrio entre sus diferentes formas químicas, y este equilibrio depende de parámetros tales como la temperatura, la luz, el pH, el contenido en dióxido de azufre (SO₂) (Zamora, 2003; Zamora, 2013). Así

por ejemplo, se ha descrito que la forma mayoritaria de estas moléculas a pH muy ácido es el catión flavilio o forma A⁺ que presenta coloración roja. A medida que el pH del medio aumenta el catión flavilio se transforma en base quinona o forma AO de color violáceo o en forma AOH o carbinol que es incolora. Ambas reacciones ocurren simultáneamente de acuerdo con las constantes de equilibrio. Por otro lado, a temperaturas elevadas la forma AOH puede transformarse en las calconas cis y trans de ligero color amarillo. A su vez, la forma trans puede oxidarse a ácidos fenólicos con la pérdida irreversible de color (Glories, 1984). (Figura 3)

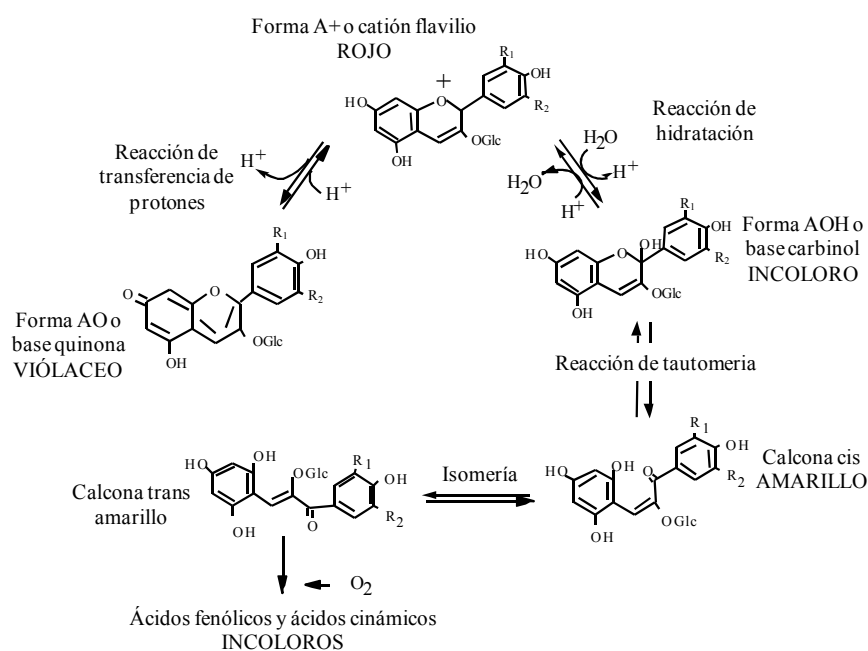


Figura 3. Equilibrio de los antocianos en función del pH (Zamora, 2003).

Al pH del vino tinto (3,5-4,0) podemos decir, que existe un equilibrio entre las formas rojas, incoloras y azules de los antocianos, contribuyendo al color entre un 20-30% de los antocianos totales. No obstante, tenemos que tener en cuenta que la estabilidad de los antocianos no sólo depende de parámetros químicos, sino que también se pueden dar interacciones con otras moléculas (Zamora, 2003). Principalmente hay cuatro fenómenos que modifican este equilibrio, afectando a la intensidad y tonalidad de los vinos tintos: la copigmentación, la formación de antocianos oligoméricos, las combinaciones de los antocianos con los flavanoles y la formación de nuevos pigmentos (piranoantocianos y otros pigmentos derivados de los antocianos).

2.1.1. La Copigmentación.

Desde el punto de vista molecular, la copigmentación implica la formación de un complejo en el que un antociano de estructura plana se asocia con un copigmento, dando lugar a estructuras en forma de sándwich con un número de capas variable entre 2 y 10 (Hidalgo, 2003). Estas estructuras crean un entorno hidrofóbico, que en caso de incrementarse el pH, impide el acceso de las moléculas de agua a los cationes flavilio de los antocianos. De este modo, se protegen las moléculas de antocianos de la transformación en bases hidratadas incoloras (Liao y col., 1992; Mirabel y col., 1999) y por lo tanto de la decoloración. (Figura4)

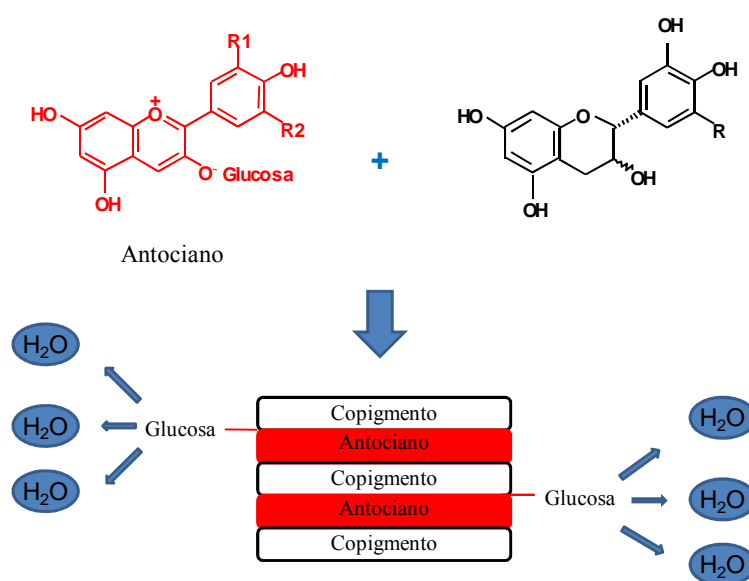


Figura 4. Mecanismo de copigmentación.

Este fenómeno se produce debido a las interacciones hidrofóbicas o de tipo Van der Waals entre las formas coloreadas de los antocianos, y otra molécula. Esta molécula puede ser un antociano monómero (autocopigmentación o autoasociación), también puede ser un fragmento de la propia molécula de antociano, como el sustituyente cumarilo de un antociano cumarilado (copigmentación intramolecular) o con otras moléculas denominadas copigmentos o cofactores como son ácidos fenóles, derivados de flavonoles, flavonas, flavonoides, polisacáridos, aminoácidos, y nucleótidos

(copigmentación intermolecular) (He y col., 2012b). Estas moléculas, que actúan como copigmentos, en general contienen núcleos aromáticos y poseen cierta planariedad.

La estructura y concentración tanto del antociano como del copigmento son esenciales para describir los procesos de copigmentación. Así por ejemplo, se ha descrito, que el antociano formará estructuras más estables a mayor grado de glicosidación y de acilación (Boulton, 2001), y por otro lado, los distintos copigmentos tienen diferente capacidad de copigmentación, siendo los flavonoles los compuestos con mayor poder de copigmentación, seguidos de los ácidos hidroxicinámicos, que muestran un comportamiento intermedio, y finalmente, son los flavanoles los que presentan un menor poder de copigmentación (Gómez-Mínguez y col., 2006; González-Manzano y col., 2009; Lambert y col., 2011). También podemos hacer distinción entre los distintos tipos de flavanoles, siendo la epicatequina mejor copigmento que la catequina (Liao y col., 1992; Mirabel y col., 1999).

Algunos estudios realizados en soluciones modelo, han mostrado que los complejos de la copigmentación se forman inicialmente en las bayas tintas durante la maduración, contribuyendo a su color. Se ha observado que estas combinaciones se destruyen fácilmente durante el estrujado de la uva (Hidalgo, 2003), pero estos complejos se vuelven a formar durante la maceración-fermentación fácilmente. Se trata por tanto de uniones poco estables (Hermosín-Gutiérrez, 2007).

La estabilidad de los copigmentos dependerá de la temperatura, pH, la fuerza iónica y la presencia de determinados solventes en el medio. Así por ejemplo, conforme vaya aumentando la concentración de etanol en el medio se producirá una disminución de la copigmentación. La presencia de oxígeno y las temperaturas elevadas también favorecerá la rotura de estos complejos (Hidalgo, 2003).

El fenómeno de copigmentación se considera uno de los principales mecanismos de estabilización del color en vinos tintos. Se ha descrito, que en vinos jóvenes tiene la capacidad de proteger a los antocianos de la adición de bisulfito, y de los cambios de pH. En etapas posteriores de crianza y envejecimiento, la copigmentación protegerá a los antocianos de la oxidación, ya que constituyen un reservorio de antocianos, permitiendo que estos permanezcan estables en disolución, hasta que se formen los

pigmentos poliméricos o uniones entre antocianos y flavanoles, que posteriormente se expandirá (Boulton y col., 2001; Berké y col., 2005).

El resultado final de la copigmentación es el aumento de la intensidad colorante (efecto hiperacrómico), y también se observa una modificación de la tonalidad hacia tonos más azulados (efecto batocrómico) (Vivar-Quintana y col., 2002).

2.1.2. Combinaciones Antocianos-Flavanoles.

Durante el envejecimiento del vino se produce una evolución de los compuestos fenólicos, provocando un cambio en la intensidad del color y en su tonalidad. Se observa una evolución del matiz de tonalidades azuladas hacia más anaranjadas. Además, se ha observado que los vinos añejos son más resistentes a la decoloración por la aplicación de bisulfito y a los cambios de pH que los vinos jóvenes. Estos fenómenos han sido clásicamente atribuidos a la formación de pigmentos poliméricos por interacciones entre antocianos y taninos, dando lugar a moléculas más estables (Cheynier y col., 2003; Ribéreau-Gayón y col., 2003).

En la bibliografía encontramos diferentes mecanismos de unión, siendo unos mediante uniones directas y otros mediados por otras moléculas (etanal, ácido glioxílico,...).

2.1.3. Uniones directas.

Las uniones directas pueden ser de dos formas:

- Antociano-Flavanol: Por adición del tanino sobre el catión flavilio A⁺, para dar lugar a una unión Antociano-Flavanol inicialmente incolora. Estas moléculas pueden recuperar el color y originar una forma flavilio combinada, que establece un nuevo equilibrio en función del pH con su forma incolora carbinol combinada o su forma quinona combinada, de color malva. Esta última transformación requiere de la presencia de oxígeno, por lo que se plantea que tenga lugar principalmente durante la crianza en barricas o cuando se aplica microoxigenación (Remy-Tanneau y col., 2003).

- Flavanol- Antociano: Estas uniones vienen dadas por la adición de la base hemiacetal o carbinol (AOH) sobre un carbocatión que se forma por la ruptura de las proantocianidinas, produciendo un complejo incoloro, que en función del pH establecerá equilibrio con su correspondiente forma coloreada. Este mecanismo no necesita de la presencia de oxígeno, y se ven favorecidas por ambientes reductores, por lo que durante el almacenamiento en depósito o la crianza en botella se aumenta su contenido (Ribéreau-Gayón y col., 2003).

2.1.4. Uniones por puentes de Etilo.

Las uniones mediante puentes etilo se pueden originar entre moléculas de flavanol o entre flavanoles y antocianos. En ese sentido, se ha descrito que existen dos mecanismos de reacción que tendrían lugar en el vino de forma simultánea, en los dos casos el intermediario es el etanal. Este compuesto lo encontramos en el vino procedente principalmente del metabolismo de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación alcohólica, y también debido a la acción de las bacterias acéticas, por la autooxidación de los compuestos fenólicos o por la oxidación química del etanol (Liu y col., 2000).

Las reacciones de condensación mediadas por etanal están influenciadas en gran parte por el pH, y la temperatura del vino (García-Viguera y col., 1994; Rivas-Gonzalo y col., 1995; Kontoudakis y col., 2011).

Los mecanismos de reacción consisten en la condensación del etanal sobre un flavanol, lo que originaría un carbocatión, el cual a su vez reaccionaría condensado con otro flavanol o con un antociano. Asimismo, los antocianos en forma carbinol también pueden reaccionar con el etanal y posteriormente unirse a otra molécula de antociano. Estas reacciones dan lugar a complejos tipo tanino-etil-tanino, tanino-etil-antociano y antociano-etil-antociano (Timberlake y col., 1976; Saucier y col., 1997; Atanasova y col., 2002). Las teorías clásicas afirmaban que las uniones tanino-etil-tanino provocaban un aumento del grado de polimerización de las proantocianidinas y las uniones tanino-etil-antociano la estabilización del color (Glories, 1984). Sin embargo, ha sido descrito que estas uniones por puentes etilo son inestables y que pueden generar nuevas

reorganizaciones estructurales de taninos y antocianos lo que generaría nuevos pigmentos de tipo vinilflavanol-antociano (Rivas-Gonzalo y col., 1995; Escribano-Bailón y col., 2001). En su conjunto todas estas reacciones coexisten y compiten entre ellas.

La competencia entre las distintas reacciones que se pueden dar de manera simultánea también está influenciada por la composición fenólica del vino, de manera que, si el vino inicial tiene una concentración mayor de taninos que de antocianos, predominarían las reacciones de polimerización. En cambio, si la concentración de antocianos es mayor que la de taninos, predominarían las reacciones de degradación de antocianos por oxidación (Zamora, 2003). Pero en el caso, de que la concentración de taninos y antocianos se equilibra, todas las reacciones serán probables, y es en estos casos en los que la crianza del vino da lugar a la estabilización de la materia colorante (Guadalupe y col., 2008).

2.1.5. Formación de nuevos pigmentos

Dentro de las interacciones que se pueden dar con los antocianos, también se han descrito la formación de nuevos pigmentos derivados de los antocianos. Entre ellos, encontramos los piranoantocianos, una serie de compuestos que son derivados de los antocianos, y que se caracterizan, por poseer un anillo de pirano adicional que está unido al esqueleto flavonoide del catión flavilio del antociano original (Francia-Aricha y col., 1997; Mateus y col., 2002). Se han descrito que estos compuestos contribuyen al color rojo anaranjado de los vinos de crianza (Håkansson y col., 2003) y que presentan una mayor resistencia a la decoloración por sulfuroso (Sarni-Manchado y col., 1996).

Los piranoantocianos se originan por la unión de los antocianos mediante cicloadición con ciertos compuestos que se caracterizan por tener un doble enlace polarizado. Dichos compuestos son principalmente metabolitos producidos por las levaduras, como ácido pirúvico (vitisina A), (Fulcrand y col., 1998) etanal (vitisina B), (Bakker y col., 1997; Mateus y col., 2001), vinilfenol, (Fulcrand y col., 1996), 4- vinilguayacol (Hayasaka y col., 2002). También se ha de considerar la formación de aductos vinilflavanol-antociano que se derivan de la despolimerización de las uniones puente etilo de los

flavanoles y su posterior cicloadición con los antocianos libres (Schwarz y col., 2003a). Este sería el caso del vinylcatechol (pinotin A) (Schwarz y col., 2003b), y vinylcatechin (Cruz y col., 2008).

Todas estas moléculas se caracterizan por ser bastantes estables al pH (Bakker y col., 1997) y por resistentes a la decoloración llevada a cabo por el bisulfito (Bakker y col., 1997; Francia-Aricha y col., 1997) y a las altas temperaturas (Sarni-Manchado y col., 1996), ya que tienen bloqueada la posición 4 del antociano en el anillo pirano (Sarni-Manchado y col., 1996; Bakker y col., 1997; Francia-Aricha y col., 1997). Además, como son compuestos de tamaño similar a los antocianos libres, se mantienen disueltos en vino, de manera que tienen poca tendencia a precipitar durante el envejecimiento (Hermosín-Gutierrez, 2007).

También se han descrito otros pigmentos derivados de los antocianos aún más complejos que los piranoantocianos como serían las portisinas (Mateus y col., 2003, Mateus y col., 2006), las oaklinas (de Freitas y col., 2004) y otros (Marquez y col., 2013). Existe por tanto una gran diversidad de pigmentos, con una gama de colores de rojo anaranjado al azul intenso, por lo que parece que la naturaleza química del color del vino es un tema sumamente complejo (Zamora, 2013).

2.2. Los Flavanoles y proantocianidinas.

Constituyen una familia muy compleja dentro de los compuestos fenólicos, se encuentran en elevadas concentraciones en uva tanto en piel como en las semillas y tienen un efecto muy importante en las características organolépticas de los vinos tintos. Los flavanoles condensados, más particularmente las proantocianidinas así como sus monómeros, están presentes en todas las partes sólidas del racimo (hollejos, pepitas y raspón) y se solubilizan en el vino durante la fase de maceración.

En general, los monómeros mayoritarios en uvas y vinos son la (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina y el galato de (-)-epicatequina (Figura 5). Estos monómeros los encontramos en formas más o menos polimerizadas, en forma de oligómeros (con un grado de polimerización entre 2 y 5 unidades) y como polímeros (con un grado de polimerización mayor de 5 unidades). Todos los productos de

condensación a partir de dos unidades monoméricas son consideradas como proantocianidinas o taninos condensados.

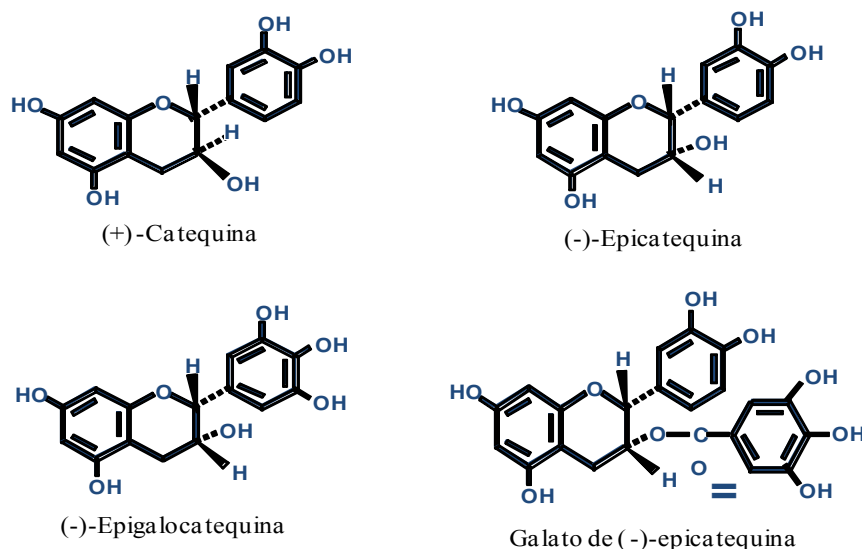


Figura 5. Estructura química de los principales flavanoles monómeros de la uva.

El término tanino, que hace referencia a su capacidad para precipitar proteínas, es un poco más amplio, ya que, no sólo engloba las proantocianidinas o taninos condensados que proceden directamente de la uva, sino que también engloba los taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) que provienen de la madera de roble o de la adición de tanino enológico comercial (Ribéreau-Gayon y col., 2003).

Las proantocianidinas son los flavonoides cuantitativamente más importantes en vino. Se separan dos grupos las procianinidas formadas por unidades (+)-catequina, (-)-epicatequina y galato de (-)-epicatequina y las prodelfinidinas que además contienen unidades (-)-epigallocatequina y una menor proporción de galato de (-)-epicatequina. Comúnmente se les conoce a ambas como proantocianidinas (Porter y col., 1985). Las pieles de la uva contienen procianinidas y prodelfinidinas, con un alto grado medio de polimerización y un bajo porcentaje de unidades galoiladas. En contraste, las semillas contienen únicamente procianinidas con bajo grado de polimerización y un alto porcentaje de unidades galoiladas (Downey y col., 2003; Cerpa-Calderón y col., 2008).

Estos compuestos juegan un papel muy importante en el color del vino. En vinos blancos se ha descrito que son los responsables, en parte del pardeamiento oxidativo

(Cheynier y col., 1989), y en vinos tintos se ha descrito que pueden actuar como copigmentos, intensificando el color de los vinos tintos jóvenes, o estabilizando el color durante el envejecimiento del vino. Esto es debido a la interacción con los antocianos mediante reacciones de polimerización y condensación, de manera que evitan su oxidación y o precipitación (Vidal y col., 2002; Zamora, 2013).

Además, se ha descrito que las proantocianidinas son responsables de múltiples características organolépticas del vino tinto, como son el sabor amargo, la astringencia, la estructura y cuerpo (Vidal y col., 2003a).

La concentración de estos polifenoles también se ve influenciada por la maduración de la uva. De hecho la influencia de la madurez de la uva sobre su extractibilidad ha sido ampliamente estudiada (Kennedy y col., 2000; Harbertson y col., 2002; Bautista-Ortín y col., 2012). La extracción de las proantocianidinas presentes en las vacuolas es relativamente rápida, mientras que las proantocianidinas asociadas a la pared celular muestran una cinética de extracción mucho más lenta (Geny y col., 2003). Además se ha descrito que su extracción dependerá de la estructura de la pared celular y ésta va cambiando a lo largo de la maduración (Barnavon y col., 2001). Estudios recientes, (Gil y col., 2012) concluyen que durante la maduración de la uva se produce un aumento de las proantocianidinas así como de su grado de polimerización. Además se ha observado, que los vinos procedentes de uvas más maduras aportan una mayor proporción de taninos de piel y una menor proporción de taninos de semillas. Esto tiene un efecto directo sobre la astringencia, ya que se ha descrito que los taninos de las pieles son menos astringentes que los de la semilla (Zamora, 2002; Ribéreau-Gayón y col., 2003).

3. La Astringencia

Como se describe anteriormente, otro de los factores que se ven fuertemente influenciado por la madurez de la uva es la astringencia del correspondiente vino.

La percepción de la astringencia es determinante para la aceptación de muchos alimentos. En enología es probablemente uno de los atributos sensoriales más importantes en los vinos tintos, ya que define en gran medida su calidad. Si la astringencia es excesiva se considera que el vino es duro, seco y desagradable. Pero si

por lo contrario la astringencia es escasa, se considera que los vinos son planos, insípidos y poco interesantes.

Generalmente se acepta que la percepción de la astringencia es causada por la capacidad de algunos compuestos fenólicos, especialmente taninos, para unirse a las proteínas salivales (Luck y col., 1994; de Freitas., 2001), creando un complejo tanino-proteína, que tiende a precipitar y provoca la pérdida del efecto lubricante, contribuyendo a la sensación de sequedad en la boca. También se ha descrito, que la fracción de material astringente que permanece en solución puede contribuir a la sensación de amargor, al interactuar con receptores del gusto (Bate-Smith., 1973; Prinz y col., 2000).

Según la bibliografía, las proteínas ricas en prolina, serían las principales proteínas de la saliva que se asocian con los taninos. Esta unión se realiza mediante puentes de hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas, o en menor medida por enlaces covalentes (Hagerman y col., 1978). Se ha descrito que la astringencia que generan las proantocianidinas se ve influenciada por varias variables tales como su concentración total, el grado de polimerización promedio (mDP) (Preys y col., 2006), su composición en subunidades y su distribución (Vidal y col., 2003a).

En este contexto, se ha determinado que la sensación de aspereza, secado y rugosidad correlacionan con un mayor grado de galoilación de las fracciones y también con un mayor grado de polimerización. También, se ha descrito, que la presencia de las unidades de epigallocatequina reducirían la percepción de aspereza en vino, mientras que las altas proporciones de subunidades de (-)-epicatequina en posición de extensión de cadena y subunidades de galocatequinas en posición terminales aumentan la sensación de astringencia (Vidal y col., 2003a; Quijada-Morín y col., 2012).

Los taninos, por si mismos tienen la capacidad de provocar la astringencia, como ya se ha comentado anteriormente, pero se ha observado que no todos actúan de la misma manera. Así por ejemplo, los taninos extraídos de las pieles tienen una menor capacidad de interactuar con las proteínas, que los procedentes de las semillas, por lo que son menos astringentes que los de las semillas. Éste hecho, está relacionado con su composición, las semillas contienen mayor concentración de taninos que los hollejos y sobretodo una mayor proporción de unidades galoiladas.

3.1. Otros factores que influyen en la sensación de astringencia.

Se ha postulado que además de los taninos otros componentes del vino tienen capacidad de influir y/o modular la sensación de astringencia.

El efecto del pH sobre la sensación de astringencia ha sido ampliamente descrito (Bate-Smith, 1973; Lee y col., 1991; Horne y col., 2002; Siebert y col., 2003) y se ha observado que la disminución de pH provoca un aumento en la intensidad de dicho atributo (Horne y col., 2002). Por otro lado, el vino contiene componentes que afectan la viscosidad, entre los cuales encontramos el etanol, los polisacáridos y monosacáridos y el glicerol. El aumento de la viscosidad se traduce en una reducción de la astringencia según Ishikawa y col., 1995.

Además de aumentar la viscosidad, los polisacáridos tienen la capacidad de actuar como coloides protectores, destinados a prevenir o limitar la agregación tanino-proteína e inhibir la precipitación de estos complejos. Se ha postulado que los polisacáridos pueden interactuar con los taninos y disminuir su reactividad con las proteínas salivales. También se ha observado que los polisacáridos pueden formar un complejo ternario con la proteína y los taninos, aumentando la solubilidad del complejo en medio acuoso, evitando de esta manera su precipitación (Luck y col., 1994; Riou y col., 2002).

Por otro lado y como ya se ha comentado, a medida que evolucionan los vinos se producen combinaciones entre antocianos y proantocianidinas. En ese sentido se ha postulado que estas combinaciones disminuirían la reactividad de las proantocianidinas con las proteínas salivales lo que se traduciría en una suavización de la astringencia (de Freitas., 2001).

En los vinos de crianza se deberá de tener en cuenta que la madera de roble libera taninos hidrolizables que también pueden incidir en la astringencia del vino (Chira y col., 2013).

4. Los polisacáridos de la uva y del vino.

Los polisacáridos son uno de los principales grupos de macromoléculas presentes en mostos y vinos. Pese a que no se les atribuyen ningún efecto sensorial inmediato, son

conocidos desde hace tiempo por sus múltiples aplicaciones técnicas y sensoriales, que se basan principalmente en su capacidad para interactuar con partículas coloidales presentes en vinos y mostos, reduciendo la reactividad de estas partículas y limitando su agregación y floculación.

Desde el punto de vista enológico, se puede clasificar a los polisacáridos por su origen: los procedentes de la propia uva, los liberados por las levaduras y otros microorganismos que se desarrollan en el mosto y el vino, los procedentes de los hongos que afectan a la uva y los procedentes de aditivos autorizados (Figura 6).

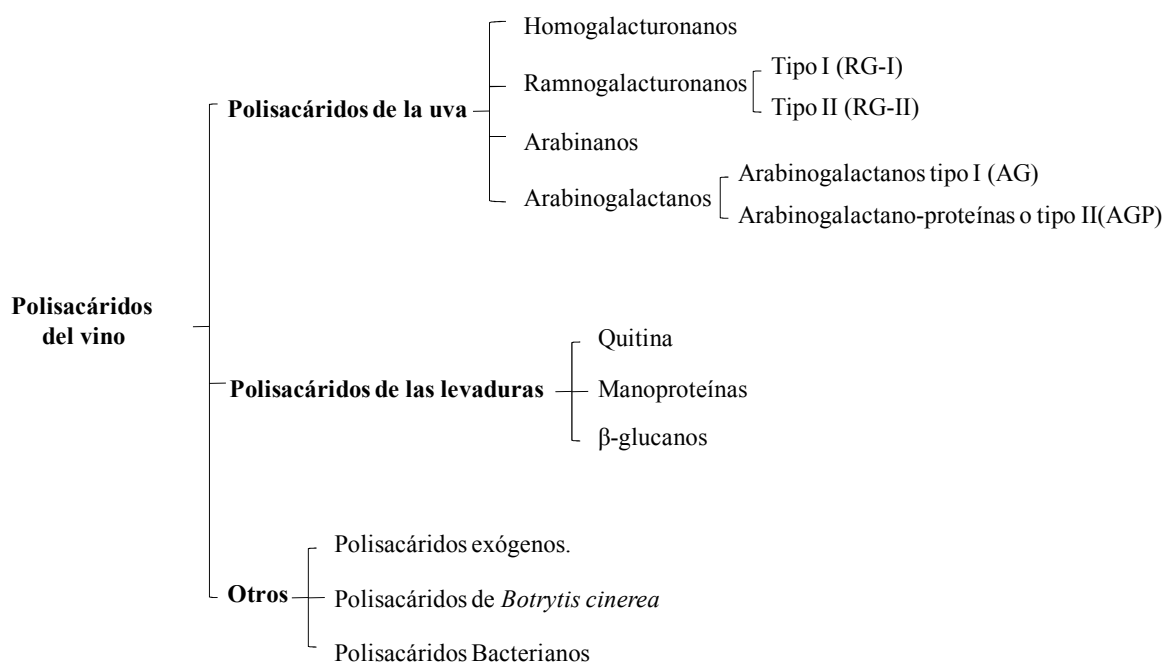


Figura 6. Clasificación de los principales polisacáridos del vino según su procedencia.

Además, estos compuestos se pueden dividir en polisacáridos ácidos y neutros, según contiene ácido galacturónico o no (Segarra y col., 1995; Aguirre y col., 2009).

Dentro de los polisacáridos procedentes de la uva, los homogalacturonanos y ramnogalacturonanos I y II pertenecen al grupo de polisacáridos ácidos y los arabinanos y arabinogalactanos I y II se engloban dentro del grupo de polisacáridos neutros. Los polisacáridos procedentes de las levaduras, mananos y manoproteínas, β -glucanos y quitina, son todos de carácter neutro.

4.1. Polisacáridos procedentes de la uva.

Los polisacáridos procedentes de la uva, son el resultado de la degradación y la solubilización de sustancias pécticas, procedentes de la pared de las células del hollejo y de la pulpa de la baya, que se liberan en las primeras etapas de vinificación (Doco y col., 1999). Durante la maduración de la uva, las sustancias pécticas ácidas solubles aumentan, observándose un incremento cuando el viñedo sufre sequía prolongada. Esto es debido a la acción de las enzimas pectolíticas.

Las sustancias pécticas de la uva están formadas por una cadena de decenas a varias centenas de moléculas de ácido galacturónico (homogalacturonano), conocida como “región lisa” interrumpida por otras estructuras de ramnogalacturonano, en las cuales, la ramnosa se intercala con unidades de ácido galacturónico. Esta estructura, toma una forma de hélice abierta, donde cada espiral está formada por tres unidades de ácido galacturónico, y es la inserción de los ramnogalacturonanos lo que hace girar el eje de la hélice en ángulo recto, formando un “codo péctico”. Esta zona es la denominada “zona erizada” (Ribéreau-Gayón, 2003).

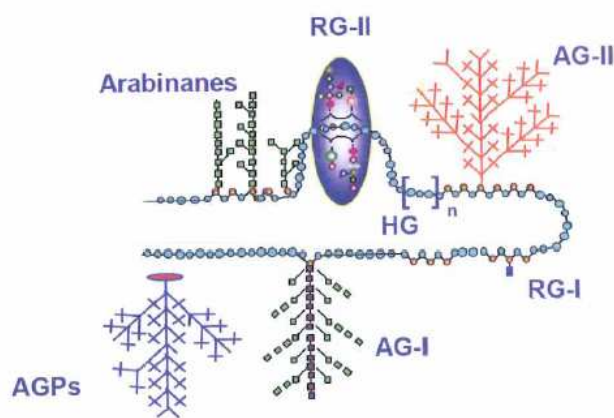


Figura 7. Representación esquemática de las pectinas de la baya (Doco y col., 1995).

4.1.1. Homogalacturonanos (HG)

Estos polisacáridos están formados por cadenas lineales de ácido galacturónico unidos por enlaces α -(1-4), formando la denominada “región lisa” de la pectina de las paredes celulares. Estas cadenas están esterificadas con metanol en un alto porcentaje y/o con

ácido acético en menor medida (Hidalgo, 2003). Es el alto grado de metilación que tiene, lo que le confiere sus propiedades estructurales y funcionales.

Estas substancias pese a ser los polisacáridos pécticos mas abundantes en uva, son inapreciables en vino, debido a que su estructura se ve fácilmente hidrolizada por las enzimas pectolíticas, provocando la degradación y liberación al medio de ramnogalacturonanos contenidos en las “zonas erizadas”.

4.1.2. Ramnogalacturonano tipo I (RG-I) y sus cadenas laterales

Entre las moléculas de ácido galacturónico de los homogalacturonanos, se insertan moléculas de α -L-ramnosa aleatoriamente. En esta cadena encontramos insertados en las cadenas laterales polisacáridos arabinanos y arabinogalactanos del tipo I y II en posición α -(1→4) con la ramnosa (Vidal y col., 2003b), que confieren un aspecto ramificado, rugoso o erizado a esta zona de las paredes celulares

- Arabinanos: moléculas de estructura simple, basada en una cadena lateral de L-arabinofuranosa unidas por enlaces α -(1→5) con un 30-40% de residuos sustituidos por arabinofuranosa terminal en el C3. Estas moléculas son poco hidrolizadas por los enzimas correspondientes, pese a esto, bajo el efecto de la arabinofuranosidasa puede dar lugar a la aparición de turbios en el vino, debido a los residuos de los hidrolizados.

- Arabinogalactanos tipo I: están formadas por una cadena de galactosas unidas por enlaces del tipo β -(1→4), con ramificaciones en el C3 de unidades o cadenas de arabinosas ligadas por enlaces α -(1→3).

Estas moléculas son muy abundantes en frutos como la manzana, encontrándose en uva en menor cantidad, pero son prácticamente insolubles por lo que no las encontramos ni en vinos ni en mostos (Hidalgo, 2003).

- Arabinogalactanos II o arabinogalactano-proteínas (AGP): Principalmente se localizan en la pulpa y también, aunque en menor concentración, en los hollejos (Vidal y col., 2001).

Forman parte de RG-I mediante una unión lateral, en forma soluble, por lo que, son fácilmente extraíble durante el prensado, siendo los poliósidos más abundantes que existen en mosto y vinos (Vidal y col., 2000).

Són moléculas complejas, con gran número de ramificaciones. Forman parte de la “zona erizada” de las sustancias péctidas. Su estructura principal está compuesta por cadenas de galactosa, unidas por enlaces osídicos tipo β -(1→3), en los laterales encontramos cadenas cortas de galactosa unidas por enlaces β -(1→6) y estando sustituidos en los carbonos 3 y 4 por moléculas de arabinofuranosas, ácido galacturónico y otros compuestos.

Los AGII pueden unirse a proteínas formando los arabinogalactanos-proteínas (AGP) por la unión covalente entre un arabinogalactano y la hidroxiprolina, aunque los AGP aislados en vino contienen menos de un 5% de proteínas.

Esta fracción se encuentra formando parte de la fracción insoluble de los tejidos vegetales por lo que su concentración en mostos es despreciable, mientras que en vinos los encontramos en mayor cantidad. Se ha descrito que un 40% de los polisacáridos presentes en vino tinto son AGPII (Vidal y col., 2003b), esto es debido a las operaciones de maceración durante la fermentación.

4.1.3. Ramnogalacturonanos II (RG-II)

Son polisacáridos de carácter ácido, de estructura muy compleja, y de masa molecular muy pequeña. Están constituidos por una cadena principal de ácido galacturónico unidos por enlaces α -(1-4), en la que se enganchan lateralmente cuatro cadenas de oligosacáridos (fructosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, ácido galacturónico o glucurónico), así como también azúcares poco corrientes como son la 2-O-metilfucosa, 2-O-metil-xilosa, KDO o ácido 3-deoxi-D-mano-octo-2-ulopirásónico, DHA o furanosa, 3-C-hidroximetil-D-eritrofurano o apiosa.

Esta molécula es muy resistente a la hidrólisis de las enzimas pectolíticas, encontrándose en consecuencia como residuo en mostos y vinos (Doco y col., 1997).

Están en cantidades más abundantes en las paredes celulares de los hollejos, que en la pulpa, por lo que, su concentración en vinos tintos es mayor que en vinos blancos. Su concentración suele estar en torno al 20% de los polisacáridos solubles totales en el vino tinto (Pellerin y col., 1996; Vidal y col., 2003b).

Otra característica de estas moléculas es su capacidad complejante sobre el plomo, favoreciendo su eliminación en vino. Este hecho tiene vital importancia debido a la alta toxicidad que presenta el plomo sobre el ser humano. (Pellerin y col., 1997).

4.2. Polisacáridos procedentes de microorganismos.

Además de los polisacáridos procedentes de la levadura, y los procedentes de la uva, en el vino también encontramos otros polisacáridos procedentes de otros microorganismos.

Así por ejemplo, el hongo *Botrytis cinérea*, responsable de la podredumbre gris y noble de la uva, produce β -glucanos (Dubordieu y col., 1981) que se disuelven en el mosto, pasando de esta manera al vino. Estos glucanos se caracterizan por dificultar las operaciones de desfangado en el mosto y de filtración en el vino, además de tener la capacidad de inhibir la levadura cuando se inicia la fermentación, lo que puede dar lugar a un aumento de la concentración de ácido acético en el vino final (Fulgelsang y col., 2007).

También otros microorganismos como las bacterias lácticas, se ha descrito que tienen la capacidad de producir glucanos (Fulgelsang y col., 2007). Aunque principalmente son las levaduras encargadas de la fermentación alcohólica los principales microorganismos que enriquecen el vino de polisacáridos.

4.2.1. Polisacáridos procedentes de las levaduras.

Los polisacáridos procedentes de las levaduras son la segunda fuente mayor de liberación de polisacáridos en vino. Los polisacáridos procedentes de las levaduras están situados en la pared celular, que representa entre 15-30% de su peso seco en *S. cerevisiae* (Aguilar-Uscanga y col., 2003). Y se estima que su tamaño va de 110-200

nm de ancho (Dupres y col., 2010; Yamaguchi y col., 2011) esta pared se halla separada de la membrana plasmática por el llamado espacio periplasmático (Figura 8).

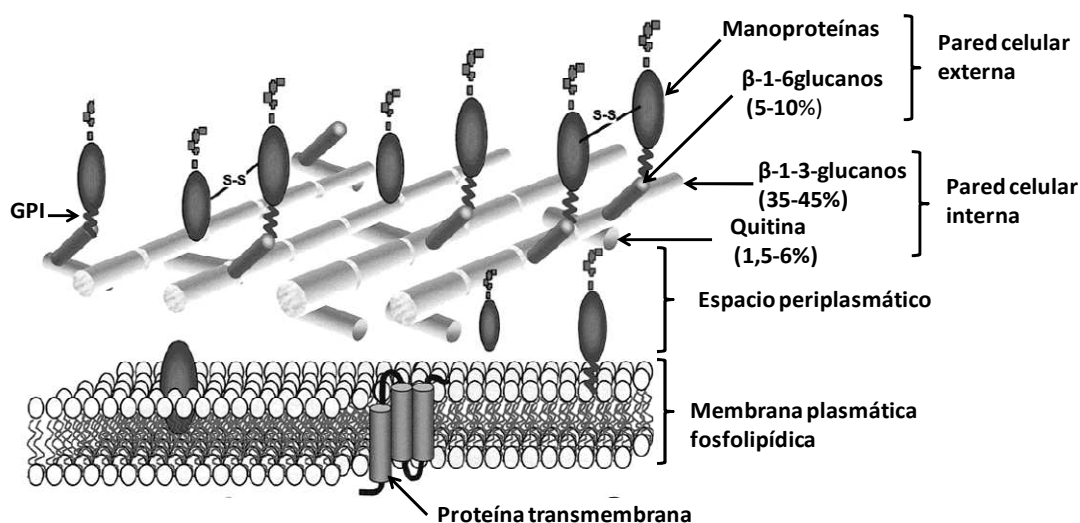


Figura 8.Esquema de la envoltura celular de las levaduras (Molina y col., 2000). Se indica el porcentaje en peso de cada componente (Klis y col., 2006).

Las funciones de la pared celular son diversas (Klis y col., 2006):

- Estabilización de las condiciones osmóticas internas.
- Protección contra el estrés físico, tanto desde el punto de vista osmótico como mecánico, proporcionando rigidez y elasticidad que permite transmitir y redistribuir las tensiones físicas.
- Mantenimiento de la forma celular, que es una condición previa para la morfogénesis.
- Limitación de la permeabilidad de la célula, contribuyendo a la retención de agua, y a la formación de un microambiente en la región interna de la pared adyacente a la membrana plasmática.

La pared celular de las levaduras está formada por dos capas, una externa que consiste en una envuelta de carácter rígido ligeramente elástica que tiene como misión proteger los elementos que contiene, y está compuesta principalmente por β -1-6 glucanos y manoproteínas, y por otro lado, la capa interna, que actúa como andamio de la exterior. Esta capa interna está formada por una red tridimensional de β -1-3 glucanos y quitina, es transparente y amorfa, y es la responsable de proporcionar el carácter rígido, que

permite mantener la forma de la pared y favorecer la resistencia a los cambios osmóticos y mecánicos (Cid y col., 1995; Aguilar-Uscanga y col., 2005).

La envoltura celular está formada en un 90% por polisacáridos el resto son péptidos y proteínas.

4.2.1.1. Los Glucanos.

Los glucanos representan entre el 30 y 55% del peso seco de la pared de las levaduras. Son junto con las manoproteínas, los compuestos más abundantes en la pared celular.

Están compuestos por unidades de D-Glucosa con uniones β -(1-3) y β -(1-6).

La fracción mayoritaria son los β -(1-3) glucanos que representan entre el 30-45% de la masa seca de la levadura (Klis y col., 2006). Estos glucanos están unidos en la parte externa con moléculas altamente ramificadas de β -(1-6)- glucanos, que representan el 5-10% del peso seco de la levadura, (Klis y col., 2006) su principal función es la organización de la pared celular, ya que actúan como unión flexible formando interconexiones con los β -(1 \rightarrow 3)-glucanos, con la quitina y con las manoproteínas, enlazando estas últimas con la red β -(1 \rightarrow 3)-glucanos (Klis y col., 2002; Lesage y col., 2006).

Estos polisacáridos forman una red amorfa tridimensional que da rigidez y elasticidad a la pared celular favoreciendo la integridad de la célula y dando forma a la levadura.

4.2.1.2. La Quitina.

Este polímero lineal de N-acetil-glucosamina unido covalentemente a la malla de β -1-3 glucanos, sólo representa el 1-2% del peso seco de la célula. Es por lo tanto, un componente minoritario de la pared, aunque su concentración puede aumentar en la

célula como respuesta al estrés (Popolo y col., 1997; Osmond y col., 1999; Valdivieso y col., 2000).

4.2.1.3. Las Manoproteínas.

Las manoproteínas presentan un gran interés desde el punto de vista enológico, ya que, representan el 35% de los polisacáridos totales en vino tinto (Vidal y col., 2003b) y son responsables de la porosidad de la pared y además juegan un papel de filtro selectivo y de protección contra ataques químicos y enzimáticos de tipo glucanasa (Aguilar-Uscanga y col., 2005).

Las manoproteínas son glicoproteínas, amenudo altamente glicosiladas con fracciones de carbohidratos que consiste principalmente en manosa (>90%), glucosa (Guadalupe y col., 2010) y proteínas (<10%) (Vidal y col., 2003b).

Estos compuestos representan entre el 30 y el 50% de la pared celular de la levadura (Klis, 2006). Como se ha descrito anteriormente, están unidas indirectamente a la matriz por la parte más externa, que da lugar a la pared celular externa, por enlaces covalentes con los β -1-6 glucanos y en menor grado también los podemos encontrar unidos directamente a los β -1-3 glucanos (Klis y col., 2002).

Se ha descrito que las manoproteínas pueden ser liberadas por las levaduras en dos momentos distintos. En primer lugar, se liberan por la levadura durante la fase de maceración y fermentación alcohólica del mosto de uva (Vidal y col., 2003b; Ayestarán y col., 2004; Doco y col., 1996). Estas manoproteínas son sintetizadas durante la fermentación siendo la mayor parte excretadas por la célula, ya que no son utilizadas para la formación de pared de celular.

En segundo lugar se liberan durante el envejecimiento de los vinos en presencia sobre lías, y es debida a la acción de las β -1,3 glucanasas, las enzimas responsables de degradar los β -glucanos que forman la pared, liberando las manoproteínas ancladas sobre el β -glucanos. Posteriormente, estas manoproteínas liberadas podrán ser hidrolizadas por las enzimas manosidasas y proteasas, liberando pequeños polipéptidos (Doco y col., 2003).

Estos compuestos tienen un tamaño muy variable de entre 6-800 kDa (Moine-Ledoux y col., 1992; Doco y col., 2003).

La cantidad de manoproteínas liberadas por la levadura depende de la cepa específica de levadura (Vidal y col., 2003b; González-Ramos y col., 2008), las condiciones de elaboración y nutritivas del mosto, y las condiciones de envejecimiento (Riberéau-Gayon y col., 2002; Doco y col., 2003).

La estructura molecular de las manoproteínas consisten en una estructura tridimensional basada en un núcleo proteico con dos tipos de cadena glicánicas: cadenas cortas de D-manosas (unidas por enlaces α -(1→2) o α -(1→3)) a la parte proteica a través de residuos de serina o treonina, y el segundo tipo de cadenas, que son largas o polimanosídicas ramificadas que consisten en una cadena principal de α -(1→6) manosa con ramificaciones cortas de residuos de manosa unidos en posición α -(1→2) y con manosas terminales en posición α -(1→3) Estas cadenas polimanosídicas ramificadas están enlazadas en la parte proteica mediante dos unidades de N-acetil-glucosamina, que están unidas a su vez entre sí en posición β -(1→4) y unidas covalentemente a un residuo de asparragina (Pérez -Serradilla, 2008).

En el género *Saccharomyces* la fracción glicánica de las manoproteínas también posee residuos glicosilados de ácido (Jigami y col., 1999; Pérez-Serradilla, 2008).

4.3. Polisacáridos Exógenos.

Además de los polisacáridos que encontramos de forma natural en vino, en la actualidad existen polisacáridos que se adicionan al vino de forma externa con diferentes objetivos. Esto es el caso de la goma arábiga. Este producto se obtiene de un exudado de las cortezas de acacia, típicas de zonas áridas, recogida sobre los troncos donde la corteza fue rasgada. Su componente principal es un polisacárido, si bien también contiene magnesio y potasio en menor proporción. Es por lo tanto, un hidrocoloide constituido de un polisacárido ramificado (arabinogalactano tipo II), asociado a una glicoproteína lo cual revela la presencia de D-galactosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico, L-ramnosa, en cantidades diferentes (Randall y col., 1988). Su uso en enología se debe a su excelente poder estabilizador del vino, gracias a su efecto coloide protector (Anderson,

1978). Aunque también se ha descrito que pueden tener un efecto positivo sobre las características organolépticas de vinos, disminuyendo la sensación de acidez y de astringencia, y mejorando el volumen en boca (Ribéreau-Gayon y col., 1999).

Más recientemente, se ha autorizado el uso de la goma de celulosa (carboximetilcelulosa o CMC), que es un derivado de la celulosa extraído a partir de madera. Su uso fue autorizado por la comunidad Europea en 2009 (RCE 606-2009) como alternativa a los tratamientos tradicionales para la estabilización tartárica de los vinos. Existen múltiples trabajos que demuestran el efecto positivo de la CMC en la estabilización tartárica aunque su mecanismo de funcionamiento aún no se conoce completamente (Greeff y col., 2012; Guise y col., 2014). Por otro lado, se ha demostrado que carece de incidencia sensorial tanto a las concentraciones permitidas como a dosis muy por encima de ellas (Salagoity y col., 2011).

4.4. Interés enológico de los polisacáridos.

Los polisacáridos en general, y las manoproteínas en particular, son en la actualidad un grupo de macromoléculas con gran interés en enología, debido a sus múltiples aplicaciones. Entre las que encontramos la capacidad de contribuir a ciertas características organolépticas y facilitar ciertos procesos tecnológicos. Algunas de estas contribuciones tienen especial importancia como estrategia para paliar carencias del vino debidas a una maduración deficiente, por lo que, podríamos decir, es una estrategia útil, para afrontar algunos de los problemas que comporta el cambio climático en la actualidad y que probablemente se acrecentarán en el futuro. Aunque no todos los polisacáridos que encontramos en el vino tienen el mismo comportamiento, sino que, éste dependerá de su estructura y origen.

Múltiples estudios se han realizado para determinar los efectos sensoriales de estas macromoléculas del vino, y se ha observado un aumento en atributos tales como el volumen y la untuosidad (Vidal y col., 2004), la intensidad y persistencia aromática (Lubbers y col., 1994; Chalier y col., 2007). También se ha observado una disminución de la intensidad de la astringencia (Carvalho y col., 2006).

Otros estudios han observado que los polisacáridos también resultan interesantes en la producción de vinos espumosos, debido su influencia sobre las propiedades espumantes, mejorando la espumabilidad y la estabilidad de la espuma (Moreno-Arribas y col., 2000; Vanrell y col., 2007).

Coelho y col., 2011 observaron una correlación lineal de las manoproteínas que tienen bajo contenido en proteína con la altura máxima de la espuma (HM), mientras que el tiempo de permanencia de la espuma (Ts) aumentaba de manera exponencial.

Otra característica muy importante de los polisacáridos son las múltiples interacciones de estas moléculas con otras existentes en el vino y el efecto cualitativo de estas interacciones. Así por ejemplo, el efecto sobre los compuestos volátiles, anteriormente mencionado, es debido a que estas moléculas parecen tener capacidad de fijación de ciertos compuestos aromáticos. La intensidad de este proceso, está relacionada con las características fisicoquímicas de las manoproteínas (Lubbers y col., 1994), y también con la hidrofobicidad de los compuestos volátiles (Gallardo- Chacon y col., 2010).

Además los polisacáridos en vino blanco tienen especial importancia, porque son agentes estabilizadores contra precipitaciones proteicas (Moine-Ledoux y col., 1992; Dupin y col., 2000). Se ha sugerido que las manoproteínas dificultan la formación de agregados de las proteínas inestables, al competir con las proteínas por unirse a otros componentes no proteicos del vino, los cuales parecen estar involucrados en la quiebra proteica o formación de agregados proteicos insolubles. Esto provoca una disminución del tamaño de partícula por debajo de lo que es capaz de ver el ojo humano (Dupin y col., 2000).

Se ha descrito que el tamaño de los polisacáridos tiene un efecto directo sobre este mecanismo de estabilización (Lomolino y col., 2007).

También se ha descrito su capacidad para favorecer la estabilización tartárica de los vinos (Lubbers y col., 1993). Parece ser que son las manoproteínas de pesos moleculares entre 30-50 kDa altamente glicosiladas las responsables de favorecer la estabilización tartárica (Moine-Ledoux y col., 2002) inhibiendo la cristalización de sales de tartrato (Lubbers y col., 1993; Caridi, 2006). El mecanismo de acción parece que consiste en una inhibición el crecimiento de los cristales de bitartrato potásico lo que

impide su crecimiento y por tanto su precipitación (Lubbers y col., 1993; Moine-Ledoux y col., 1997).

Otra interacción importante en vinos tintos, es la que se produce entre las manoproteínas y glucanos con los compuestos fenólicos del vino. Los efectos positivos de las interacciones son de vital importancia, ya que favorece la estabilización del color, debido a su capacidad de interactuar con taninos y antocianinas inhibiendo su agregación y precipitación (Escot y col., 2001, Palomero y col., 2007). Por otro lado, Riou y col., 2002 y Poncet-Legrand y col., 2007, observaron que en vinos sintéticos algunos polisacáridos de alta masa molecular impedían la agregación de los taninos. Según su hipótesis, los polisacáridos se unirían con las proantocianidinas para dar lugar a agregados más estables, actuando de esta manera como coloides protectores. Esta unión impide la polimerización y precipitación de estos compuestos, pudiendo reducir la astringencia, y aumentar la redondez, la estructura, y el volumen en boca de los vinos (Riou y col., 2002).

Todos estos beneficios descritos tienen un efecto directo en la calidad de los vinos, y pueden ayudar a paliar parte de los efectos negativos que implica la maduración incompleta de la uva, un problema que se ha acentuado en ciertas zonas debido al cambio climático y que se prevé se acentúe en las siguientes décadas. Éste hecho, ha dado lugar a que estas moléculas se hayan convertido en un foco de estudio muy importante en enología, desde el punto de vista de favorecer su extracción de la uva y de las levaduras. Para ello, se han propuesto diversas posibilidades como es la selección de levaduras, la aplicación de técnicas enológicas que favorezcan su liberación en el vino, o el uso de productos que aporten polisacáridos al vino.

5. Las levaduras del vino y su efecto en la calidad final del producto.

En la actualidad, la industria enológica se encuentra sometida a una gran competitividad. Por ese motivo la tecnología y el conocimiento se han convertido en factores claves para lograr una diferenciación del producto y un mejor posicionamiento en el mercado.

En los estudios sobre vino realizados por Pasteur escribía en 1876 “las cualidades del vino depende en gran parte de la naturaleza específica de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación de los mostos. Podemos pensar que si se sometiese un mismo mosto a la acción de levaduras distintas se lograrían vinos de distinta naturaleza”. Esta sentencia magistral, con más de un siglo de antigüedad, se ha convertido en la base de un estudio continuado de las levaduras y su selección, mediante criterios de mejora de la calidad del vino, o con el objetivo de controlar el proceso de vinificación con la finalidad de conseguir productos tipificados por regiones, con escasa variabilidad de unos años a otros, o incluso el diseño estratégico de vinos a medida (Pretorius, 2000).

Durante los últimos 30 años, los estudios se han centrado en la comprensión de la ecología, bioquímica, fisiología y biología molecular de las levaduras implicadas en la fermentación, y en como estas levaduras afectan a la composición química y propiedades sensoriales del producto final (Pretorius, 2000; Fleet, 2003; Swiegers y col., 2005; Renouf y col., 2007; Valero y col., 2007; Fleet, 2008; Cianí y col., 2010; Cordero-Bueso y col., 2013; Brilli, y col., 2014).

Actualmente, los estudios sobre la ecología y las reacciones metabólicas de la levadura, junto con su influencia en la calidad del vino final, se ha acentuado. Aportando a la industria vinícola nuevas herramientas que nos permiten mejorar la calidad final del producto.

Las levaduras seleccionadas se están utilizando desde hace varias décadas con excelentes resultados en muchos países, obteniéndose vinos de calidad más uniformes, que los que se producían con las fermentaciones espontáneas (Fleet y col., 1993) pero a expensas, según algunos productores, de perder complejidad en el vino final. Por ese motivo recientemente se ha estudiado la posibilidad de la utilización de levaduras *No-Saccharomyces* seleccionadas, en cultivos mixtos o mediante inoculaciones secuenciales. El propósito es beneficiarse de esa mayor complejidad que aporta la sucesión de diferentes levaduras a lo largo de la fermentación espontánea pero sin ninguno de sus posibles inconvenientes o riesgos.

5.1. Fermentación alcohólica

La vinificación es un proceso microbiológico y bioquímico complejo donde intervienen e interaccionan levaduras, bacterias y otros microorganismos (Fugelsang y col., 2007). En este proceso, las levaduras desempeñan un papel fundamental, ya que son las responsables del proceso metabólico principal que se lleva a cabo, la fermentación alcohólica, una vía catabólica que implica la transformación de las hexosas, en particular glucosa y fructosa presentes en el mosto, en etanol, dióxido de carbono y otros productos secundarios.

Complementariamente a la fermentación alcohólica también tiene lugar la fermentación glicéropirúvica que origina glicerol y también otras reacciones secundarias que son de gran importancia por sus aportaciones cualitativas al vino, ya que, pueden favorecer la producción de esteres y alcoholes superiores o perjudicar con la producción de ácido acético, ácido sulfhídrico o acetato de etilo en el producto final (Suárez y col., 2004).

Existen múltiples estudios sobre aislamiento de levaduras en uva, mosto y durante la fermentación, e incluso en los equipos de bodega, que nos aportan información sobre estos procesos y la influencia que tienen las levaduras y la sucesión de estas en la fermentación (Regueiro y col., 1993; Pretorius y col., 1999; Torrija y col., 2001; Sabaté y col., 2002; Renouf, y col., 2007; Urso y col., 2008; Ocón y col., 2010). En la actualidad más de veinte géneros de levaduras han sido identificados a partir del mosto y/o del vino (Renouf y col., 2007). Además de esta diversidad de especies, también es importante señalar la gran biodiversidad que hay dentro de cada especie (Vezinhet y col., 1992; Versavaud y col., 1995; Sabaté y col., 1998; Schuller y col., 2005; Sipiczki, 2006; Valero y col., 2007).

La diversidad, composición y evolución de la microbiota en el mosto dependen de diferentes factores, tales como; la variedad y la madurez de la uva, la edad de la viña (Martini y col., 1980; Rosini y col., 1982; Martínez y col., 1989; Polsinelli y col., 1996; Hierro y col., 2006), los tratamientos de pesticidas (Bureau y col., 1982; Pretorius y col., 1999), el desarrollo de hongos, el ataque de insectos o pájaros (Longoy col., 1991; Goddard, M.R y col., 2010), la localización geográfica (Gayevskiy y col., 2012), las condiciones climáticas (temperatura, lluvias, etc.) (Brilli y col., 2014), las técnicas de recolección, las condiciones en vinificación y las practicas enológicas (Fleet y col.,

1984; Parish y col., 1985; Querol y col., 1990; Longo y col., 1991; Brillì y col., 2014; Albertin y col., 2014).

Otros factores son también importantes, como es el contacto de las uvas con el mosto durante la cosecha, el transporte (Boulton y col., 1996) el proceso de vinificación, y el contacto con las superficies y los equipos de bodega (Fleet y col., 1993; Regeiro y col., 1993, Beltran y col., 2002; Sabaté y col., 2002).

La presencia, extensión y persistencia de esta diversidad de especies de levaduras durante la fermentación alcohólica, puede influir en la composición del medio y por tanto en el comportamiento metabólico de la principal levadura responsable de la fermentación, *Saccharomyces cerevisiae*. Todo ello puede modificar la producción de compuestos aromáticos con gran impacto en el vino final.

Para llevar a cabo la fermentación alcohólica del mosto, existen dos posibilidades, realizarla de manera natural (fermentación espontánea), donde se deja evolucionar la propia microbiota del mosto. La segunda posibilidad, es lo que se conoce como, fermentaciones inoculadas o inducidas, donde se potencia la imposición de una determinada cepa de levadura inoculada, normalmente *Saccharomyces cerevisiae*.

5.1.1. Fermentaciones Espontáneas

Tradicionalmente, la fermentación alcohólica en vino se realizaba de manera espontánea, mediante las levaduras que se encontraban en las uvas, o en los equipos de bodega, sin ningún tipo de inoculación externa. Por lo que no se trataban del producto de la acción de una única especie o cepa de levadura, sino una sucesión de especies y cepas de levaduras diferentes a lo largo de la fermentación.

Numerosos autores han estudiado los cambios cuantitativos y cualitativos de especies, durante la fermentación alcohólica (Heard y col., 1985; Schütz y col., 1993; Guillamón y col., 1998; Esteve-Zaroso y col., 2001; Torrija y col., 2001; Beltrán y col., 2002; Hierro y col., 2006; Urso y col., 2008), y han observado que generalmente la fermentación alcohólica comienza con la sucesión de especies de levaduras pertenecientes a los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*,

Pichia, *Torulaspora*, y *Zygosaccharomyces*. (Según Clemente-Jiménez y col., 2004) en la primera fase de la fermentación alcohólica suele aparecer *Kloeckera* y *Candida*, posteriormente aparecen *Metschnikowia*, *Pichia* y ocasionalmente observamos la aparición de *Bretanomyces*, *Klueyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Rhodotorula* y *Zygosaccharomyces*, El crecimiento de estas especies conocidas como levaduras No-*Saccharomyces*, se limita a los primeros 2 o 3 días de fermentación, en los que alcanzan poblaciones máximas de 10^7 CFU/mL (Fleet y col., 1984; Heard y col., 1985) después de lo cual, reducen su población dando paso al crecimiento de otras especies con alta capacidad fermentativa como es el caso de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Además algunas técnicas de vinificación favorecen la imposición de *S. cerevisiae*, como es la adición de dióxido de azufre en uva o mosto, con el objetivo de controlar las reacciones de oxidación, pero que también limita la población de levaduras indígenas que no son tan resistentes a este compuesto como lo es *S. cerevisiae* (Constantí y col., 1998).

Este cambio en las poblaciones de levaduras está vinculado a la creciente presencia de etanol, las condiciones anaeróbicas en las que se da la fermentación, la concentración de azúcar y la mayor tolerancia a la temperatura que muestra *S.cerevisiae* en comparación con otras especies de levadura (Fleet y col., 1993; Fleet, 2008). Por ese motivo, *S. cerevisiae* es considerada la principal especie responsable de las fermentaciones alcohólicas (Ribéreau-Gayon, 1985), ya que su capacidad de adaptación al entorno específico del vino y su activo estado de crecimiento le dan una gran ventaja competitiva respecto al resto de levaduras (Cray y col., 2013).

Pese a esto, se ha demostrado que la cantidad de biomasa producida por las levaduras no-*Saccharomyces* durante las primeras fases es suficiente para tener un cierto impacto en la composición del vino (Fleet y col., 1984; Heard y col., 1985).

Por ese motivo, en la actualidad, se ha estudiado ampliamente la sucesión de especies, y su efecto en la calidad del vino final. Se ha observado, que en algunos casos, esta sucesión tiene un efecto negativo para la calidad del producto final, tanto en su aspecto aromático como en lo que a otros componentes del vino se refiere, Así, por ejemplo, se ha observado que algunos géneros tienen capacidad de producir una mayor

concentración de ácido acético (Ciani y col., 1998; Freer, 2002), y de acetoina (Ciani y col., 1998). También en otros géneros se ha observado la capacidad de producir más cantidad de acetato de etilo (Ciani y col., 1998; Mateo y col., 1991; Domizio y col., 2011) o etil-fenoles (Chatonnet y col., 1992).

Por otro lado, la sucesión de especies también puede tener efectos positivos en la calidad del vino final, ya que, se ha observado un aumento de la complejidad de los vinos, debido a la secreción de enzimas extracelulares y metabolitos, los cuales parecen tener impacto en la concentración de aromas primarios y secundarios (Todd y col., 1995; Maturano y col., 2012).

También se ha estudiado la capacidad de sintetizar glicerol (Ferraro y col., 2000; Bely y col., 2008; Medina y col., 2013) y liberar polisacáridos al medio (Giovani y col., 2012; Domizio y col., 2011).

El efecto en el perfil aromático del vino, también ha sido ampliamente estudiado, y se ha observado que el uso de algunas cepas, puede favorecer la disminución de la concentración de acetaldehído (Bely y col., 2008), o disminuir la acidez volátil (Ciani y col., 1998; Henick-kling y col., 1998; Bely y col., 2008; Contreras y col., 2014), además algunas tienen capacidad para extraer una mayor concentración de tioles varietales (Anfang y col., 2009; Zott y col., 2011), y en otros casos, la capacidad para aumentar los ésteres del vino (Jolly y col., 2003; Contreras y col., 2014).

Los distintos estudios han demostrado que los efectos son positivos o negativos en función de las cepas de especies y géneros que se desarrollen, por lo que, el control de las mismas es algo imprescindible para obtener un vino final de calidad. Por esta razón, la mayor parte de las bodegas suelen añadir dióxido de azufre en el mosto, y utilizan los inóculos comerciales de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, con la finalidad de evitar el crecimiento indeseado de algunos de estos microorganismos, y así, lograr el control de la fermentación alcohólica, asegurando de esta manera la calidad del vino final

5.1.2. Uso de inóculos comerciales de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* Fermentación inducida

El inóculo de las levaduras secas activas provoca una rápida implementación de la cepa de *S. cerevisiae* inoculada, permitiendo controlar el crecimiento microbiológico y consiguiendo un inicio más rápido de la fermentación, y así disminuir los posibles problemas de fermentación, hecho, que no siempre es posible en fermentaciones espontáneas.

Estos inóculos son ampliamente utilizados en la industria, tanto en nuevos países productores de vino (Estados Unidos, Sudáfrica, Australia, Chile y Argentina) como en países más tradicionales (Francia, España e Italia) (Reed y col., 1988; Fleet y col., 1993).

Existen más de 200 cepas de levaduras seleccionadas en el mercado. Los criterios para la selección y desarrollo de levaduras para la vinificación han sido ampliamente estudiados (Degré y col., 1993; Rainieri y col., 2000; Pretorius y col., 2002). Estas cepas son seleccionadas basándose en diferentes criterios, por un lado, en función de las características deseables o indeseables en la cepa de levadura, y por otro, en función de sus propiedades tecnológicas y cualitativas, por lo que también pueden ser útiles para mejorar la calidad de los vinos cuando se trabajan con uvas poco maduras fenolicamente o por lo contrario con uvas con excesiva graduación alcohólica. En la tabla 1 se muestran algunos de los criterios más utilizados en la selección de levaduras para el uso comercial (Bisson y col., 2009). Aunque en función del producto a obtener las características pueden variar.

También existe la posibilidad de seleccionar inóculos puros de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* que procedan de la zona vitivinícola donde se van a utilizar, lo que se conoce como *levaduras locales seleccionadas*. Estas levaduras son específicas de un área determinada y se suele considerar que están totalmente adaptadas a las condiciones climáticas y a las variedades viníferas de la zona en que fueron aisladas. Este criterio de selección permitiría teóricamente fermentaciones más seguras en mostos de la zona concreta y además de conseguir vinos de mayor tipicidad (Martín y col., 1990).

Tabla 1. Criterios de selección de cepas comerciales.

Deseables	Indeseables
<p><i>Propiedades cualitativas</i></p> <p>Producción de aromas frutales y esteres positivos. Producción de β- glucosidasas Producción de glicerol Producción de manoproteínas</p> <p><i>Propiedades tecnológicas</i></p> <p>Total degradación de los azúcares fermentables Alta tolerancia al etanol Resistencia al SO_2 Máxima reducción de la fase de latencia. Capacidad fermentativa a baja temperatura. Capacidad fermentativa a alta temperatura Capacidad fermentativa a altas presiones Fenotipo Killer Facilidad de secado.</p> <p><i>Aplicaciones Especiales</i></p> <p>Degradación del ácido málico Formación de ácido láctico Formación de isoamilacetato Rápido autolisado Propiedades de aglomeración Propiedades de sedimentación</p>	<p><i>Propiedades cualitativas</i></p> <p>Producción de H_2S Producción de SO_2 Producción de compuestos azufrados Producción de acidez volátil y acetato de etilo. Producción de acetaldehído y piruvato. Formación de precursores de cabamato de etilo. Formación de polifenol oxidasas. Producción de aminas biogenas.</p> <p><i>Propiedades tecnológicas</i></p> <p>Producción de espuma. Formación de velo.</p>

Los criterios de selección de las levaduras seleccionadas a utilizar en una determinada fermentación varían en función del tipo de vinificación a elaborar y sus peculiaridades tecnológicas, aunque para todos los casos la posibilidad de secado es quizás uno de los criterios tecnológicos a tener más en cuenta, porque facilita y prolonga su conservación. En vinos blancos los criterios de selección están enfocados en lograr vinos con características de frescura y juventud, y sobre todo que potencien la producción y conservación de aromas. Específicamente los criterios más comunes son:

- La tolerancia a bajas temperaturas, ya que normalmente estas fermentaciones se realizan a 14-18 °C, para conservar mejor los aromas, y evitar la oxidación.

- La potenciación de aromas varietales y/ o aromas secundarios y evitar la aparición de aromas no deseados tales como acetato de etilo, compuestos azufrados entre otros.
- La capacidad de acidificación o desacidificación mediante la producción o degradación de ácido málico.
- La mejora de la estructura del vino; en este aspecto se tendrá en cuenta la capacidad de producción de glicerol que confiere al vino una mayor suavidad y untuosidad.
- Correcto comportamiento celular en medio líquido, de tal manera que se facilite una fermentación regular con una baja o discreta formación de espuma.
- La emisión de polisacáridos de la pared (Boivin y col. 1998) que influyen en la suavidad del vino, estabilizan el color, y fijan sustancias aromáticas como la β -ionona o los esteres etílicos de ácidos grasos saturados.(Lubbers y col. 1994).

En la producción de vinos tinto, existen criterios de selección de levaduras similares a los de los vinos blancos, como es el caso de la capacidad de producción de glicerol, la potenciación de aromas varietales y/o secundarios, o la liberación de polisacáridos de la pared. Pero también aparecen criterios nuevos, debido a que los criterios de calidad también varían;

- El color es uno de los criterios de calidad más importantes en el vino tinto, por lo que, se debe tener en cuenta la capacidad de producción por parte de la levadura de acetaldehído y ácido pirúvico, ya que, participan en la síntesis de vitisina A y B (Vivar-Quintana y col., 1999; Romero y col., 2001; Morata y col., 2003). Este criterio es especialmente relevante en los vinos destinados a crianza por la menor velocidad de degradación que presentan estas moléculas (Mateus y col., 2001) y la importancia que tienen en el color de los vinos envejecidos (Alcalde-Eon y col., 2006; Rentzsch y col., 2010). Además se buscan levaduras con una absorción mínima de antocianos por las paredes celulares y con actividades enzimáticas que favorezcan la extracción de materia colorante de la uva.

- En algunos casos, otro criterio de selección es la degradación del ácido málico (con la finalidad de prescindir o disminuir la necesidad de la posterior fermentación maloláctica.)
- Resistencia al estrés fermentativo, esto tiene especial interés en uvas con alta concentración de azúcares, que se dan en algunas zonas como Priorat o Jumilla, debido precisamente a la recolección de uva sobre madura para garantizar su madurez fenólica.

Los criterios para seleccionar las levaduras en vinos espumosos son distintos. En un vino espumoso, el CO₂ procede de una segunda fermentación, es decir, tiene origen endógeno.

Éste CO₂ proviene de la fermentación de la sacarosa o del mosto concentrado rectificado añadidos a vinos secos, o de los azúcares residuales, y se consigue tecnológicamente con tres métodos de elaboración: Método clásico o tradicional (Champagne, Cava y otros), método ancestral (Blanquette de Limoux y otros) método Charmat o Cuvée close (Prosecco y otros). Siendo el primero de ellos el más interesante, el de mayor relevancia, ya que es el que se emplea en la elaboración de los vinos espumosos de mayor prestigio a nivel mundial.

En el método tradicional, la segunda fermentación consiste en embotellar el vino base añadiendo un “licor de tiraje” que es una mezcla de vino blanco, azúcar y levaduras previamente adaptadas al medio. Estas levaduras al fermentar producirán el dióxido de carbono responsable de la efervescencia del vino espumoso y además incidirán en muchos otros atributos sensoriales, por lo que, la incidencia de las levaduras del tiraje es particularmente notable, y permiten adquirir unas peculiares cualidades organolépticas. También tendrán especialmente importancia las levaduras que se utilicen para fermentar el vino base, ya que, las características organolépticas de este tendrán una influencia directa en las características del producto final (Vanrell y col., 2007).

Posteriormente a la segunda fermentación o toma de espuma, se lleva a cabo la crianza. Las botellas se dejan en reposo en posición horizontal, en oscuridad y quietud y a una temperatura constante de unos 15°C.

Para eliminar los restos de levaduras e impurezas se hace la operación de removido que se lleva a cabo situando las botellas inclinadas en pupitres inclinados, girando la botella un octavo de vuelta al mismo tiempo que se aumenta la inclinación y el objetivo es acumular los sedimentos al borde del tapón. Para facilitar esta operación es preciso añadir un coadyuvante de tiraje que permite un mejor deslizamiento de los posos hacia el cuello de la botella. Existen diversas formulaciones de estos coadyuvantes de tiraje si bien todos ellos contienen bentonita.

Cuando la botella está “en punta”, totalmente invertida, se hace el proceso de degüelle, Según el proceso artesanal, se destapa la botella dejando salir una pequeña cantidad de espuma que expulsa el depósito de levaduras y coadyuvante de tiraje. Hoy en día, esta operación se realiza mediante la congelación del cuello de la botella. Al destaparla se dispara el bloque de hielo del cuello con los sedimentos atrapados en él.

En este contexto, para este tipo de producto, los criterios más utilizados en la selección de levaduras serán los siguientes:

En la producción de vino base también se tendrán en cuenta criterios similares a los requeridos en vinos blancos, con la excepción, en este caso, que la producción de espuma será valorado positivamente, así como la capacidad de liberar mediante la autólisis compuestos espumantes como polisacáridos, aminoácidos, o proteínas (Andrés-Lacueva y col., 1996; Moreno- Arribas y col., 2000).

En la realización de la segunda fermentación los criterios más comunes a tener en cuenta serán los siguientes:

- Capacidad para producir etanol en un medio alcohólico (vino base), acompañada de la resistencia a concentraciones elevadas de etanol y de una actividad fermentativa regular.
- Resistencia a altas presiones, con la finalidad de lograr acabar una segunda fermentación en botella.
- Aptitud para el removido, conseguido mediante la capacidad de floculación y sedimentación, con una escasa adherencia al vidrio.
- La velocidad de autólisis celular. Cuando termina la segunda fermentación se inicia un lento proceso de autodegradación celular que enriquece el vino

espumoso en diversos compuestos, que mejoran notablemente la calidad de su espuma, sus aromas y su textura. Por lo que una mayor velocidad en el autolisado puede favorecer que en una crianza más corta se obtenga un producto más enriquecido.

Por lo tanto, la selección de inóculos de fermentación puede ser una estrategia de gran importancia, para asegurar una correcta fermentación alcohólica, obtener un producto de una calidad mayor y más uniforme a lo largo de las diferentes campañas (Ribéreau-Gayon, 1985; Fleet y col., 1993).

5.2. Levaduras No- *Saccharomyces*.

El termino No-*Saccharomyces* es un término coloquial utilizado entre los microbiólogos del vino y la industria enológica, que incluye muchas especies de levaduras diferentes. Estas levaduras son ascomicetos o basidiomicetos que se reproducen por gemación o fisión y que no forman sus estados sexuales dentro de un cuerpo fructífero (Kurtzman y col., 2011). Tratados de taxonomía recientes reconocen 149 géneros de levaduras que comprenden casi 1500 especies (Kurtzman y col., 2011). Entre estos, más de 40 especies han sido aisladas de uvas (Ciani y col., 2010).

En los estudios de aislamiento e identificación de levaduras vínicas, en la bibliografía se pueden encontrar diferentes nomenclaturas. Así, hay estudios en los que aparecen tanto las formas anamórficas como las teleomórficas de una misma especie de levaduras.

Afortunadamente, y gracias al análisis del ADN, se han homogeneizado los criterios, siendo más fiables, y proporcionando grandes aportaciones a la taxonomía moderna. Algunas de las levaduras No-*Saccharomyces* más comúnmente encontradas en mosto y vino son las que se encuentran en la tabla 2 donde se especifica la forma teleomórfica y sus homólogos anamórficos, así como sinónimos de algunas reclasificaciones realizadas.

Tabla 2. Telemórfos, anamórfos y sinónimos (Kurtzman y col., 2011) de algunas de las levaduras No-*Saccharomyces* reportados en las uvas y en las fermentaciones de vino (Jolly y col., 2006; Ciani y col., 2011; Tofalo y col., 2012).

Forma Telemórfica	Forma Anamórfica	Sinónimos
<i>Citeromyces matritensis</i>	<i>Candida globosa</i>	<i>Hansenula matritensis</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida famata</i>	<i>Pichia hansenii</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	<i>Brettanomyces intermedius</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Kloeckera Apis</i>	
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	<i>Kloeckera javanica</i>	
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<i>Kloeckera corticis</i>	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Pseudosaccharomyces corticis</i>
<i>Hanseniaspora vineae</i>	<i>Kloeckera africana</i>	<i>Pseudosaccharomyces africanus</i>
<i>Lachancea kluyveri</i>		<i>Saccharomyces kluyveri</i>
<i>Lachancea thermotolerans</i>		<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> ; <i>Candida dattlia</i>
<i>Metschnikowia Pulcherrima</i>	<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Torulopsis pulcherrima</i>
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>Millerozyma farinosa</i>		<i>Pichia farinosa</i>
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Candida lambica</i>	<i>Mycoderma lambica</i>
<i>Pichia kluyveri</i>		<i>Hansenula kluyveri</i>
<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Candida valida</i>	
<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Candida sorbosa</i>	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
<i>Pichia terricola</i>		<i>Issatchenkia terricola</i>
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>		
<i>Starmerella bombicola</i>	<i>Candida bombicola</i>	<i>Torulopsis bombicola</i>
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Candida colliculosa</i>	<i>Saccharomyces roseii</i>
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Pichia anomala</i> ; <i>Hansenula Anómala</i>
<i>Zygoascus meyeræ</i>	<i>Candida helenica</i>	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>		<i>Saccharomyces bailii</i>
	<i>Candida zemplinina</i>	Posiblemente <i>Candida stellata</i> en literatura antigua.
	<i>Candida stellata</i>	<i>Torulopsis stellata</i>

Estas levaduras se encuentran en las primeras fases de fermentación, y su papel en la producción de vino ha sido y continua siendo ampliamente debatido (Fleet y col., 1984; Heard y col.,1985; Longo y col., 1991; Romano y col., 1992; Gil y col.,1996; Lema y col., 1996; Henick-Kling y col., 1998; Lambrechts y col., 2000; Rementeria y col., 2003; Fleet, 2003; Combina y col., 2005; Varela y col.,2009; Ciani, 2011; Cordero-Bueso y col., 2013).

5.2.1. Reevaluación de las levaduras *No-Saccharomyces*.

Inicialmente se asociaba la aparición de especies de levadura *No-Saccharomyces* a posibles defectos en el vino final, debido a que eran relacionadas con problemas microbiológicos en la producción de vino (Van der Walt y col., 1958; Le Rouxy col., 1973). Aunque se conocía que algunas levaduras *No-Saccharomyces* podían producir metabolitos beneficiosos para la calidad del vino (Castor, 1954; Amerine y col., 1960; Van Zyl y col., 1963), esto se vio compensado por la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios con incidencia negativa sobre la calidad del vino, como es el aumento de la producción del ácido acético. Por ese motivo se les considero cómo levaduras alterantes (Castor, 1954; Van Zyl y col., 1963; Romano y col., 1992; Chatonnet y col., 1995).

Contrariamente, algunos productores que realizaban fermentaciones espontáneas (que comprende el dominio mixto y secuencial de levaduras *No-Saccharomyces* y *Saccharomyces*) observaban que las levaduras indígenas daban tipicidad a sus vinos, aunque conllevaban mayor riesgo de deterioro del vino, se consideraban que aumentaban la complejidad, la sensación en boca (textura) y la integración de sabores relativos a los vinos inoculados (Heard y col., 1985; Bisson y col., 1991; Gil y col., 1996.; Lema y col., 1996; Heard, 1999; Soden y col., 2000; Varela y col., 2009).

Las diferentes opiniones y resultados obtenidos han provocado que, desde hace algunos años se haya reevaluado la aportación de estas levaduras al producto final, mediante el uso de cultivos iniciadores de estas levaduras.

Estos estudios han observado que algunas de estas especies afectan significativamente tanto en composición química como en características sensoriales, creando un producto más tipificado y más complejo, favoreciendo en algunos casos la calidad del producto

final (Egli y col., 1998; Pretorius, 2000; Romano, 2003; Swiger y col., 2005; Fleet, 2008).

Así, por ejemplo, se ha observado que algunas levaduras No-*Saccharomyces* son capaces de sintetizar una mayor cantidad de esteres de acetato en comparación con *Saccharomyces cerevisiae* (Lema y col., 1996; Rojas y col., 2003).

Los géneros *Rhodotorula* y *Pichia* han sido descritos como productores de acetato de isoamilo (Suomalainen y col., 1979; Rojas y col., 2001) mientras que las diferentes especies del género *Hanseniaspora* son descritas como altas productoras tanto de acetato de 2-feniletilo como de acetato de isoamilo (Moreira y col., 2008; Plata y col., 2003; Rojas y col., 2001,2003). Más recientemente, se ha observado que la inoculación secuencial de *Wickerhamomyces anomalus* (anteriormente clasificada como *Hansenula anomala*) también presentan un aumento en la producción de acetatos y esteres de etilo; además de una disminución de ácidos grasos y alcoholes superiores (Izquierdo y col., 2014). Igual ocurre en la inoculación secuencial con *H. guilliermondii* (Lage y col., 2014) y con la inoculación de *H. vineae* (Medina y col., 2013). Éstos esteres también juegan un papel importante en la calidad aromática de los vinos jóvenes, ya que aumentan los aromas frutales.

Por otro lado, se ha descrito la capacidad de algunas cepas para disminuir la producción de ácido acético en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* (Sadineni y col., 2012; Contreras y col., 2014). También se ha descrito, la capacidad de producir mayores cantidades de glicerol por algunas especies de estos géneros (Medina y col., 2013; Contreras y col., 2014). El glicerol tiene un impacto importante en la calidad del vino, ya que es el componente cuantitativamente más importante del vino después del agua y del etanol y al que se le atribuyen caracteres de suavidad, aterciopelado y aumento del dulzor (Noble y col., 1984).

Recientemente (Contreras y col., 2014; Quirós y col., 2014) muestra como cepas de levaduras No-*Saccharomyces*, más específicamente *Metchnikowia pulcherrima* puede reducir la concentración de etanol en el vino final.

Otra de las características que se ha observado que difieren entre las levaduras No-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*, es la producción de enzimas extracelulares tales como esterasas, glicosidasas, lipasas, β - glucosidasas, proteasas y celulasas, siendo más

importantes en el caso de las levaduras *No-Saccharomyces*. (Dizy y col., 2000; Strauss y col., 2001).

El aporte de enzimas por las levaduras tiene especial interés, porque las enzimas degradan la estructura de la uva, influyendo positivamente en algunas fases de la elaboración de vino, como son la maceración, clarificación y filtración. Además aumentan el rendimiento de la extracción del color, mejoran el aroma, y participan en la estabilización del vino (Charoenchai y col., 1997; Strauss y col., 2001).

De esta manera, se ha observado que la degradación de los polisacáridos estructurales de la uva por carbohidrolasas (incluyendo pectinasas, celulasas y amilasas) (Colagrande y col., 1994; Esteve-Zarzoso y col., 1998; Van Rensburg y col., 2000; Jayani y col., 2005; Louw y col., 2006) facilita la liberación de precursores aromáticos de las células de la piel, semillas y pulpas de la baya (Ganga y col., 2001; González y col., 2004; Bautista-Ortín y col., 2007). Las β -glucosidasas son hidrolasas capaces de desenmascarar compuestos aromáticos a partir de precursores no volátiles del vino (Charoenchai y col., 1997; Esteve-Zarzoso y col., 1998; Fernández y col., 2000; Blasco y col., 2006).

Se ha observado que los géneros *Hanseniaspora* y *Torulaspota* son buenos productores de enzimas como las β -glucosidasas, pectinasas, proteasas y las que participan en la degradación del xilano (Charoenchai y col., 1997; Ganga y col., 2004; Masoud y col., 2006; Romo-Sánchez y col., 2010; Pérez y col., 2011). Sin embargo, la secreción de cada enzima no es característico de cada género o especie, sino que depende de la cepa de levadura (Ganga y col., 2004). Además también se ha observado que las condiciones del medio afectan a la actividad enzimática de las levaduras. Así, los parámetros de pH, temperatura o la presencia de azúcares y etanol pueden afectar a dicha actividad (Rosi y col., 1994; Manzanares y col., 1999; McMahan y col., 1999; Hernández y col., 2002; Cordero-Otero y col., 2003; Barbagallo y col., 2004; Jurado y col., 2004).

Maturano y col., 2012 mostraron que los cultivos mixtos de levaduras, o inoculación secuencial de levaduras *No-Saccharomyces* y *Saccharomyces* también tenían un efecto positivo en la producción de enzimas.

Además, Lambrechts y col., 2000, observo que la producción de compuestos indeseables por las levaduras No-*Saccharomyces* dependía de la cepa de levadura, esto hizo pensar que con ayuda de un buen programa de selección, se podría seleccionar las levaduras más apropiadas para realizar una fermentación secuencial controlada.

Por ese motivo se ha seguido estudiando cómo controlar la evolución de estas levaduras en vino con el objetivo de garantizar el crecimiento de aquellas que son beneficiosas para la calidad del producto final, intentando inhibir la aparición de organismos indeseables y asegurando un final correcto de la fermentación.

5.2.2. Uso de inóculos comerciales de levaduras no-*Saccharomyces* como una alternativa a la vinificación tradicional.

En la actualidad y como una alternativa a la fermentación espontánea se ha empezado a utilizar los inóculos comerciales de levaduras No-*Saccharomyces*.

El uso de estos inóculos permite realizar una inoculación secuencial controlada, dónde inicialmente se introduce una levadura No-*Saccharomyces* seca y seleccionada, y pasado un periodo de tiempo, que difiere en función de la levadura utilizada, introducimos un inóculo de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este proceso permite beneficiarse de las características positivas de las levaduras No-*Saccharomyces* controlando su evolución y combinarlas con las ventajas de las fermentaciones inducidas, ya que, posteriormente se introduce un inóculo importante de levadura seca activa de *Saccharomyces cerevisiae*, que nos asegura que la fermentación alcohólica se lleve a cabo con éxito.

Aunque la propuesta de cultivos iniciadores mixtos es una de las tendencias actuales dentro de la biotecnología enológica, a mediados del siglo pasado se propuso esta estrategia para controlar la acidez de los vinos (Rankine, 1966; Snow y col., 1979; Magyar y col., 1989). En la actualidad se ha confirmado la viabilidad de esta estrategia para reducir la acidez volátil mediante el empleo de cultivos mixtos de *T. delbruekii* y *S. cerevisiae*, tanto en inoculación conjunta como secuencial. También se ha observado capacidad de desacidificación de ácido málico mediante la inoculación secuencial de

Schizosaccharomyces pombe y *S. cerevisiae* (Snow y col., 1979; Silva y col., 2003) o mediante el cultivo mixto de *Issatchenkia orientalis* y *S. cerevisiae* (Kim y col., 2008).

Otro aspecto de gran interés es la corrección de la baja acidez en algunos mostos. Este efecto puede ser corregido mediante el uso de cultivo mixto *K. thermotolerans* y *S. cerevisiae* (Kapsopoulou y col., 2007).

Una de las levaduras más evaluadas para su utilización como iniciador de fermentación es *Candida stellata*, debido a su capacidad para producir glicerol, y su capacidad de sintetizar compuestos volátiles que dan una mayor complejidad aromática (Ciani y col., 1998; Romano y col., 2003; Ciani y col., 2006) Resultados similares también han sido descritos por Toro y col., 2002 empleando *C.cantarelli* en cultivos mixtos.

Otros estudios han puesto de manifiesto el interés de llevar a cabo fermentaciones mixtas para aumentar la fracción aromática de los vinos. Es el caso de García y col., 2002 que propusieron el empleo de un cultivo mixto de *Debaryomyces vanriji* y *S. cerevisiae* para incrementar terpenos, especialmente el geraniol en vino elaborado con la variedad moscatel. También se ha propuesto la cofermentación *Pichia kluyveri* y *S. cerevisiae* para incrementar tioles varietales en Sauvignon Blanc (Anfang y col., 2009).

El uso de *T. delbruekii* en inoculación secuencial está siendo ampliamente estudiado en la actualidad. Esta levadura se utiliza para la fermentación de mostos de baja concentración de azúcar y acidez, y se ha utilizado en vinos tintos y rosados en Italia, y en Sauvignon blanc en Sudáfrica con buenos resultados (Castelli, 1955), además también se ha utilizado en inoculación secuencial para la fermentación de vinos botrytizados por su capacidad antes mencionada de disminuir la acidez volátil de vino (Bely y col., 2008).

Los diversos estudios han comprobado que es capaz de reducir la acidez volátil en un 53% y de un 60% en la producción de acetaldehído respecto a cultivos puros de *S. cerevisiae* (Bely y col., 2008), además, se ha observado que la fermentación secuencial con *T. delbruekii* y *S. cerevisiae* aumenta la concentración de glicerol (Sadineni y col., 2012; Contreras y col., 2014), También se ha observado que esta levadura tiene mayor capacidad de producción de polisacáridos (Giovani y col., 2012; Domizio y col., 2014) que *S. cerevisiae*, y una alta actividad β - glucosidasa (Bely y col., 2008).

Otra levadura que está adquiriendo interés en la industria enológica es *M. pulcherrima*, está siendo ampliamente estudiado el uso de esta levadura tanto en cultivos puros como mixtos y en inoculaciones secuenciales. Se ha observado que tiene capacidad de mejora del perfil aromático del vino, debido a su alta actividad β -glucosidasa y el incremento en la producción de ácidos grasos de cadena media, hexanol, 2-feniletanol, y acetato isoamílico (Zohre y col., 2002; Jolly y col., 2003). También se ha observado capacidad de reducir la acidez volátil en inoculación secuencial (Comitini y col., 2011; Sadineni y col., 2012). Otra aplicación más reciente es para reducir el grado alcohólico e incrementar la concentración de glicerol (Contreras y col., 2014). Por otro lado, se ha observado que esta levadura tiene la capacidad de producir una toxina llamada *ácido pulcherrimo* que afectaría a todas las bacterias y levaduras excepto a *Saccharomyces cerevisiae* (Oro y col., 2014). Este hecho abre la puerta al uso de esta levadura como antiséptico, permitiendo disminuir el uso de dióxido de azufre en mosto.

Aunque existen múltiples estudios sobre el uso secuencial y mixto de estas levaduras junto con *Saccharomyces cerevisiae* y sus efectos en vino tinto y blanco, la aplicación de estas levaduras en vino base para la producción de vino espumoso no ha sido estudiada.

6. Introducción a la crianza sobre lías y nuevas alternativas.

Ha sido ampliamente estudiado, como algunas técnicas de vinificación basadas en el envejecimiento sobre lías del vino, mejoran ciertas propiedades organolépticas, así como, estabilizando el color, disminuyendo la degradación de aroma, aumentando el equilibrio en boca y el volumen o disminuyendo la astringencia, entre otros. Por lo que, puede ser una opción para paliar algunos efectos generados por el cambio climático en la madurez de la uva. Los compuestos liberados durante la autólisis de la levadura especialmente péptidos, aminoácidos, esteres etílicos y polisacáridos (manoproteínas) parecen ser los principales responsables de ésta mejora organoléptica. Sin embargo, este es un proceso complejo y lento que requiere de un largo tiempo para ser completado, por lo que, puede implicar riesgos microbiológicos y organolépticos. Por esta razón, en los últimos años el uso de preparaciones de levaduras secas inactivas comerciales, que se basan en los productos liberados durante la autólisis natural, ha generado un gran

interés. Su uso representa ciertas ventajas sobre la crianza sobre lías ya que acelera dicho proceso mejorando organolépticamente aquellos vinos inicialmente más verdes y tánicos.

6.1. La crianza sobre lías

Tradicionalmente, la crianza sobre lías se realizaba en los vinos blancos, así como en los vinos espumosos producidos por el método tradicional, pero hoy en día la crianza sobre lías está extendida a todas las zonas vitícolas y se usa en particular para los vinos tintos durante un periodo de tiempo que oscila entre 2 y 14 meses mayoritariamente (Trioné y col., 2001).

Las lías del vino consisten principalmente en células de levadura muertas producidas durante la fermentación alcohólica mezcladas con cristales de tartrato, bacterias y residuos de células vegetales. La composición de las lías es variable, ya que depende de la duración de la decantación y el posterior trasiego del vino.

Durante el tiempo de contacto del vino con las lías, tiene lugar la autólisis de las levaduras que consiste en un proceso de auto-degradación enzimática de las células de levadura que comienza inmediatamente después de que la célula muera (Babayán y col., 1985). La degeneración celular de las levaduras muertas comienza con la ruptura de los sistemas de membrana, y la liberación posterior al medio de enzimas hidrolíticas. También se produce la hidrólisis de los biopolímeros intracelulares en

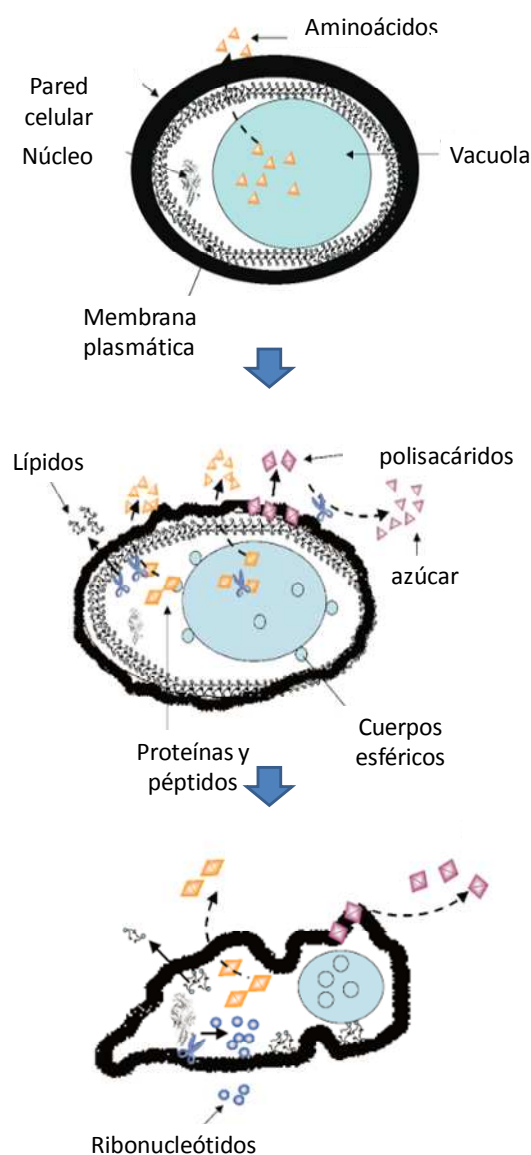


Figura 9. Representación esquemática de la morfología y cambios bioquímicos en la levadura durante la autólisis en vino espumoso (Alexandre y col., 2006).

productos de bajo peso molecular (Babayan y col., 1985; Martínez-Rodríguez y col., 2000; Guilloux y col., 2003). (Figura 9)

El proceso de autólisis concluye en la liberación de diferentes compuestos al medio, los cuales pueden modificar las características físicas y organolépticas de los vinos. Así, la autólisis libera proteínas (Martínez-Rodríguez y col., 2000), péptidos (Moreno-Arribas y col., 1996), ácidos nucleicos (Leroy y col., 1990) aminoácidos (Feuillat y col., 1982), nucleótidos y nucleosidos (Zhao y col., 2003, 2005; Charpentier y col., 2005), otros compuestos nitrogenados (Ferrari y col., 1988), ácidos grasos (Troton y col., 1989 ; Gallart y col., 2002), compuestos volátiles (Postel y col., 1987; Pérez-Serradilla y col., 2008) y principalmente manoproteínas (Charpentier, 2004; Fornairon-Bonnefond y col., 2002). La proporción y velocidad de liberación de estos compuestos está influenciada por parámetros físicos, como son la temperatura, el pH o la concentración de etanol (Feuillant y col., 1982; Pérez-Serradilla y col., 2008). También se ha descrito que hay un efecto cepa de levadura; así por ejemplo la cinética de liberación de polisacáridos varía dependiendo de la cepa de levadura (Morata y col., 2005; Palomero y col., 2007, 2009), así como la liberación de péptidos (Alcaide-Hidalgo y col., 2008; Pozo-Bayón y col., 2009), aminoácidos (Feuillat y col., 1982; Martínez-Rodríguez y col., 2002; Moreno-Arribas y col., 1998), otros compuestos nitrogenados (Martínez-Rodríguez y col., 2001) y la degradación del ADN (Hernawan y col., 1995).

Existen múltiples trabajos que corroboran el efecto positivo de la crianza sobre lías en las características organolépticas de los diferentes vinos, (Doco y col., 2003; Lubbers y col., 1994; Salmon y col., 2002; Rodríguez y col., 2005), algunos de estos efectos positivos pueden ser una buena estrategia para paliar los efectos del cambio climático sobre la producción de vino, aunque este proceso también implica ciertos riesgos cualitativos para el vino final, como es la formación de aromas indeseables en algunos casos (Bautista y col., 2007) o el aumento en las aminas biógenas (González-Marco, 2006; Pérez-Serradilla y col., 2008), lo que hace de este proceso un proceso largo, complejo y en ocasiones arriesgado.

6.2. Alternativas a la crianza sobre lías.

La autólisis, como ya se ha descrito anteriormente es un proceso que puede durar desde unos pocos meses hasta años, dependiendo de varias variables tales como; la temperatura, la disponibilidad de nutrientes por parte de la levadura, la variedad de uva o cepa utilizada, entre otros.

Se trata por tanto, de un proceso lento y complejo, con múltiples beneficios, pero también con algunos riesgos sobre la calidad del vino final, como ya se ha descrito con anterioridad. En este contexto, se han estudiado posibles alternativas a la crianza sobre lías con el fin de garantizar todas o algunas de las mejoras proporcionadas por esta técnica, pero eliminando las desventajas, tanto desde el punto de vista organoléptico y de calidad del vino, como económico.

Hasta ahora, varias formas de acelerar los efectos de autólisis de la levadura han sido examinadas. El aumento de la temperatura de envejecimiento (Feuillant y col., 1982), o el uso de inóculos seleccionados de levadura (Todd y col., 2000; Nuñez y col., 2005; Cebollero y col., 2005, 2009), también se ha estudiado el uso de preparaciones comerciales de levadura, con o sin enzimas β -glucanasa (Guilloux-Bentatier y col., 2003; Ayestarán y col., 2004; Guadalupe y col., 2008, 2010; Del Barrio-Galán y col., 2011, 2012a), entre otros. Algunas de opciones se describen más detalladamente a continuación.

6.2.1. Selección de levaduras en función de su facilidad de autolisado o de producción de algunos componentes.

En los últimos años el uso de inóculos comerciales para realizar los procesos de vinificación ha sido ampliamente estudiado y utilizado en la industria enológica.

Como ya se ha descrito con anterioridad uno de los criterios de calidad que se utiliza para seleccionar el inóculo son la facilidad de autolisado o la facilidad de producción de manoproteínas. Existen múltiples trabajos que se basan en este tipo de selección (Martínez-Rodríguez y col., 2001; Nuñez, y col., 2005; Cebollero y col., 2005, 2009). Además, también se ha estudiado el uso de cultivos mixtos de cepas que contiene cepas

Killer resistentes y cepas sensibles de levadura (Todd y col., 2000) con el objetivo de acelerar la autólisis. Actualmente, otro campo de estudio es la manipulación genética o la sobreexpresión de ciertos genes de las levaduras, para acelerar el proceso de autólisis (González y col., 2003; Tabera y col., 2006) o para favorecer la liberación de ciertos compuestos muy ligados a este proceso, como es el caso de los compuestos nitrogenados (González y col., 2003), los polisacáridos o manoproteínas (Nuñez y col., 2005; González-Ramos y col., 2008), las proteínas y los aminoácidos (Nuñez y col., 2005), o incluso para disminuir la producción de ciertos compuestos como el acético (Cordente y col., 2013).

6.2.2. Preparados comerciales a base de levadura.

En los últimos años se han desarrollado diferentes preparaciones comerciales que imitan a las lías de levadura. Estas preparaciones obtenidas a partir de levaduras enológicas (*S. cerevisiae*) que se hacen crecer en condiciones determinadas de cultivo (condiciones aeróbicas, en medios concentrados o con alta concentración de azúcar), después se les realiza una inactivación térmica o enzimática mediante procesos autolíticos, de plasmólisis, o hidrolíticos. Posteriormente son concentrados o secados para obtener las diferentes fórmulas comerciales.

Los procesos de inactivación térmica consisten en someter a la levadura a temperaturas elevadas (100-120°C), mientras que la inactivación enzimática, consiste en la hidrólisis de las paredes celulares por la acción de enzimas β -glucanasas, seguido de un proceso de aislamiento de las fracciones obtenidas mediante filtración o ultrafiltración y una última etapa de purificación.

Estos productos adquieren diferente nomenclatura (paredes de levaduras, cortezas de levaduras, levaduras secas inactivas, entre otras) aunque en muchas ocasiones su composición no es del todo conocida, ya que algunos de estos productos se basan en mezclas de productos a base de levaduras y enzimas (Pozo-Bayon y col., 2009) y en algunos casos se les añaden a estas preparaciones sales de amonio, tiamina, microcristales de celulosa, glucanasas, entre otros.

La heterogeneidad en la composición química de los preparados comerciales se debe a los distintos procesos de extracción y purificación empleados. En función de su

composición química se ha observado que el efecto en vino es distinto (Guadalupe y col., 2007, 2008b; Pozo-Bayón y col., 2009; Del Barrio-Galán y col., 2012a,b). En general, podemos clasificarlos en 5 grupos distintos en función de su proceso de producción:

- Levaduras secas inactivas obtenidas por inactivación térmica y posterior secado.
- Autolisados de levadura; en estos productos además de producirse una inactivación térmica hay un paso de incubación en el que se permite a los enzimas de la levadura ser liberados de las vacuolas y degradar parte del contenido intracelular.
- Extractos de levadura donde sólo encontramos componentes intracelulares.
- Paredes de levaduras o Cortezas de levadura; Son insolubles y están formados únicamente por las paredes de levadura.
- Manoproteínas extraídas de las paredes celulares, que las podemos encontrar más o menos purificadas.

Para facilitar la descripción de estos diferentes productos se pueden agrupar en 4 tipos.

6.2.2.1. Extractos de levadura y autolisados

Los extractos de levadura son el extracto soluble que se obtiene durante el proceso autolítico o la degradación del total del contenido citoplasmático de la célula, por lo que, sólo encontramos componentes intracelulares.

Los autolisados se producen de manera similar a los extractos de levadura, pero las paredes de la célula no se eliminan en el proceso.

Algunos estudios realizados en vino con extractos de levadura y autolisados principalmente, han observado que proporcionan una liberación de compuestos tales como nitrógeno, proteínas, aminoácidos y polisacáridos, acelerando la maduración de los vinos espumosos y mejorando su calidad organoléptica y espumante (Feuillat, 1986). También se ha descrito el aumento en el contenido de ácidos grasos (Comuzzo y

col., 2006) y una fuerte incidencia sobre los aromas del vino, afectando a la volatilidad de algunos compuestos, tales como los esteres o compuestos volátiles exógenos (Comuzzo y col., 2006).

Este tipo de compuestos también se han utilizado para estabilizar la fracción fenólica de los vinos tintos (Comuzzo y col., 2005). Se ha observado, que los efectos de este tipo de productos sobre el color y la astringencia de los vinos están influenciados por las características del vino y la dosis del producto.

6.2.2.2. Paredes de levadura y Cortezas de levadura.

Se obtienen durante el proceso de obtención de extractos de levadura, son insolubles y están compuestos únicamente por las paredes de levadura sin contenido citoplasmático

Las paredes de levaduras fueron utilizadas por primera vez por Lafon- Lafourcade, 1984 para eliminar los ácidos grasos de cadena corta, que son inhibidores de la fermentación alcohólica y maloláctica, debido a la toxicidad que implica estas sustancias para las levaduras y bacterias lácticas.

En la actualidad han sido ampliamente estudiadas, y se han observado varios efectos positivos en la calidad de los vinos. Así por ejemplo, Nuñez y col., 2006 probaron el uso de diferentes paredes de levadura, unas obtenidas mediante inactivación térmica y otras mediante inactivación enzimática en vinos espumosos modelo, las cortezas inactivadas de manera térmica observaron que proporcionaban una mayor mejora en las características espumantes, que las obtenidas mediante inactivación enzimática, debido a un aporte de manoproteínas.

Además es ampliamente conocida la gran capacidad de absorber compuestos químicos del medio por parte de las paredes de levadura (Caridi y col., 2007). Es importante tener en cuenta esta propiedad, ya que pueden comportar cambios sensoriales imprevistos. Por ejemplo se ha demostrado la capacidad de las paredes de levadura de absorber compuestos fenólicos (Razmkhab y col., 2002), tipo antocianinas (Morata, y col., 2003, 2005) modificando el color de los vinos.

6.2.2.3. Manoproteínas

De entre todas estas preparaciones, las manoproteínas, que son el principal constituyente de la pared de *Saccharomyces cerevisiae*, han sido extensivamente estudiadas (Waters y col., 1994; Moine-Ledoux y col., 1997; Charpentier y col., 2000; Caridi, 2006; Guadalupe y col., 2008b; Ribeiro y col., 2014), para mejorar procesos tecnológicos y las características sensoriales de los vinos. Su uso como aditivos enológicos durante la vinificación fue aprobado por la unión europea (EU Regulation 2165/2005 20 diciembre de 2005). Sin embargo la heterogeneidad de este grupo de compuestos en cuanto a su estructura y composición, y las diferencias en los procesos empleados para su obtención, hacen que muchas de las preparaciones comerciales a base de manoproteínas difiera considerablemente en peso molecular y en su composición química (porcentaje de azúcar, proteína, aminoácidos, etc). Esto puede dar lugar, a una gran variabilidad en los resultados obtenidos, observando efectos muy diferentes en el vino, dependiendo del tipo de preparado comercial empleado. Los múltiples efectos positivos que tienen las manoproteínas en vinos han sido explicados extensamente en los apartados anteriores.

También se ha estudiado el uso de manoproteínas junto con el de enzimas con resultados muy interesantes para la estabilización del color en vinos tintos (Guadalupe y col., 2007).

6.2.2.4. Levaduras inactivas.

Actualmente los preparados a base de levaduras inactivas son de composición muy variable, que suelen incorporar levaduras inactivas y metabolitos procedentes de la autólisis (proteína, péptidos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos) cuya concentración puede variar en función de las condiciones de cultivo, y también suelen contener paredes de levaduras, vitaminas y minerales (Guilloux-Benatier y col., 2003).

Estos productos han sido utilizados ampliamente en la industria enológica con distintos objetivos, por un lado, se han utilizado como potenciadores de fermentación, ya sea como uso de nutriente, o debido a su capacidad de actuar como protector durante la hidratación de la levadura seca activa (Dulau y col.,2002).

El primer mecanismo está relacionado con el uso de las levaduras secas inactivas para promover el crecimiento de microorganismos del vino, debido a la capacidad para liberar metabolitos del citoplasma en el vino (Aguilar-Uscanga y col., 2003), mejorando la fermentación alcohólica en vinos con poco nitrógeno, y la capacidad de desintoxicación de las paredes de levadura, también podrían mejorar la fermentación alcohólica (Lafon- Lafourcade y col., 1984).

El segundo mecanismo es debido a la capacidad de liberar fracciones insolubles de la levadura al medio, produciendo grupos esteroides que pueden ser incorporados a la membrana de la levadura con el objetivo de reparar daños (Soubeyrand y col., 2005). También se ha observado que pueden liberar ácidos grasos poliinsaturados que favorecen la adaptación del metabolismo de las levaduras secas activas, a la presión osmótica que se ven sometidas al ser introducir las en el mosto, posteriormente a la hidratación con agua (Caridi, 2002).

Por otro lado además de ser utilizados como potenciadores de la fermentación alcohólica, se ha observado que estos aditivos tienen la capacidad de liberar componentes al medio que interactúan con otros componentes del vino, como son los compuestos fenólicos. Cuando interactúan con los taninos parecen participar en la disminución de la sensación de astringencia, mientras que, cuando interactúan con antocianos parecen participar en la estabilización del color (Del Barrio- Galán y col., 2012b). Además de estas interacciones se ha observado que también pueden interactuar con la fracción volátil del vino (Pozo-Bayón y col., 2009) o aumentar la concentración de polisacáridos del vino (Del Barrio-Galán y col., 2012a).

Estos productos denominados generalmente como levaduras secas inactivas (LSI), son actualmente suministrados por numerosas compañías biotecnológicas y/o enológicas, bajo diferentes marcas comerciales, para un amplio espectro de aplicaciones enológicas con el objetivo de mejorar la calidad de los vinos. Se han observado que los diferentes productos comerciales denominados levaduras secas inactivas tienen formas de actuación distintas en función de su composición (Andújar-Ortiz y col., 2010). Sin embargo, la información actual de que se dispone sobre este tipo de productos y sus mecanismos de acción durante la vinificación o en las sucesivas etapas de acabado de los vinos es muy escasa. Esto puede generar cierta confusión en los elaboradores sobre

el tipo de preparación más adecuada para solventar un problema específico, o sobre los mecanismos implicados en la mejora de las características organolépticas del vino.

Referencias

- Aguilar-Uscanga, B.; François, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* **2003**, 37, 268–274.
- Aguilar-Uscanga, B.; Solis-Pacheco, J.; Francois, J. Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. e-Gnosis. *Revista digital científica y tecnológica.* **2005**. [www. E-gnosis.udg.mx/vol3/art12](http://www.E-gnosis.udg.mx/vol3/art12).
- Aguirre, M. J.; Isaacs, M.; Matsuhiro, B.; Mendoza, L.; Zúñiga, E. A. Characterization of a neutral polysaccharide with antioxidant capacity from red wine. *Carbohydr. Res.* **2009**, 344, 1095–1101.
- Albertin, W.; Miot-Sertier, C.; Bely, M.; Marullo, P.; Coulon, J.; Moine, V.; Colonna-Ceccaldi, B.; Masneuf-Pomarede, I. Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in chardonnay grape must. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, 178, 87–97.
- Alcaide-Hidalgo, J. M.; Martínez-Rodríguez, A. J.; Martín-Álvarez, P. J.; Pueyo, E. Influence of the elaboration process on the peptide fraction with angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity in sparkling wines and red wines aged on lees. *Food Chem.* **2008**, 111, 965–969.
- Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive Study. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, 563, 238–254.
- Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. Yeast Autolysis in Sparkling Wine - A Review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**, 12, 119–127.
- Alley, R. B.; Clark, P. U.; Huybrechts, P.; Joughin, I. Ice-sheet and sea-level changes. *Sci.* **2005**, 310, 456–460.
- Amerine, M.A.; Berg, H.W.; Cruess, W.V. The technology of winemaking, 3rd edn. The AVI Publishing Company Inc., Westport, CT. 1972.
- Anderson, D.M.W. Chemotaxonomic aspects of the chemistry of acacia gum exudates. *Kew Bulletin.* **1978**, 32, 529-536.
- Andrés-Lacueva, C.; López-Tamames, E.; Lamuela-Raventós, R. M.; Buxaderas, S.; de la Torre-Boronat, M. Characteristics of sparkling base wines affecting foam behavior. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 989–995.
- Andújar-Ortiz, I.; Pozo-Bayón, M. A.; García-Ruiz, A.; Moreno-Arribas, M. V. Role of specific components from commercial inactive dry yeast winemaking preparations on the growth of wine lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 8392–8399.

- Anfang, N.; Brajkovich, M.; Goddard, M. R. Co-fermentation with *Pichia Kluyveri* Increases varietal thiol concentrations in sauvignon blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2009**, 15, 1–8.
- Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 6151–6153.
- Ayestarán, B.; Guadalupe, Z.; León, D. Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo cv.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal.Chim.Acta.* **2004**, 513, 29–39.
- Babayan, T. L.; Bezrukov, M. G. Autolysis in Yeasts. *Acta Biotechnol.* **1985**, 5, 129–136.
- Bakker, J.; Timberlake, C. F. Isolation, identification, and characterization of new color stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 35–43.
- Barbagallo, R.N.; Spagna, G.; Palmeri, R.; Restuccia, C.; Giudici, P. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme Microb Tech.* **2004**, 35, 58–66
- Barnavon, L.; Doco, T.; Terrier, N.; Ageorges, A.; Romieu, C.; Pellerin, P. Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry.* **2001**, 58, 693–701.
- Bate-Smith, E. C. Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry.* **1973**, 12, 1809–1812.
- Bautista, R.; Fernández, E.; Falqué, E. Effect of the contact with fermentation-lees or commercial-lees on the volatile composition of white wines. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, 224, 405–413.
- Bautista-Ortín, A. B.; Fernández-Fernández, J. I.; López-Roca, J. M.; Gómez-Plaza, E. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *J. Food Compos. Anal.* **2007**, 20, 546–552.
- Bautista-Ortín, A. B.; Rodríguez-Rodríguez, P.; Gil-Muñoz, R.; Jiménez-Pascual, E.; Busse-Valverde, N.; Martínez-Cutillas, A.; López-Roca, J. M.; Gómez-Plaza, E. Influence of berry ripeness on concentration, qualitative composition and extractability of grape seed tannins. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2012**, 18, 123–130.
- Beltran, G.; Torija, M. J.; Novo, M.; Ferrer, N.; Poblet, M.; Guillamón, J. M.; Rozès, N.; Mas, A. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* **2002**, 25, 287-293.

- Bely, M.; Stoeckle, P.; Masneuf-Pomarède, I.; Dubourdieu, D Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation.*Int. J. Food Microbiol.* **2008**, 122, 312–320.
- Berké, B.; de Freitas, V. A. P. Influence of procyanidin structures on their ability to complex with Oenin.*Food Chem.* **2005**, 90, 453–460.
- Bisson, L.; Joseph, C. M. L. Yeasts. In *biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*, König, H.; Uden, G.; Fröhlich, J. Eds.; Springer Berlin Heidelberg, 2009; pp. 47–60.
- Bisson, L.F.; Kunkee, R.E. Microbial interactions during wine production. In *Mixed Cultures in Biotechnology*. Zeikus, J.G.; Johnson, E.A. Eds.; McGraw-Hill, Inc., New York, NY, 1991; pp. 39–68.
- Blasco, L.; Veiga-Crespo, P.; Poza, M.; Villa, T. G. Hydrolases as markers of wine aging.*World J. Microbiol.Biotechnol.* **2006**, 22, 1229–1233
- Boivin, S.; Feuillat, M.; Alexandre, H.; Charpentier, C. Effect of must turbidity on cell wall porosity and macromolecules excretion of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated on grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, 49, 325–332.
- Boulton, R. B. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, 52, 67-87.
- Boulton, R.B.; Singleton V.L.; Bisson L.F.; Kunkee, R.E. Principles and practices of winemaking. Champman and Hall, New York. 1996.
- Brilli, L.; Buscioni, G.; Moriondo, M.; Bindi, M.; Vincenzini, M. Influence of interannual meteorological variability on yeast content and composition in sangiovese grapes.*Am. J. Enol. Vitic.* **2014**, 65, 375-380.
- Brissonnet, F.; Maujean, A. Characterization of foaming proteins in a champagne base wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, 44 , 297–301.
- Brissonnet, F.; Maujean, A. Identification of some foam-active compounds in champagne base Wines.*Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, 42 , 97–102.
- Bureau, G., Brun, D., Vignes, A., Maujean, A., Vesselle, G.; Feuillat, M. Étude d'une microflore levurienne champenoise. *Conn. Vigne Vin.* **1982**, 16, 15-32.
- Burney, J. A.; Kennel, C. F.; Victor, D. G. Getting serious about the new realities of global climate change.*Bull. At. Sci.* **2013**, 69, 49–57.
- Caridi, A. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **2006**, 89, 417–422.

- Caridi, A. New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, 120, 167–172.
- Caridi, A. Protective agents used to reverse the metabolic changes induced in wines yeasts by concomitant osmotic and thermal stress. *Letters in Applied Microbiology.* **2002**, 35, 98–1011.
- Carter, T. R.; Parry, M. L.; Porter, J. H. Climatic change and future agroclimatic potential in Europe. *Int. J. Climatol.* **1991**, 11, 251–269.
- Carvalho, E.; Mateus, N.; Plet, B.; Pianet, I.; Dufourc, E.; de Freitas, V. Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 8936–8944.
- Castelli, T. Yeasts of wine fermentations from various regions of Italy. *Am. J. Enol. Viticult.* **1955**, 6, 18–20
- Castor, J.G.B. Fermentation products and flavor profiles of yeasts. *Wines Vines.* **1954**, 35, 29–31
- Cebollero, E.; González-Ramos, D.; Gonzalez, R. Construction of a recombinant autolytic wine yeast strain overexpressing the *csc1-1* allele. *Biotechnol. Prog.* **2009**, 25, 1598–1604.
- Cebollero, E.; Martínez-Rodríguez, A.; Carrascosa, A. V; Gonzalez, R. Overexpression of *csc1-1*. A plausible strategy to obtain wine yeast strains undergoing accelerated autolysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005a**, 246, 1–9.
- Cerpa-Calderón, F.K.; Kennedy, J.A. Berry integrity and extraction of skin and seed proanthocyanidins during red wine fermentation. *J. Agric. Food. Chem.* **2008**, 56, 9006–14.
- Chalier, P.; Angot, B.; Delteil, D.; Doco, T.; Gunata, Z. Interactions between aroma compounds and Whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem.* **2007**, 100, 22–30.
- Charoenchai, C.; Fleet, G. H.; Henschke, P. A.; Todd, B. E. N. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust. J. Grape Wine Res.* **1997**, 3, 2–8.
- Charpentier, C.; Aussenac, J.; Charpentier, M.; Prome, J.-C.; Duteurtre, B.; Feuillat, M. Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: kinetics and potential impact on flavor. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 3000–3007.
- Charpentier, C.; Dos Santos, A. M.; Feuillat, M. Release of macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* during ageing of French flor sherry wine “vin jaune.” *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 96, 253–262.
- Charpentier, C.; Freyssinet, M. The mechanism of yeast autolysis in wine. *Yeast.* **2000**, 5, 181–186.

- Chatonnet, P.; Dubourdie, D.; Boidron, J.; Pons, M. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, 60, 165–178.
- Chatonnet, P.; Dubourdie, D.; Boidron, J.N. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, 46: 463-468.
- Cheyrier, V.; Moutounet, M.; Sarni-Manchado, P. Los compuestos fenólicos. En: *Enología. Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Flanzky, C. Ed. AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (España). 2003, pp 114-136.
- Cheyrier, V.; Rigaud, J.; Moutounet, M. High-performance liquid chromatographic determination of the free O-quinones of trans-caffeoyltartaric acid, 2-S-glutathionylcaffeoyl tartaric acid and catechin in grape must. *J. Chromatogr. A.* **1989**, 472, 428–432.
- Chira K, Teissedre PL. Extraction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profile of wine aged with French winewoods subjected to different toasting methods: behaviour during storage. *Food Chem.* **2013**, 40, 168-77.
- Ciani, M. Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of Non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* **2010**, 10, 123–133.
- Ciani, M. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann. Microbiol.* **2011**, 61, 25–32.
- Ciani, M.; Beco, L.; Comitini, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int J Food Microbiol.* **2006**, 108, 239-45.
- Ciani, M.; Maccarelli, F. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 14, 199–203.
- Cid, V. J.; Durán, A.; Del Rey, F.; Zinder, M. P.; Nombela, C.; Sánchez, M. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews.* **1995**, 59, 345-386.
- Clemente-Jiménez, J. M.; Mingorance-Cazorla, L.; Martínez-Rodríguez, S.; Heras-Vázquez, F. J. Las; Rodríguez-Vico, F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol.* **2004**, 21, 149–155.
- Coelho, E.; Rocha, S. M.; Coimbra, M. A. Foamability and foam stability of molecular reconstituted model sparkling wines. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 8770–8778.
- Colagrande, O.; Silva, A.; Fumi, M. D. Recent applications of biotechnology in wine production. *Biotechnol. Prog.* **1994**, 10, 2–18.

- Combina, M.; Mercado, L.; Borgo, P.; Elia, A.; Jofré, V.; Ganga, A.; Martinez, C.; Catania, C. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, 98, 1055–1061.
- Comelles, F.; Bosch, M.P.; Castro, J.J. Relationship between physicochemical variables and foaming properties of grape varieties. *ACE Revista d'Enologia.* **1991**, 23, 7–16.
- Comitini, F.; Gobbi, M.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **2011**, 28, 873–882.
- Comuzzo, P. Tat, L. Battistutta, F. Tasso, A. Effet d'un lysat industriel de levure sur l'évolution des vins rouges en bouteille. *J. Int. Sc. Vigne Vin.* **2005**, 39, 83–90
- Comuzzo, P.; Tat, L.; Tonizzo, A.; Battistutta, F. Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. *Food Chem.* **2006**, 99, 217–230
- Constantí, M.; Reguant, C.; Poblet, M.; Zamora, F.; Mas, A.; Guillamón, J. M. Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **1998**, 41, 169–175.
- Contreras, A.; Hidalgo, C.; Henschke, P. A.; Chambers, P. J.; Curtin, C.; Varela, C. Evaluation of non-*Saccharomyces* yeast for the reduction of alcohol content in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, 80, 1670–1678.
- Cordente, A. G.; Cordero-Bueso, G.; Pretorius, I. S.; Curtin, C. D. Novel wine yeast with mutations in YAP1 that produce less acetic acid during fermentation. *FEMS yeast research.* **2013**, 13, 62-73.
- Cordero Otero, R. R.; Ubeda Iranzo, J. F.; Briones-Perez, A. I.; Potgieter, N.; Villena, M. A.; Pretorius, I. S.; Rensburg, P. van. Characterization of the β -glucosidase activity produced by enological strains of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Food Sci.* **2003**, 68, 2564–2569.
- Cordero-Bueso, G.; Esteve-Zarzoso, B.; Cabellos, J. M.; Gil-Díaz, M.; Arroyo, T. Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts Isolated during spontaneous fermentations of malvar (*vitis vinifera* cv. L.). *Eur. Food Res. Technol.* **2013**, 236, 193–207.
- Cray, J.A.; Bell, A.N.; Bhaganna, P.; Mswaka, A.Y.; Timson, D.J.; Hallsworth, J.E. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microb biotechnol.* **2013**, 6, 453-492.
- Crowley, T. J. Causes of climate change over the past 1000 years. *Sci.* **2000**, 289, 270–277.
- Cruz, L.; Borges, E.; Silva, A. M. S.; Mateus, N.; de Freitas, V. Synthesis of a new (+)-catechin-derived compound: 8-vinylcatechin. *Lett Org Chem* **2008**, 5, 530–536.

- de Freitas, V.; Mateus, N. Structural features of procyanidin Interactions with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 940–945.
- de Freitas, V.; Sousa, C.; Silva, A. M. S.; Santos-Buelga, C.; Mateus, N. Synthesis of a new catechin-pyrylium derived pigment. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 9349–9352.
- Degré, R. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In *Wine Microbiology and Biotechnology*. Ed.; Flead GH, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. 1993.
- Del Barrio-Galán, R.; Pérez-Magariño, S.; Ortega-Heras, M. Effect of the aging on lees and other alternative techniques on the low molecular weight phenols of tempranillo red wine aged in Oak barrels. *Anal. Chim. Acta* **2012b**, 732, 53–63.
- Del Barrio-Galán, R.; Pérez-Magariño, S.; Ortega-Heras, M.; Guadalupe, Z.; Ayestarán, B. Polysaccharide characterization of commercial dry yeast preparations and their effect on white and red wine composition. *LWT - Food Sci. Technol.* **2012a**, 48, 215–223.
- Del Barrio-Galán, R.; Pérez-Magariño, S.; Ortega-Heras, M.; Williams, P.; Doco, T. Effect of aging on lees and of three different dry yeast derivative products on verdejo white wine composition and sensorial characteristics. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 12433–12442.
- Dizy, M.; Bisson, L. F. Proteolytic activity of yeast Strains during grape juice fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, 51, 155–167.
- Doco, T.; Brillouet, J-M.; Moutounet, M. Evolution of Grape (carignan noir cv.) and yeast polysaccharides during fermentation and post-maceration. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, 47, 108–110.
- Doco, T.; Lecas, M.; Pellerin, P.; Brillouet, J-M.; Moutounet, M. Les polysaccharides Pectides de la pulpe et de la pellicule de raisin. Quel devenir pendant la phase pré-fermentaire? *Revue Française d'Oenologie.* **1995**, 153, 16–23.
- Doco, T.; Quellec, N.; Moutounet, M.; Pellerin, P. Polysaccharide patterns during the aging of carignan noir red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, 50, 25–32.
- Doco, T.; Vuchot, P.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees. *Am. J. Enol. Vitic.* **2003**, 54, 150–157.
- Doco, T.; Williams, P.; Vidal, S.; Pellerin, P. Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables. *Carbohydr. Res.* **1997**, 297, 181–186.
- Dokoozlian, N. K.; Kliewer, W. M. Influence of light on grape berry growth and composition varies during fruit development. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **1996**, 121, 869–874.

- Domizio, P. Potential spoilage non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Microbiol.* **2011**, *61*, 137–144.
- Domizio, P.; Liu, Y.; Bisson, L. F.; Barile, D. Use of *Non-Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiol.* **2014**, *43*, 5–15.
- Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Comitini, F.; Gobbi, M.; Mannazzu, I.; Ciani, M. 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. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *147*, 170–180
- Downey, M. O.; Harvey, J. S.; Robinson, S. P. Analysis of tannins in seeds and skins of shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2003**, *9*, 15–27.
- Dubourdieu, D.; Villettaz, J.C; Desplanques, C.; Ribéreau-Gayon, P. Dégradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. Application a l'amélioration de la clarification des vins issus de raisins pourris. *Connaiss. Vigne Vin.* **1981**, *15*, 161-177
- Dulau, L.A.; Ortiz-Julien, A.; Triolig, G. Method of dry yeast rehydration médium. 2002. International Patent PCT/FR/02/01949.
- Dupin, I. V. S.; McKinnon, B. M.; Ryan, C.; Boulay, M.; Markides, A. J.; Jones, G. P.; Williams, P. J.; Waters, E. J. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3098–3105.
- Dupres, V.; Dufrière, Y.F.; Heinisch, J.J. Measuring cell wall thickness in living yeast cells using single molecular rulers. *ACS Nano.* **2010**, *28*, 5498-504.
- Dussaud, A.; Robillard, B.; Carles, B.; Duteurtre, B.; Vignes-Adler, M. Exogenous lipids and ethanol influences on the foam behavior of sparkling base wines. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 148–151.
- Egli, C. M.; Edinger, W. D.; Mitrakul, C. M.; Henick-Kling, T. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of riesling and chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, *85*, 779-789.
- Escot, S.; Feuillat, M.; Dulau, L.; Charpentier, C. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2001**, *7*, 153–159.
- Escribano-Bailón, T.; Álvarez-García, M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Heredia, F. J.; Santos-Buelga, C. Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin 3-O-glucoside and (+)-catechin. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1213–1217.

- Esteve Zarzoso, B. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in Industrial winemaking. *Int. Microbiol.* **1998**, 1, 143–148.
- Esteve-Zarzoso, B.; Peris-Torán, M. J.; García-Maiquez, E.; Uruburu, F.; Querol, A. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 2056-2061.
- Fernandez, M. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, 59, 29–36.
- Fernández-López, J. A.; Hidalgo, V.; Almela, L.; Roca, J. M. L. Quantitative changes in anthocyanin pigments of *Vitis vinifera* cv monastrell during maturation. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, 58, 153–155.
- Ferrari, G.; Feuillat, M. L' élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. I Etude de composés azotés, des acides gras et analyse sensorielle des vins. *Vitis.* **1988**, 27, 183-197
- Ferraro, L.; Fatichenti, F.; Ciani, M. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* **2000**, 35, 1125–1129.
- Feuillat, M. Autolysats de levures a usage oenologique et leur procede de fabrication. Brevet ANVAR no. 86–16318 Universite de Bougogne, Dijon, France. 1986
- Feuillat, M.; Charpentier, C. Autolysis of yeasts in champagne. *Am. J. Enol. Vitic.* **1982**, 33, 6–13.
- Fleet, G. H. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* **2008**, 8, 979–995.
- Fleet, G. H. Yeast Interactions and Wine Flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, 86, 11–22.
- Fleet, G. H.; Lafon-Lafourcade, S.; Ribéreau-Gayon, P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, 48, 1034–1038.
- Fleet, G.H.; Heard, G. Yeasts-growth during fermentation In *Wine Microbiology and Biotechnology*. Ed.; Fleet, G.H. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. 1993; pp.27–54
- Fornairon-Bonnefond, C.; Camarasa, C.; Moutounet, M.; Salmon, J. M. New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: a bibliographic review. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **2002**, 36, 49–69.
- Francia-Aricha, E. M.; Guerra, M. T.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 2262–2266.

- Freer, S.N. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeast. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 18, 271–275.
- Fugelsang, K.C.; Edwards, C.G.; Charles, G. Wine microbiology. Practical applications and procedures. Springer, Berlin,; 2007; pp 85-93.
- Fulcrand, H.; Benabdeljalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry.* **1998**, 477, 1401-1407.
- Fulcrand, H.; Cameira-Dos-Santos, P.J.; Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Favre-Bonvin, J. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1996**, 1, 735-739.
- Gallardo-Chacón, J. J.; Vichi, S.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Changes in the sorption of diverse volatiles by *Saccharomyces cerevisiae* lees during sparkling wine aging. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 12426–12430.
- Gallart, M.; López-Tamames, E.; Suberbiola, G.; Buxaderas, S. Influence of fatty acids on wine foaming. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 7042-7045.
- Ganga, A.; Piñaga, F.; Querol, A.; Vallés, S.; Ramón, D. Cell-wall degrading enzymes in the release of grape aroma precursors. *Food Sci. Technol. Int.* 2001, 7, 83–87.
- Ganga, M. A.; Martínez, C. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of applied microbiology.* **2004**, 96, 76-83.
- García, A., Carcel, C., Dulau, L., Samson, A., Aguera, E., Agosin, E., Günata, Z. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a muscat wine. *Journal of Food Science.* **2002**, 67, 1138-1143.
- García-Viguera, C.; Bridle, P.; Bakker, J. The effect of pH on the formation of coloured compounds in model solutions containing anthocyanins, catechin and acetaldehyde, *Vitis.* **1994**, 33, 37–40.
- Gawel, R. Red wine astringency: a review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **1998**, 4, 74–95.
- Gawel, R.; Oberholster, A.; Francis, I. L. A. Mouth-feel wheel: terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2000**, 6, 203–207.
- Gayevskiy, V.; Goddard, M. R. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand. *ISME J.* **2012**, 6, 1281–1290.

- Geny, L.; Saucier, C.; Bracco, S.; Daviaud, F.; Glories, Y. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 8051–8054.
- Gil, J.V.; Mateo, J.J.; Jimenez, M.; Pastor, A.; Huerta, T. Aroma compounds in wines as influenced by apiculate yeasts. *J. Food Sci.* **1996**, 61, 1247-1249.
- Gil, M.; Esteruelas, M.; González, E.; Kontoudakis, N.; Jiménez, J.; Fort, F.; Canals, J. M.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Zamora, F. Effect of two different treatments for reducing grape yield in vitis vinifera cv syrah on wine composition and quality: berry thinning versus cluster thinning. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61, 4968–4978.
- Gil, M.; Kontoudakis, N.; González, E.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J. M.; Zamora, F. Influence of grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 7988–8001.
- Ginestar, C.; Eastham, J.; Gray, S.; Iland, P. Use of sap-flow sensors to schedule vineyard irrigation. II. effects of post-veraison water deficits on composition of Shiraz grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, 49, 421–428.
- Giovani, G. Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by Non-*Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, 160, 113–118.
- Glories, Y. La couleur des vins rouges. 2ème partie: mesure, origine et interprétation. *Connaissance de la Vigne et du Vin.* **1984**, 18, 253-271.
- Glories, Y.; Augustin, M. Maturité phénolique du raisin, conséquences technologiques: application aux millésimes 1991 et 1992. Proc. Colloque “Journée technique du CIVB”. Bordeaux; 1993; pp. 56-61.
- Goddard, M.R. ; Anfang, N. A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human aided global dispersal in oak barrels. *Environ Microbiol.* **2010**, 12, 63–73.
- Gómez-Míguez, M.; González-Manzano, S.; Escribano-Bailón, M. T.; Heredia, F. J.; Santos-Buelga, C. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 5422–5429.
- González, J.A.; Gallardo, C.S.; Pombar, A.; Rego, P.; Rodríguez, L. A. Determination of enzymatic activities in ecotypic *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* **2004**, 3, 743-750.
- Gonzalez, R.; Martinez-Rodriguez, A. J.; Carrascosa, A. V. Yeast autolytic mutants potentially useful for sparkling wine production. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, 84, 21–26.

- González-Manzano, S.; Dueñas, M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buelga, C. Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chem.* **2009**, 114, 649–656.
- González-Marco, A.; Ancín-Azpilicueta, C. Influence of lees contact on evolution of amines in chardonnay wine. *J. Food Sci.* **2006**, 71, C544–C548.
- Gonzalez-Ramos, D.; Cebollero, E.; Gonzalez, R. A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74, 5533–5540.
- Greeff, A. E.; Robillard, B.; du Toit, W. J. Short and long-term efficiency of carboxymethylcellulose (CMC) to prevent crystal formation in south african wine. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2012**, 29, 1374–1385.
- Guadalupe, Z.; Ayestarán, B. Changes in the color components and phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. cv. “Tempranillo” during vinification and aging. *Eur. Food Res. Technol.* **2008a**, 228, 29–38.
- Guadalupe, Z.; Ayestarán, B. Effect of commercial mannoprotein addition on polysaccharide, polyphenolic, and color composition in red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2008b**, 56, 9022–9029.
- Guadalupe, Z.; Martínez, L.; Ayestarán, B. Yeast mannoproteins in red winemaking: effect on polysaccharide, polyphenolic, and color composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, 61, 191–200.
- Guadalupe, Z.; Palacios, A.; Ayestarán, B. Maceration enzymes and mannoproteins: a possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 4854–4862.
- Guillamón, J.M.; Sabaté, J.; Barrio, E.; Cano, J.; Querol, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* **1998**, 169, 387–392.
- Guilloux-Benatier, M.; Chassagne, D. Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 746–751.
- Guise, R.; Filipe-Ribeiro, L.; Nascimento, D.; Bessa, O.; Nunes, F. M.; Cosme, F. Comparison between different types of carboxymethylcellulose and other oenological additives used for white wine tartaric stabilization. *Food Chem.* **2014**, 156, 250–257.

- Hagerman, A.E.; Robbins, C.T. Implications of soluble tannin-protein complexes for tannin analysis and plant defense mechanisms. *J Chem Ecol.* **1987**, 13, 1243-1259.
- Håkansson, A. E.; Pardon, K.; Hayasaka, Y.; de Sa, M.; Herderich, M. Structures and colour properties of new red wine pigments. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 4887–4891.
- Harbertson, J. F.; Kennedy, J. A.; Adams, D. O. Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and pinot noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, 53, 54–59.
- Hayasaka, Y.; Asenstorfer, R. E. Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 756–761.
- He, F.; Liang, N.-N.; Mu, L.; Pan, Q.-H.; Wang, J.; Reeves, M. J.; Duan, C.-Q. Anthocyanins and their variation in red wines I. monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules* **2012a**, 17, 1571–1601.
- He, F.; Liang, N.-N.; Mu, L.; Pan, Q.-H.; Wang, J.; Reeves, M. J.; Duan, C.-Q. Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules* **2012b**, 17, 1483–1519.
- Heard, G. Novel yeasts in winemaking – looking to the future. *Food Austral.* **1999**, 51, 347–35
- Heard, G.M.; Fleet, G.H. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl Environ Microbiol.* **1985** 50, 727–728.
- Henick-Kling; Edinger; Daniel; Monk. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, 84, 865–876.
- Hermosín-Gutiérrez, I. Copigmentación y piranoantocianos: El papel de los flavonoles y los ácidos hidroxicinámicos en el color del vino tinto. *ACE Revista de Enología.* **2007**. http://www.acenologia.com/ciencia81_2.htm.
- Hernández-Orte, P.; Cacho, J. F.; Ferreira, V. Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. experiments with model solutions and chemometric Study. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 2891–2899.
- Hernawan, T.; Fleet, G. Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. *J. Ind. Microbiol.* **1995**, 14, 440–450.
- Hidalgo Togores, J. En Tratado de enología: Ediciones Mundi -Prensa: Madrid, España, **2003**.

- Hierro, N.; González, Á.; Mas, A.; Guillamón, J. M. Diversity and evolution of Non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Res.* **2006**, 6, 102–111.
- Horne, J.; Hayes, J.; Lawless, H. T. Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substances. *Chem. Senses* **2002**, 27, 653–659.
- IPPC, Intergovernmental Panel on Climate Change. Warming of the climate system is unequivocal. Report on climate change **2013**: The physical science basis – summary for policymakers, observed changes in the climate system. <http://www.ipcc.ch/index.html>
- Ishikawa, T.; Noble, A. C. Temporal Perception of Astringency and Sweetness in Red Wine. *Food Qual. Prefer.* **1995**, 6, 27–33.
- Izquierdo Cañas, P. M.; García-Romero, E.; Heras Manso, J. M.; Fernández-González, M. Influence of sequential inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* in the quality of red wines. *Eur Food Res Technol.* **2014**, 239, 279-286
- Jayani, R. S.; Saxena, S.; Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.* **2005**, 40, 2931–2944.
- Jigami, Y.; Odani, T. Mannosylphosphate Transfer to Yeast Mannan. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1999**, 1426, 335–345.
- Jolly, N. P.; Augustyn, O. P. H.; Pretorius, I. S. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of chenin blanc wine. **2003**, 24, 63–69.
- Jolly, N.P.; Augustyn, O.P.H.; Pretorius, I.S. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *S Afr J Enol Vitic.* **2006**, 27: 15–39.
- Jones, G.V.; Webb, L.B. Climate change, viticulture, and wine: challenges and opportunities. *J. Wine. Res.* **2010**, 21, 103-106.
- Jones, G.V.; White, M.; Cooper, O.; Storchmann, K. Climate change and global wine quality. *Clim. Change.* **2005**, 73, 319–343.
- Jurado, E.; Camacho, F.; Luzón, G.; Vicaria, G.M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme and Microbial Technology.* **2004**, 34, 33–40.
- Kapsopoulou, K.; Mourtzini, A.; Anthoulas, M.; Nerantzis, E. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 23, 735–739.

- Kennedy, J. A.; Matthews, M. A.; Waterhouse, A. L. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*. **2000**, *55*, 77–85.
- Kenny, G. I.; Harrison P.A. The effects of climate variability and change on grape suitability in Europe. *Journal of Wine Research*. **1992**, *3*, 163-183.
- Kim, D. H.; Hong, Y. A.; Park, H. D. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnology letters*. **2008**, *30*, 1633-1638.
- Kliewer, W. M.; Torres, R. E. Effect of controlled day and night temperatures on grape coloration. *Am. J. Enol. Vitic*. **1972**, *23*, 71–77.
- Klis, F. M.; Mol, P.; Hellingwerf, K.; Brul, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces Cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev*. **2002**, *26*, 239–256.
- Klis, F.M.; Boorsma, A.; De Groot, P.W. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **2006** *23*: 185-202.
- Kontoudakis, N.; González, E.; Gil, M.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J. M.; Zamora, F. Influence of wine pH on changes in color and polyphenol composition induced by micro-oxygenation. *J. Agric. Food Chem*. **2011**, *59*, 1974–1984.
- Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Eds.; Kurtzman, C.P; Fell, J.W; Boekhout, T. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.2011; vol I, pp. 3– 5.;
- Lafon-Lafourcade, S.; Geneix, C.; Ribéreau-Gayon, P. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl Environ Microbiol*. **1984**, *47*, 1246–1249.
- Lage, P.; Barbosa, C.; Mateus, B.; Vasconcelos, I.; Mendes-Faia, A.; Mendes-Ferreira, A. H. *Guilliermondii* impacts growth kinetics and metabolic activity of *S. cerevisiae*: The role of initial nitrogen concentration. *Int. J. Food Microbiol*. **2014**, *172*, 62–69.
- Lambert, S. G.; Asenstorfer, R. E.; Williamson, N. M.; Iland, P. G.; Jones, G. P. Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chem*. **2011**, *125*, 106–115.
- Lambrechts, M.G; Pretorius, I.S. Yeast and its importance to wine aroma. *S.Afr.J.Enol.Vitic*. **2000**, *21*, 97-129
- Le Roux, G.; Eschenbruch, R.; de Bruin, S.I. The microbiology of south african wine-making. Part VIII. The microflora of healthy and *Botrytis cinerea* infected grapes. *Phytophylactica*. **1973**, *5*, 51–54.
- Lee, C. B.; Lawless, H. T. Time-course of astringent sensations. *Chem. Senses* **1991**, *16*, 225–238.

- Lema, C.; Garcia-Jares, C.; Orriols, I.; Angulo, L. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of albariño wine aroma. *Am.J. Enol. Vitic.* **1996**, 47, 206-216.
- Leroy, M. J.; Charpentier, M.; Duteurtre, B.; Feuillat, M.; Charpentier, C. Yeast autolysis during champagne aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, 41, 21-28.
- Lesage, G.; Bussey, H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2006**, 70, 317-343.
- Liao, H.; Cai, Y.; Haslam, E. Polyphenol interactions. Anthocyanins: co-pigmentation and colour changes in red wines. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, 59, 299-305.
- Liu, S-Q.; Pilone, G. J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2000**, 35, 49-61.
- Liu, Y.X.; Pan, O.H.; Yan, G.L.; He, J.J.; Duan, C.O. Changes of flavan-3-ols with different degrees of polymerization in seeds of shiraz, cabernet sauvignon and marselan grapes after veraison. *Molecules.* **2010**, 15, 7763-7774.
- Llaudy, M.; Canals, R.; Canals, J.; Zamora, F. Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 226, 337-344.
- Lomolino, G.; Curioni, A. Protein haze formation in white wines: effect of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall components prepared with different procedures. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 8737-8744.
- Longo, E.; Cansado, J.; Agrelo, D.; Villa, T. G. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, 42, 141-144.
- Louw, C.; La Grange, D.; Pretorius, I. S.; van Rensburg, P. The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavour. *Journal of biotechnology.* **2006**, 125, 447-461.
- Lubbers S, Leger B, Charoentier C and Feuillat M. Effect des colloïdes-protecteurs d'extraits de parois de levures sur la stabilité tartrique d'un vin modèle. *J Int Sci Vigne Vin.* **1993**, 27, 13-22
- Lubbers, S.; Voilley, A.; Feuillat, M.; Charpentier, C. Influence of mannoproteins from yeast on the aroma intensity of a model wine. *LWT - Food Sci. Technol.* **1994**, 27, 108-114.

- Luck, G.; Liao, H.; Murray, N. J.; Grimmer, H. R.; Warminski, E. E.; Williamson, M. P.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*. **1994**, 37, 357–371.
- Magyar, I.; Panyik, I. Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Ca-alginate gel. *Am J Enol Viticult*. **1989**, 40, 233–240.
- Manzanares, P.; Ramón, D.; Querol, A. Screening of Non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of beta-D- xylosidase activit. *Int. J. Food Microbiol*. **1999**, 46, 105–112.
- Marquez, A.; Serratosa, M. P.; Merida, J. Pyranoanthocyanin derived pigments in wine: structure and formation during winemaking. *Journal of Chemistry*. **2013**. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/713028>.
- Martínez, J., Millán, C. y Ortega, J.M. Growth of natural flora during the fermentation of inoculated musts from "Pedro Ximenez" grapes. *S. Afr. J. Enol. Vitic*. **1989**, 10, 31-35.
- Martínez-Rodríguez, A. J.; Carrascosa, A. V; Martín-Álvarez, P. J.; Moreno-Arribas, V.; Polo, M. C. Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **2002**, 29, 314–322.
- Martínez-Rodríguez, A. J.; Polo, M. C. Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *J. Agric. Food Chem*. **2000**, 48, 1081–1085.
- Martínez-Rodríguez, A. J.; Polo, M. C.; Carrascosa, A. V. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *Int. J. Food Microbiol*. **2001**, 71, 45–51.
- Martini, A. y Vaughan-Martini, A. Grape must fermentation: past and present. In: *Yeasts Technology*. Eds.; Spencer, J.F.T; Spencer, M. Springer-Verlag: Berlin; 1990; pp. 105-123.
- Martini, A.; Federici, F.; Rosini, G. A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. *Can J Microbiol*. **1980**, 26, 856– 859
- Masoud, W.; Jespersen, L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of coffea arabica in east africa. *Int. J. Food Microbiol*. **2006**, 110, 291–296.
- Mateo, J. J.; Jimenez, M.; Huerta, T.; Pastor, A. Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol*. **1991**, 14, 153–160.
- Mateus, N.; de Freitas, V. Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during port wine aging. *J. Agric. Food Chem*. **2001**, 49, 5217–5222.

- Mateus, N.; Oliveira, J.; Pissarra, J.; González-Paramás, A. M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C.; Silva, A. M. S.; de Freitas, V. A new vinylpyranoanthocyanin pigment occurring in aged red wine. *Food Chem.* **2006**, 97, 689–695.
- Mateus, N.; Pascual-Teresa, S. de; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V. Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines. *Food Chem.* **2002**, 76, 335–342.
- Mateus, N.; Silva, A. M. S.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V. A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 1919–1923.
- Maturano, Y. P.; Rodríguez Assad, L.A.; Toro, M.E.; Nally, M.C.; Vallejo, M.; Castellanos deFiguerola, L.I.; Combina, M.; Vazquez, F. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, 155, 43–50.
- Matus, J. T.; Loyola, R.; Vega, A.; Peña-Neira, A.; Bordeu, E.; Arce-Johnson, P.; Alcalde, J. A. Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *J. Exp. Bot.* **2009**, 60, 853–867.
- McMahon, H.; Zoecklein, B.W.; Fugelsang, K.; Jasinski, Y. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **1999**, 23, 198–203
- Medina, K.; Boido, E.; Fariña, L.; Gioia, O.; Gomez, M. E.; Barquet, M.; Gaggero, C.; Dellacassa, E.; Carrau, F. Increased flavour diversity of chardonnay wines by spontaneous fermentation and Co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chem.* **2013**, 141, 2513–2521.
- Mirabel, M.; Saucier, C.; Guerra, C.; Glories, Y. Copigmentation in model wine solutions: occurrence and relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, 50, 211–218.
- Moine-Ledoux V.; Dulau L.; Dubourdieu D. Interprétation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin.* **1992**, 26, 239-51.
- Moine-Ledoux, V.; Dubourdieu, D. Rôle des mannoprotéines de levures vis-à-vis de la stabilisation tartrique des vins. *Bulletin de l'O.I.V.* **2002**, 75, 471-482.
- Moine-Ledoux, V.; Perrin, A.; Paladin, I.; Dubourdieu, D. First Result of Tartaric Stabilization by Adding Mannoproteins (MannostabTM) *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin.* **1997**, 31, 23–31.
- Molina, M.; Gil, C.; Pla, J.; Arroyo, J.; Nombela, C. Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc Res Techniq.* **2000**, 51, 601–612.

- Morata, A.; Gómez-Cordovés, M. C.; Colomo, B.; Suárez, J. A. Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of vitis vinifera L. cv Graciano grapes. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, 220, 341–346.
- Morata, A.; Gómez-Cordovés, M. C.; Colomo, B.; Suárez, J. A. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with vitisin A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 7402–7409.
- Morata, A.; Gómez-Cordovés, M. C.; Suberviola, J.; Bartolomé, B.; Colomo, B.; Suárez, J. A. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4084–4088.
- Moreira, N.; Mendes, F.; de Pinho, P.; Hogg, T.; Vasconcelos, I. Heavy Sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, 124, 231–238.
- Moreno-Arribas, V.; Pueyo, E.; Nieto, F. J.; Martín-Álvarez, P. J.; Polo, M. C. Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chem.* **2000**, 70, 309–317.
- Moreno-Arribas, V.; Pueyo, E.; Polo, M. C. Peptides in musts and wines changes during the manufacture of cava (sparkling wines). *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 3783–3788.
- Moreno-Arribas, V.; Pueyo, E.; Polo, M. C.; Martín-Álvarez, P. J. Changes in the amino acid composition of the different nitrogenous fractions during the aging of wine with yeasts. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4042–4051.
- National Geographic. Causes of global warming. **2013**.
<http://environment.nationalgeographic.com/environment/global-warming/gw-causes/>
- Noble, A. C.; Bursick, G. F. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1984**, 35, 110–112.
- Nunan KJ, Sims IM, Bacic A, Robinson SP and Fincher GB, Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiol.* **1998**, 118, 783–792.
- Nuñez, Y. P.; Carrascosa, A. V.; González, R.; Polo, M. C.; Martínez-Rodríguez, A. J. Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7232–7237.
- Nuñez, Y. P.; Carrascosa, A. V.; González, R.; Polo, M. C.; Martínez-Rodríguez, A. Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 7898–7903.

- Ocón, E.; Gutiérrez, A. R.; Garijo, P.; López, R.; Santamaría, P. Presence of non-*Saccharomyces* Yeasts in cellar equipment and grape Juice during harvest time. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 1023–1027.
- Oro, L.; Ciani, M.; Comitini, F. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *116*, 1209-1217
- Osmond, B. C.; Specht, C.A.; Robbins, P.W. Chitin synthase III: synthetic lethal mutants and “stress related” chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 localization pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, *96*, 11206–11210.
- Palomero, F.; Morata, A.; Benito, S.; Calderón, F.; Suárez-Lepe, J. A. New genera of yeasts for over-lees aging of red wine. *Food Chem.* **2009**, *112*, 432–441.
- Palomero, F.; Morata, A.; Benito, S.; González, M. C.; Suárez-Lepe, J. A. 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 Chem.* **2007**, *105*, 838–846.
- Parish, M. E.; Carroll, D. E. Indigenous yeasts associated with Muscadine (vitis rotundifolia) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, *36*, 165–169.
- Pellerin, P.; Doco, T.; Vida, S.; Williams, P.; Brillouet, J.-M.; O'Neill, M. A. Structural characterization of red wine Rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.* **1996**, *290*, 183–197.
- Pellerin, P.O.; Neill, M.A.; Pierre, C.; Cabanis, M.T.; Darvill, A.G.; Albersheim, P.; Moutounet, M. Complexation du plomb dans les vins par les dimères de rhamnogalacturonane II, un polysaccharide pectique du raisin. *J Int Sci Vigne.Vin.* **1997**, *31*, 33-41.
- Pérez, G.; Fariña, L.; Barquet, M.; Boido, E.; Gaggero, C.; Dellacassa, E.; Carrau, F. A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: application of esculin glycerol agar (EGA) medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **2011**, *27*, 47–55
- Pérez-Serradilla, J. A.; de Castro, M. D. L. Role of lees in wine production: a review. *Food Chem.* **2008**, *111*, 447–456.
- Plata, C.; Millán, C.; Mauricio, J. C.; Ortega, J. M. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* **2003**, *20*, 217–224.
- Polsinelli, M.; Romano, P.; Suzzi, G.; Mortimer, R. Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape wine. *Lett. Appl. Microbiol.* **1996**, *23*, 110–114.
- Poncet-Legrand, C.; Doco, T.; Williams, P.; Vernhet, A. Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: effect of polysaccharide molecular weight. *Am. J. Enol. Vitic.* **2007**, *58*, 87–91.

- Popolo, L.; Gilardelli, D.; Bonfante, P.; Vai, M. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1D mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **1997**, 179, 463–469
- Porter, J. H.; Parry, M. L.; Carter, T. R. The potential effects of climatic change on agricultural insect pests. *Agric. For. Meteorol.* **1991**, 57, 221–240.
- Porter, L. J.; Hrstich, L. N.; Chan, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry.* **1985**, 25, 223–230.
- Postel, W.; Adams, L. Effect of yeast contact and storage time on the volatile components of wine. *Mitt.Klostern.* **1987**, 37, 54–56.
- Pozo-Bayón, M. Á.; Andujar-Ortiz, I.; Alcaide-Hidalgo, J. M.; Martín-Álvarez, P. J.; Moreno-Arribas, M. V. Characterization of commercial inactive dry yeast preparations for enological use based on their ability to release soluble compounds and their behavior toward aroma compounds in model wines. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 10784–10792.
- Pretorius, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* **2000**, 16, 675–729.
- Pretorius, I. S.; Bauer, F. F. Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 426–432.
- Pretorius, I.S.; Van der Westhuizen, T.I.; Augustyn, O.P.H. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1999**, 20, 61-74.
- Preys, S.; Mazerolles, G.; Courcoux, P.; Samson, A.; Fischer, U.; Hanafi, M.; Bertrand, D.; Cheynier, V. Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, 563, 126–136.
- Prinz, J. F.; Lucas, P. W. Saliva tannin interactions. *J. Oral Rehabil.* **2000**, 27, 991–994.
- Pueyo, E.; Martín-Álvarez, P. J.; Polo, M. C. Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cava (sparkling wines). *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, 46, 518–524.
- Querol, A.; Jiménez, M.; Huerta, T. A study on microbiological and enological parameters during fermentation musts from poor and normal grape-harvest in the region of Alicante (Spain). *J. Food Sci.* **1990**, 55, 114-122.
- Quijada-Morín, N.; Regueiro, J.; Simal-Gándara, J.; Tomás, E.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, M. T. Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 12355–12361.

- Quijada-Morín, N.; Williams, P.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Doco, T.; Escribano-Bailón, M. T. Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chem.* **2014**, 154, 44–51.
- Quiroga, S.; Iglesias, A. A comparison of the climate risks of cereal, citrus, grapevine and olive production in Spain. *Agric. Syst.* **2009**, 101, 91–100.
- Quirós, M.; Rojas, V.; Gonzalez, R.; Morales, P. Selection of non-Saccharomyces yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, 181, 85–91.
- Rainieri, S.; Pretorius, I.S. Selection and improvement of wine yeasts. *Ann Microbiol.* **2000**, 50, 15–31
- Randall, R.C.; Phillips, G.O.; Williams, P.A. The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocolloids.* **1988**, 2, 131–140
- Rankine, B. C. Decomposition of L-Malic Acid by Wine Yeasts. *J. Sci. Food Agric.* **1966**, 17, 312–316.
- Razmkhab, S. Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 7432–7437.
- Reed, G.; Nagodawithana, T.W. Technology of yeast usage in winemaking. *Am J Enol. Vitic.* **1988**, 39, 83–90.
- Regueiro, L. A.; Costas, C. L.; Rubio, J. E. L. Influence of viticultural and enological practices on the development of yeast populations during winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, 44, 405–408.
- Remy-Tanneau, S.; Le Guernevé Christine; Meudec, E.; Cheynier, V. Characterization of a colorless anthocyanin–flavan-3-ol dimer containing both carbon–carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 3592–3597.
- Renouf, V.; Strehaiano, P.; Lonvaud-Funel, A. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin*, **2007**, 41, 51–61.
- Rentzsch, M.; Schwarz, M.; Winterhalter, P.; Blanco-Vega, D.; Hermosín-Gutiérrez, I. Survey on the content of vitisin A and hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Tempranillo Wines. *Food Chem.* **2010**, 119, 1426–1434.
- Ribeiro, T.; Fernandes, C.; Nunes, F. M.; Filipe-Ribeiro, L.; Cosme, F. Influence of the Structural Features of Commercial Mannoproteins in White Wine Protein Stabilization and Chemical and Sensory Properties. *Food Chem.* **2014**, 159, 47–54.

- Ribéreau- Gayon, P. Reflexions sur les causes et conséquences des arrêts de la fermentation alcoolique en vinification *J. Int. Sci. Vigne. Vin.* **1999**, 33,39-48
- Ribéreau-Gayon, P. New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, 36, 1–10.
- Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. Estabilización y tratamientos En *Tratado de Enología: Química del vino*. Hemisferio sur y ediciones Mundi-Prensa (1ª ed.), Buenos Aires (Argentina); 2003; vol. 2
- Río Segade, S.; Torchio, F.; Giacosa, S.; Ricauda Aimonino, D.; Gay, P.; Lambri, M.; Dordoni, R.; Gerbi, V.; Rolle, L. Impact of several pre-treatments on the extraction of phenolic compounds in winegrape varieties with different anthocyanin profiles and skin mechanical properties. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 8437–8451.
- Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T.; Moutounet, M. Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocoll.* **2002**, 16, 17–23.
- Rivas-Gonzalo, J. C.; Bravo-Haro, S.; Santos-Buelga, C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1444–1449.
- Rodríguez, M.; Lezáun, J.; Canals, R.; Llaudy, M. C.; Canals, J. M.; Zamora, F. Influence of the presence of the lees during oak ageing on colour and phenolic compounds composition of red wine. *Food Sci. Technol. Int.* **2005**, 11, 289–295.
- Rojas, V. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, 86, 181–188.
- Rojas, V.; Gil, J. V.; Piñaga, F.; Manzanares, P. Studies on acetate ester production by Non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, 70, 283–289.
- Romano, P. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, 86, 169–180.
- Romano, P.; Suzzi, G.; Comi, G.; Zironi, R. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* **1992**, 73, 126–130.
- Romero, C.; Bakker, J. Anthocyanin and colour evolution during maturation of four port wines: effect of pyruvic acid addition. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, 81, 252–260.
- Romero, P.; Gil-Muñoz, R.; del Amor, F. M.; Valdés, E.; Fernández, J. I.; Martínez-Cutillas, A. regulated deficit irrigation based upon optimum water status improves phenolic composition in monastrell grapes and wines. *Agric. Water Manag.* **2013**, 121, 85–101.
- Romero, P.; Muñoz, R. G.; Fernández-Fernández, J. I.; del Amor, F. M.; Martínez-Cutillas, A.; García-García, J. Improvement of yield and grape and wine

- composition in field-grown monastrell grapevines by partial root zone irrigation, in comparison with regulated deficit Irrigation. *Agric. Water Manag.* **2015**, 149, 55–73.
- Romo-Sánchez, S.; Alves-Baffi, M.; Arévalo-Villena, M.; Úbeda-Iranzo, J.; Briones-Pérez, A. Yeast biodiversity from oleic ecosystems: study of their biotechnological properties. *Food Microbiol.* **2010**, 27, 487–492.
- Rosi, I.; Vinella, M.; Domizio, P. Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of enological origin. *J Appl Bacteriol.* **1994**, 77, 519–527.
- Rosini, G.; Federici, F.; Martini, A. Yeast flora of grape berries during ripening. *Microb. Ecol.* **1982**, 8, 83–89.
- Ryan, J.-M.; Revilla, E. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 3372–3378.
- Sabaté, J.; Cano, J.; Esteve-Zarzoso, B.; Guillamón, J. M. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* **2002**, 157, 267-274.
- Sabate; Cano; Querol; Guillamón. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* **1998**, 26, 452–455.
- Sadineni, V.; Kondapalli, N.; Obulam, V. Effect of co-Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine. *Ann. Microbiol.* **2012**, 62, 1353–1360.
- Salagoity, M.-H.; Guyon, F.; René, L.; Gaillard, L.; Lagrèze, C.; Domec, A.; Baudouin, M.; Médina, B. Quantification method and organoleptic impact of added carboxymethyl cellulose to dry white wine. *Anal. Methods.* **2011**, 3, 380–384.
- Salmon, J. M.; Fornairon-Bonnefond, C.; Mazauric, J. P. Interactions between wine lees and polyphenols: influence on oxygen consumption capacity during simulation of wine aging. *J. Food Sci.* **2002**, 67, 1604–1609.
- Sarni-Manchado, P.; Fulcrand, H.; Souquet, J.-M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *J. Food Sci.* **1996**, 61, 938–941.
- Saucier, C.; Little, D.; Glories, Y. First evidence of acetaldehyde-flavanol condensation products in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, 48, 370–373.
- Schuller, D.; Alves, H.; Dequin, S.; Casal, M. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from Vineyards in the vinho verde region of Portugal. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2005**, 51, 167–177.

- Schultz, H. Climate change and viticulture: a european perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2000**, 6, 2–12.
- Schütz, M.; Gafner, J. Analysis of Yeast Diversity During Spontaneous and Induced Alcoholic Fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* **1993**, 75, 551-558.
- Schwarz, M.; Wabnitz, T. C.; Winterhalter, P. Pathway Leading to the Formation of Anthocyanin–Vinylphenol Adducts and Related Pigments in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003a**, 51, 3682–3687.
- Schwarz, M.; Jerz, G.; Winterhalter, P. Isolation and structure of Pinotin A, a new anthocyanins derivative from Pinotage wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003b**, 51, 3682-3687
- Segarra, I.; Lao, C.; López-Tamames, E.; De La Torre-Boronat, M. C. Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, 46, 564–570.
- Siebert, K. J.; Lynn, Y. Effect of protein-polyphenol ratio on the size of haze particles. *J. Am Soc. Brew. Chem.* **2003**, 58, 117-123
- Silva, S.; Ramón-Portugal, F.; Andrade, P.; Abreu, S.; Texeira, M. De; Strehaiano, P. Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*. **2003**. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 50–55.
- Sipiczki, M. *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 6716–6724.
- Snow, P. G.; Gallander, J. F. Deacidification of white table wines through partial fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* **1979**, 30, 45–48.
- Soden, A.; Francis, I.L; Oakey, H.; Henschke, P.A. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust J Grape Wine Res.* **2000**, 6, 21–30.
- Soubeyrand, V.; Luparia, V.; Williams, P.; Doco, T.; Vernhet, A.; Ortiz-Julien, A.; Salmon, J.M. Formation of micella containing solubilized sterols during rehydration of active dry yeasts improves their fermenting capacity. *J Agric Food Chem.* **2005**, 53, 8025-32
- Souquet, J.-M.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Moutounet, M. Polymeric Proanthocyanidins from Grape Skins. *Phytochemistry.* **1996**, 43, 509–512.
- Spayd, S. E.; Tarara, J. M.; Mee, D. L.; Ferguson, J. C. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, 53, 171–182.

- Strauss, M.; Jolly, N.; Lambrechts, M.; van Rensburg, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeast. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, 91, 182–190
- Suárez, J.A.; Íñigo, B. Vinificación del mosto de uva. Fermentación alcohólica. En *Microbiología Enológica. Fundamentos de vinificación*. Eds.; Suárez, J. A.; Íñigo, B.; Agrovin, S.A, Lallemand bio, S.L Grupo mundi—prensa, Barcelona, Spain; 2004; pp.185–219
- Suomalainen, H.; Lehtonen, M. The production of aroma compounds by yeast. *J. Inst. Brew.* **1979**, 85, 149-156
- Swiegers, K.H.; Bartowsky, E. J.; Henschke, P. A.; Pretorius, I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, 11, 139–173.
- Tabera, L.; Muñoz, R.; Gonzalez, R. Deletion of BCY1 from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotypes suitable for improvement of sparkling Wines. *Appl Environ Microbiol.* **2006**; 72, 2351–2358.
- Tate, A. B. Global warming's impact on wine. *J. Wine Res.* **2001**, 12, 95–109.
- Timberlake, C. F.; Bridle, P. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1976**, 27, 97–105.
- Todd, B. E. N.; Fleet, G. H.; Henschke, P. A. Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, 51, 65–72.
- Todd, B.E.N. Enhancing the sensory properties of wine using p-glycosidase activity of wine micro-organisms. *Aust. Grape Winemaker.* **1995**, 382, 22-23.
- Tofalo, R.; Schirone, M.; Torriani, S.; Rantsiou, K.; Cocolin, L.; Perpetuini, G.; Suzzi, G. Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiol.* **2012**, 29, 18–26.
- Torija, M.J.; Rozès, N.; Poblet, M.; Guillamón, J.M, Mas, A. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *A. van Leeuw.* **2001** 79, 345-352.
- Toro, M.E.; Vazquez, F. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarelli* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *World J Microbiol Biotechnol.* **2002**, 18, 347–354.
- Trioné D ; Martínez A. Elevage sur lies des vins rouges. *Rev. Oenologues.* **2001**, 101, 19-21.

- Troton, D.; Charpentier, M.; Robillard, B.; Calvayrac, R.; Duteurtre, B. Evolution of the lipid contents of champagne wine during the second fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, 40, 175–182.
- Urso, R.; Rantsiou, K.; Dolci, P.; Rolle, L.; Comi, G.; Cocolin, L. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Res.* **2008**, 8, 1053-1062.
- Valdivieso, M. H.; Ferrario, L.; Vai, M.; Duran, A.; Popolo, L. Chitin synthesis in a gas1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 4752–4757.
- Valero, E.; Cambon, B.; Schuller, D.; Casal, M.; Dequin, S. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res.* **2007**, 7, 317–329.
- Van der Walt, J.P.; Van Kerken, A.E. The wine yeasts of the cape I. A taxonomical survey of the yeasts causing turbidity in south african table wines. *Antoine Van Leeuwenhoek.* **1958**, 24, 239–252.
- van Rensburg, P.; Pretorius, I.S. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2000**, 21, 52–73
- Van Zyl, J.A.; De Vries, M.J.; Zeeman, A.S. The microbiology of South African winemaking. III. The effect of different yeasts on the composition of fermented musts. *S. Afr. J. Agric. Sci.* **1963**, 6, 165-179
- Van Zyl, J.A.; Du Plessis, L.W. The microbiology of south african winemaking. Part I. The yeasts occurring in vineyards, must and wines. *S Afr J Agric Sci.* **1961**, 4, 393–403.
- Vanrell, G.; Canals, R.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J.M.; Zamora, F. Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chem.* **2007**, 104, 148-155.
- Varela, C.; Siebert, T.; Cozzolino, D.; Rose, L.; McLean, H.; Henschke, P.A. Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with ‘wild’ indigenous and inoculated yeasts: role of yeast volatile compounds. *Aust J Grape Wine Res.* **2009**, 15, 238–248.
- Venkataramanan, M.; Smitha. Causes and effects of global warming. *Ind. J. Sci. Technol.* **2011**, 3, 226–229.
- Versavaud, A.; Courcoux, P.; Roulland, C.; Dulau, L.; Hallet, J. N. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, 61, 3521–3529.

- Vezinhet, F.; Hallet, J.-N.; Valade, M.; Poulard, A. Ecological Survey of Wine Yeast Strains by Molecular Methods of Identification. *Am. J. Enol. Vitic.* **1992**, 43, 83–86.
- Vidal, S.; Cartalade, D.; Souquet, J.-M.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 2261–2266.
- Vidal, S.; Doco, T.; Moutounet, M.; Pellerin, P. Soluble polysaccharide content at initial time of experimental must preparation. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, 51, 115–121.
- Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E. J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.* **2003a**, 83, 564–573.
- Vidal, S.; Francis, L.; Williams, P.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chem.* **2004**, 85, 519–525.
- Vidal, S.; Williams, P.; Doco, T.; Moutounet, M.; Pellerin, P. The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization. *Carbohydr. Polym.* **2003b**, 54, 439–447.
- Vidal, S.; Williams, P.; O'Neill, M. A.; Pellerin, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **2001**, 45, 315–323.
- Vivar-Quintana, A. M.; Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E.; Rivas-Gonzalo, J. C. Formation of anthocyanin-derived pigments in experimental red wine. *Food Sci. Technol. Int.* **1999**, 5, 347–352.
- Vivar-Quintana, A. M.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Anal. Chim. Acta.* **2002**, 458, 147–155.
- Waters, E. J.; Pellerin, P.; Brillouet, J.-M. A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydr. Polym.* **1994**, 23, 185–191.
- Yamaguchi, M.; Namiki, Y.; Okada, H.; Mori, Y.; Furukawa, H.; Wang, J.; Ohkusu, M.; Kawamoto, S. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* determined by freeze-substitution and serial ultrathin-sectioning electron microscopy. *J Electron Microsc.* **2011**, 60, 321–335.
- Yeves, A.; Pérez, D.; Risco, D.; Intrigliolo, D. S.; Castel, J. R. Water stress as a strategy to improve grape composition in *Vitis vinifera* “Tempranillo” in Spain? *Acta Horticulturae.* **2011**, 889, 75–82.
- Zamora, F. La madurez fenólica; Un tema abierto. *Enólogos.* **2002**, 18, 24–28.

Zamora, F. Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. Ed.; Zamora, F. AMV Ediciones/Mundi-Prensa, Madrid. **2003**

Zamora, F. La química del color del vino. *Acenologia*. **2013**
http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/quimica_color_vino_cienc1213.htm

Zhao, J.; Fleet, G. H. Degradation of DNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30*, 175–182.

Zhao, J.; Fleet, G. H. Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* produces predominantly ribonucleotides. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *32*, 415–423.

Zohre, D. E. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochem.* **2002**, *38*, 319–324.

Zott, K.; Thibon, C.; Bely, M.; Lonvaud-Funel, A.; Dubourdieu, D.; Masneuf-Pomarede, I. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *151*, 210–215.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cambio climático es una realidad irrefutable que está afectando al cultivo de la vid. Las primaveras más secas y los veranos más cálidos aceleran el metabolismo primario de la vid y pueden provocar una cierta deshidratación de las bayas. En esta situación se produce una acumulación más rápida de azúcares así como una mayor disminución de su acidez lo que obliga a avanzar la fecha de vendimia. Sin embargo, otros compuestos que condicionan la calidad del futuro vino, como son las sustancias volátiles y sus precursores, los nutrientes, los compuestos fenólicos, etc., no necesariamente evolucionan al mismo ritmo y por lo general en el momento de la vendimia no alcanzan el nivel necesario para la elaboración de vinos de calidad.

Ante esta situación, el dilema que se plantean los enólogos es como deben adaptar la vinificación a fin de paliar las posibles carencias de sus uvas. En este contexto, la **hipótesis** que se plantea el presente estudio es la siguiente:

“La aplicación de las nuevas herramientas que ofrece la biotecnología actual pueden ser útiles para compensar la madurez inadecuada de la uva y permitir por tanto mejorar la calidad de los vinos”

Con el fin de confirmar la hipótesis, se plantearon los siguientes **objetivos**:

1. Evaluar el efecto de la madurez de la uva sobre las características espumantes en vinos base y sus correspondientes cavas.
2. Evaluar la utilidad de la inoculación secuenciada con dos levaduras No-*Saccharomyces* (TD y MP) y *Saccharomyces cerevisiae* sobre la composición y características espumantes en los vinos bases.
3. Evaluar el impacto de la inoculación de una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) con alta capacidad de liberación de polisacáridos sobre la composición del vino tinto.
4. Evaluar el impacto de la suplementación con levaduras secas inactivas sobre la composición del vino tinto.

III. RESULTADOS

Capítulo I. Influencia de la madurez de la uva en las propiedades espumantes de los vinos bases y sus correspondientes Cavas.

El efecto en la madurez de la uva que provoca el cambio climático ha sido extensamente estudiado, sobre todo en vinos tintos. La obtención de vinos con alta graduación, acidez más baja y pH más alto es su principal consecuencia, lo que tiene una indudable influencia directa en la calidad de los vinos base y los Cavas. Por esta razón, la decisión de la fecha de vendimia se ha convertido en un dilema para los elaboradores. ¿Qué es mejor? Vendimiar antes y enriquecer si es necesario, o esperar a una mayor madurez y acidificar.

La decisión de la fecha óptima de vendimia se debe guiar no solo por los parámetros grado y acidez, que son fáciles de corregir en la bodega, sino por aquellos otros aspectos no corregibles que verdaderamente determinan la calidad del producto. Dadas las características particulares de los Cavas, las propiedades espumantes son probablemente el parámetro de mayor importancia.

En este capítulo se aborda el objetivo 1, en el que se plantea caracterizar químicamente los vinos base y Cavas elaborados con uvas de distinto nivel de madurez, con el objetivo de evaluar el efecto de la maduración sobre la calidad de la espuma, y determinar los principales factores que influyen en las características espumantes de los vinos bases y espumosos.

Para ello, uvas de las variedades Macabeo, Xarel.lo, Parellada y Chardonnay fueron cosechadas a dos niveles distintos de madurez. La primera cosecha se seleccionó en función de la acidez que se desea para este tipo de producto, y la segunda se seleccionó cuando la uva se encontraba en la concentración óptima de azúcar. Los mostos de la uva más verde se enriquecieron con mosto concentrado rectificado mientras que los de la uva más madurase acidificaron con ácido tartárico a fin de alcanzar los valores deseables. Estos vinos base, así como los correspondientes Cavas tras 14 meses de crianza, fueron analizados con el fin de dar respuesta al objetivo planteado.

Las analíticas de los vinos obtenidos fueron realizadas en el laboratorio del grupo *Tecnología Enológica* (TECNENOL) del departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili (URV, Tarragona). Los resultados del ensayo fueron publicados en *Journal of the Science of Food and Agriculture* en el artículo titulado **“Influence of grape maturity on the foaming properties of base wines and sparkling wines (Cava).”**

Influence of grape maturity on the foaming properties of base wines and sparkling wines (Cava)

Mireia Esteruelas,^a Elena González-Royo,^a Nikolaos Kontoudakis,^a Antonio Orte,^b Antoni Cantos,^b Joan Miquel Canals^a and Fernando Zamora^{a*}

Abstract

BACKGROUND: The aim of this paper is to determine the main factors that influence the foaming properties of base wines and sparkling wines and, in particular, the role played by the maturity of the grapes in the controlled designation of origin (CDO) Cava. Macabeo, Xarel.lo, Parellada and Chardonnay grapes were harvested at two different maturity levels in two vintages. The first harvest was selected because of its desirable titratable acidity and the second because of its optimal sugar concentration. The mono-varietal base wines and standard blends were transformed into sparkling wines and aged for 14 months.

RESULTS: The results indicate that the main factors affecting foam properties are ethanol content, high molecular weight polysaccharides and gluconic acid (which have a negative effect), and proteins (which have a positive effect).

CONCLUSION: The main conclusion of this study is that the foaming properties of wines can be improved if harvest dates are advanced.

© 2014 Society of Chemical Industry

Keywords: grape maturity; base wine; sparkling wine; foaming properties

INTRODUCTION

Although it seems obvious, foam is the main factor that determines the quality of sparkling wines.¹ The ability of sparkling wines to form a stable collar is considered by consumers to be a criterion of quality.² Other aspects such as taste or aroma also play an important role, but the effervescence and persistence of foam are the differential attributes of sparkling wines and are therefore paramount in any assessment of quality.^{3,4} For this reason, winemakers are very interested in understanding the factors that affect the foamability of wine.

Some studies have shown that the foaming properties of sparkling wines are closely related to their chemical composition^{2,5,6} which, in turn, depends on such factors as varietal origin, grape maturity and winemaking conditions.^{7–10} In this regard it seems that foam stability is significantly favoured by the presence of surface active agents which can stabilise foam by settling at the bubble's film, their hydrophobic head turned towards the gas, and their hydrophilic tail turned towards the aqueous phase.^{11,12} Of the various foam active substances, proteins and polysaccharides seem to play a major role because of their surface properties.^{2,13–15}

Wine proteins are relatively small, with molecular weights (MWs) between 9.6 and 60 kDa, and acidic, with isoelectric points between 3.5 and 7.6.^{16,17} The major proteins in wine are thaumatin-like proteins (MW around 24 kDa), chitinases (MW around 30 kDa) and invertase (MW around 60 kDa).¹⁸ However, all proteins do not contribute equally to the foaming properties of wines. It has been shown that hydrophobic proteins contribute

more to foam constitution than hydrophilic proteins.² In this regard, it has been reported that thaumatin-like proteins and invertase are involved in promoting positive sparkling wine foam properties whereas chitinases do not seem to have any effect.^{19,20}

Some proteins such as thaumatin-like proteins, β -(1,3)-glucanases and chitinases can also cause the appearance of protein haze.^{16,17} To eliminate this risk, winemakers often treat white wines with bentonite.²¹ However, bentonite can negatively affect the foaming properties of sparkling wines because it eliminates some of the foam active proteins.^{19,22,23}

There are several types of grape polysaccharide, but many of them are enzymatically degraded or precipitated during alcoholic fermentation, so wine only contains appreciable amounts of arabinogalactan-proteins and type II rhamnogalacturonan.^{24,25} The other major source of wine polysaccharides is yeasts, which can release significant amounts of mannoproteins.²⁶ Not much is known about the influence of grape polysaccharides on the

* Correspondence to: Fernando Zamora, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Grup de Recerca en Tecnologia Enològica (Tecnenol), Universitat Rovira i Virgili, Campus de Sescelades, c/Marcel·li Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain. E-mail: fernando.zamora@urv.cat

^a Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Grup de Recerca en Tecnologia Enològica (Tecnenol), Universitat Rovira i Virgili, Campus de Sescelades, c/Marcel·li Domingo s/n, 43007, Tarragona, Spain

^b Juvé y Camps SA, c/Sant Venat, 1, 08770 Sant Sadurní d'Anoia, Barcelona, Spain

properties of foam. However, positive effects have been attributed to the mannoproteins released by yeasts during alcoholic fermentation and especially during the autolysis that occurs in the bottle during the aging of sparkling wines.^{27–29}

Botrytis cinerea grape infection has been reported to reduce wine foamability.^{20,30} One probable cause of this is that the proteases secreted by this fungus can degrade grape proteins so that most proteins in healthy grape juice disappear completely in the infected must.^{20,31,32} Grey rot also has a considerable influence on polysaccharide concentration.³³ In fact, it has been reported that *Botrytis cinerea* releases large amounts of β -glucans, which can cause some technological problems.³⁴

Ethanol also plays an important role in foaming properties because it participates in the gas–liquid interface and acts on other surfactant adsorption.^{35,36} In general, high ethanol concentrations are considered to have a negative effect on the foamability of sparkling wines.³⁷

Other components in wine can also have an effect on foam characteristics.^{5,13,37–39} Mathematical models have even been proposed to predict foaming properties from the chemical composition of wine.⁴⁰ However, although the literature on the subject is extensive, published data are inconclusive and sometimes contradictory.

The increase in temperature and the changes in rainfall distribution caused by climate change probably affect vine and grape physiology, and consequently impact upon wine composition and quality.^{41,42} If the temperature during ripening is higher than the optimum, the grape pulp matures faster, and the pH and sugar concentration are too high. For this reason, the date of the harvest in the controlled designation of origin (CDO) Cava has been advanced in recent years. This has made some winemakers have doubt about the best date for harvest especially with regard to those aspects that affect the quality of the foam of the sparkling wines.

For these reasons the aim of this paper was to study the influence of the date of harvest on the foaming properties of sparkling wines of AOC Cava and to determine which other factors also have an impact.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

All products were of high purity and were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Ammonium formate ($\geq 99.0\%$) and ammonium acetate ($\geq 98.0\%$) were suitable for high-performance liquid chromatography (HPLC). All solutions were previously filtered through $0.22\ \mu\text{m}$ acetate cellulose filters (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and degassed using an ultrasonic water bath.

Grapes and base wines

The experiment was carried out with Macabeo, Xarel.lo and Parellada grapes from the 2009 vintage and Macabeo, Xarel.lo and Chardonnay grapes from 2010. Parellada grapes were substituted by Chardonnay grapes in 2010 vintage because this cultivar did not reach suitable sugar content. All these white grapes were from the Juvé & Camps SL vineyards in Sant Sadurní d'Anoia (AOC Cava, Spain; $41^\circ 26' 47.42''$ N and $1^\circ 49' 0.63''$ E). Grapes were harvested at two different maturity levels during two consecutive vintages (2009 and 2010). The harvest dates were selected when the titratable acidity (first harvest) or sugar content (second harvest) were suitable. The suitable value for titratable acidity was between 8 and $9\ \text{g L}^{-1}$ (expressed as tartaric acid) with the only exception of

Chardonnay that was of $11\ \text{g L}^{-1}$. The suitable value for sugar content was between 170 and $180\ \text{g L}^{-1}$ (between 10.5 and 11.0% of potential ethanol content) with the only exception of Parellada because this cultivar hardly reaches a sugar content higher than $145\ \text{g L}^{-1}$.

Batches of $150\ \text{kg}$ of grapes were pressed to obtain a yield of $0.6\ \text{L kg}^{-1}$ of grape juice. All the experiments were carried out in triplicate for each experimental condition. The grape juices were immediately sulfited with $120\ \text{mg L}^{-1}$ of $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ and pectinolytic enzymes ($20\ \text{mg L}^{-1}$, Lallzyme C; Lallemand Inc., Montreal, Canada) were added to facilitate settling. After 24 h, clean grape juices (around $70\ \text{L}$ each) were racked into 100-L stainless steel tanks and were immediately inoculated with selected yeasts ($200\ \text{mg L}^{-1}$ PDM; Agrovin, Alcázar de San Juan, Spain). All fermentations were performed at $16\text{--}18^\circ\text{C}$. Two days after the alcoholic fermentation had begun, the tanks of the first harvest – with the only exception of Parellada – were enriched with rectified concentrated must up to a probable alcoholic degree of 10.8% (v/v). Parellada was not enriched because its initial potential ethanol content was much lower, even in the second harvest, so enrichment would have been excessive. In parallel, the musts of the second harvest were acidified with tartaric acid up to a titratable acidity of $7.5\ \text{g L}^{-1}$ expressed as tartaric acid. The aim was to obtain two wines of similar composition for each cultivar but with grapes of different maturities. Once alcoholic fermentations had finished, wines were racked and sulfited with $40\ \text{mg L}^{-1}$ of $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Cold stabilisations were performed at 2°C for 4 weeks.

Once the wines were considered to be stable, aliquots of the mono-varietal wines were used to obtain blended wines. The blending of the 2009 vintage consisted of equal parts of Macabeo, Xarel.lo and Parellada and the blending of the 2010 vintage consisted of equal parts of Macabeo, Xarel.lo and Chardonnay. All the mono-varietal wines and the standard blends were stored in airtight vessels at 4°C until they were analysed and sparkling wines produced (3 months later).

Sparkling wines

All mono-varietal and blended base wines were used in the production of sparkling wines (Cava) with the traditional method. Briefly, all the base wines were supplemented with $22\ \text{g L}^{-1}$ of sucrose, $30\ \text{mg L}^{-1}$ of bentonite as riddling agent (Adjuvant 83; Station Cœnotechnique du Champagne, Epernay, France) and 2×10^6 cells ml^{-1} of a pre-adapted yeast culture (PDM; Agrovin, Alcázar de San Juan, Spain). The wines were then bottled and crown corked. Fourteen months later all sparkling wines were disgorged and analysed.

Sample preparation

All base wines and sparkling wines were degassed by centrifugation ($12\ 000 \times g$ 10 min). The supernatant was used directly for measuring foaming properties and for chemical analysis.

Standard grape and wine analysis

The analytical methods recommended by the OIV were used to determine the potential ethanol⁴³ content and titratable acidity⁴⁴ of the grape juice as well as the ethanol content⁴⁵ and titratable acidity⁴⁴ of the wines.

Gluconic acid analysis

Gluconic acid was analysed by means of a BIOSENSOR AG (Biolan Microbiosensores S.L., Zamudio, Spain) according to the manufacturer's instructions.⁴⁶

Measurement of foaming properties

Wines were degassed by centrifugation ($12\,000 \times g$ 10 min) and tempered at $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h before analysis. All foam measurements were carried out using the Mosalux procedure.^{47,48} A glass cylinder placed on a glass frit was filled with 100 mL of the sample. Carbon dioxide was injected into the glass cylinder through the glass frit with a constant gas flow of 115 mL min^{-1} under a constant pressure of 200 kPa.

Two parameters were measured: H_m , the maximum height reached by the foam after CO_2 injection through the glass frit; and H_s , the stable height during CO_2 injection. H_m represented foamability (the wine's ability to foam) and H_s foam stability (persistence of the foam collar or the wine's ability to have stable foam). Some authors have also measured another parameter: T_s , the time the foam takes to collapse after the gas flow has stopped.⁴⁷ This parameter also represents foam stability but it can only be measured imprecisely so we did not determine it. Both H_m and H_s are expressed in millimetres. All measures were determined in triplicate.

Polysaccharide extraction

Samples were processed using the methodology described by Ayestarán *et al.*⁴⁹ Briefly, 10 mL of sample was concentrated to a final volume of 2 mL using a vacuum evaporator (Univap 148 100ECH; Progen Scientific, London, UK). Total soluble polysaccharides were precipitated by the addition of 10 mL cold acidified ethanol (hydrochloric acid 0.3 mol L^{-1} in absolute ethanol) and kept for 24 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, the samples were centrifuged ($10\,000 \times g$ for 15 min) and the supernatants discarded. Finally, the precipitates were dissolved in 1 mL of ultra pure water, frozen to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and freeze dried using a lyophiliser.

Determination of polysaccharides by HRSEC-RID

In order to determine the molecular distribution and quantify the polysaccharides obtained from samples, the soluble fractions were analysed by high-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC).⁴⁹ The lyophilised samples were resuspended in 1 mL of 50 mmol L^{-1} ammonium formate, filtered through $0.22\text{ }\mu\text{m}$ acetate cellulose filters (Millipore GSE), and then $100\text{ }\mu\text{L}$ was injected into the chromatographic system. The analyses were carried out in an HPLC Agilent 1200 Series system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) with a refractive index detector (RID). Separation was carried out at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ using two different S165 Shodex gel permeation HPLC columns (OHpak 166 SB-803 HQ and SB-804 HQ, $300\text{ mm} \times 8\text{ mm}$ i.d.; Showa Denko Europe GmbH, Munich, Germany). The mobile phase consists of an aqueous solution of 50 mmol L^{-1} ammonium formate applied at a constant flow of 0.6 mL min^{-1} for 70 min, and the temperature of the RID cell was $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

The molecular weight distribution of the wine fractions was followed by calibration with a pullulan calibration kit Shodex P-82 (P-5, MW = 5.9 kDa; P-10, MW = 11.8 kDa; P-20, MW = 22.8 kDa; P-50, MW = 47.5 kDa; P-100, MW = 112 kDa; P-200, MW = 212 kDa; P-400, MW = 404 kDa; P-800, MW = 788 kDa) purchased from Waters (Barcelona, Spain) and four dextrans (BioChemika; 12, 25, 50 and 80 kDa) purchased from Fluka (St. Louis, MO, USA). The polysaccharides were quantified according to the peak area for each fraction using the external standard method with pectin and dextran commercial standards (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in the range between 0 and 2 g L^{-1} ($r^2 > 0.99$).

Preparation of sample proteins

Aliquots of base wines and sparkling base wine (15 mL) were dialysed in tubes with a molecular weight cut-off of 3500 Da (Membrane Filtration Products Inc., San Antonio, TX, USA). The dialysed samples were lyophilised and preserved at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Determination of proteins by HRSEC-DAD

In order to determine the molecular distribution and quantify the proteins obtained from samples, the soluble fractions were analysed by high-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC).⁵⁰ The lyophilised samples were resuspended in $0.6\text{ }\mu\text{L}$ of 300 mmol L^{-1} ammonium acetate and centrifuged ($12\,000 \times g$ for 10 min). The supernatant was filtered through $0.22\text{ }\mu\text{m}$ acetate cellulose filters (Millipore GSE) and then $100\text{ }\mu\text{L}$ of supernatant was injected into the chromatographic system. The analyses were carried out in an HPLC Agilent 1200 Series system (Agilent Technologies) with a diode array detector (DAD) to monitor the output at 230, 280 and 320 nm. Separation was carried out at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ using an S 165 Shodex gel permeation HPLC column (OHpak 166 SB-803 HQ, $300\text{ mm} \times 8\text{ mm}$ i.d.; Showa Denko). The mobile phase consisted of an aqueous solution of 300 mmol L^{-1} ammonium acetate applied at a constant flow of 0.6 mL min^{-1} for 70 min. The proteins were quantified according to the peak area for each fraction using the external standard method with bovine serum albumin (Sigma–Aldrich) in the range between 0 and 10 mg mL^{-1} ($r^2 > 0.99$).

Statistical analysis

One-way ANOVA, Turkey comparison tests, Pearson's correlation of data and principal component analysis were carried out using IBM SPSS Statistics 19 software (International Business Machines S.A., Madrid, Spain).

RESULTS AND DISCUSSION

The potential ethanol content and titratable acidity of grape juices are shown in Table 1. All these data are in accord with the usual values of these parameters for these cultivars.⁵¹ In both vintages, the potential ethanol contents of the first-harvest grapes were significantly lower and the titratable acidities significantly higher than those of the second harvest with the only exception of the potential ethanol content of Parellada grapes. These data confirm that grapes were really harvested at different maturities as the experimental design had intended. The particular case of parellada did not accomplish completely this point probably because this cultivar hardly reaches higher potential ethanol values.⁵¹

Table 1 also shows the ethanol content of base and sparkling wines. In this case, the differences between the ethanol content of base wines from the two harvests were much lower than those observed in the musts, and in some cases were not even significant. The reason is simply that almost all grape juices from the first harvest were enriched with rectified concentrated must so that their values were similar to those of the second harvest. Despite the enrichment, some of the base wines of the second harvest had significantly higher ethanol content than the corresponding base wines of the first harvest. These differences were due to the fact that it was very difficult to adjust the enrichment to the conditions of the winery. Even so, these differences can be regarded as acceptable since they are much smaller than those observed in grape juices, which were somewhat smaller in the case of sparkling wines. The increase in ethanol content of sparkling wines in relation to their corresponding base wines was around 1.4% (v/v) in

Table 1. General parameters of grape juices, base wines and sparkling wines at the first and second harvests

Cultivar	Parameter and ripening stage (harvest)	Grape juice		Base wine		Sparkling wine	
		2009	2010	2009	2010	2009	2010
Macabeo	Ethanol content						
	First	8.9 ± 0.1 ^A	9.2 ± 0.1 ^A	11.0 ± 0.1 ^A	10.5 ± 0.1 ^A	12.4 ± 0.1 ^A	11.8 ± 0.1 ^A
	Second	10.7 ± 0.2 ^B	10.8 ± 0.2 ^B	11.3 ± 0.1 ^A	11.2 ± 0.1 ^B	12.6 ± 0.1 ^A	12.5 ± 0.1 ^B
	Titrateable acidity						
	First	8.9 ± 0.1 ^A	9.2 ± 0.1 ^A	8.6 ± 0.1 ^A	8.3 ± 0.3 ^A	8.3 ± 0.2 ^A	7.9 ± 0.1 ^A
	Second	6.7 ± 0.2 ^B	8.1 ± 0.2 ^B	7.7 ± 0.2 ^B	7.8 ± 0.2 ^A	7.7 ± 0.1 ^B	7.6 ± 0.1 ^A
	Gluconic acid						
	First	–	–	50 ± 2 ^A	50 ± 2 ^A	–	–
	Second	–	–	270 ± 2 ^B	65 ± 3 ^B	–	–
	Xarel.lo	Ethanol content					
First		9.1 ± 0.2 ^A	9.3 ± 0.2 ^A	11.0 ± 0.1 ^A	10.8 ± 0.1 ^A	12.3 ± 0.1 ^A	12.0 ± 0.1 ^A
Second		11.0 ± 0.1 ^B	10.7 ± 0.1 ^B	11.5 ± 0.1 ^B	10.9 ± 0.1 ^A	12.6 ± 0.2 ^A	12.2 ± 0.1 ^A
Titrateable acidity							
First		9.1 ± 0.2 ^A	9.3 ± 0.2 ^A	8.3 ± 0.2 ^A	9.2 ± 0.3 ^A	8.0 ± 0.1 ^A	9.0 ± 0.1 ^A
Second		7.2 ± 0.1 ^B	7.9 ± 0.1 ^B	6.8 ± 0.1 ^B	7.6 ± 0.3 ^B	7.1 ± 0.1 ^B	7.3 ± 0.1 ^B
	Gluconic acid						
	First	–	–	37 ± 1 ^A	50 ± 2 ^A	–	–
	Second	–	–	100 ± 2 ^B	48 ± 3 ^A	–	–
	Parellada	Ethanol content					
First		8.2 ± 0.2 ^A	–	8.6 ± 0.1 ^A	–	10.0 ± 0.1 ^A	–
Second		8.4 ± 0.1 ^A	–	8.8 ± 0.1 ^A	–	10.2 ± 0.1 ^A	–
Titrateable acidity							
First		9.0 ± 0.2 ^A	–	8.7 ± 0.1 ^A	–	8.3 ± 0.1 ^A	–
Second		7.4 ± 0.1 ^B	–	7.0 ± 0.1 ^B	–	6.8 ± 0.1 ^B	–
	Gluconic acid						
	First	–	–	30 ± 1 ^A	–	–	–
	Second	–	–	57 ± 2 ^B	–	–	–
	Chardonnay	Ethanol content					
First		–	9.6 ± 0.1 ^A	–	10.6 ± 0.1 ^A	–	12.0 ± 0.1 ^A
Second		–	11.1 ± 0.2 ^B	–	11.6 ± 0.1 ^B	–	12.8 ± 0.1 ^B
Titrateable acidity							
First		–	11.5 ± 0.1 ^A	–	11.3 ± 0.3 ^A	–	10.8 ± 0.1 ^A
Second		–	9.7 ± 0.2 ^B	–	9.1 ± 0.1 ^B	–	8.8 ± 0.1 ^B
	Gluconic acid						
	First	–	–	–	50 ± 2 ^A	–	–
	Second	–	–	–	90 ± 2 ^B	–	–
	Blend	Ethanol content					
First		–	–	9.9 ± 0.1 ^A	10.7 ± 0.1 ^A	11.4 ± 0.2 ^A	12.1 ± 0.1 ^A
Second		–	–	10.6 ± 0.1 ^B	11.1 ± 0.1 ^B	11.9 ± 0.1 ^B	12.5 ± 0.1 ^B
Titrateable acidity							
First		–	–	8.6 ± 0.1 ^A	9.4 ± 0.1 ^A	8.7 ± 0.2 ^A	9.1 ± 0.1 ^A
Second		–	–	7.1 ± 0.1 ^B	8.0 ± 0.1 ^B	7.0 ± 0.1 ^B	7.8 ± 0.1 ^B
	Gluconic acid						
	First	–	–	37 ± 2 ^A	50 ± 2 ^A	–	–
	Second	–	–	147 ± 4 ^B	50 ± 3 ^A	–	–

All data are the mean ± SD of three replicates.

Ethanol content (%; v/v) is the potential ethanol content of grape juice or ethanol content of base and sparkling wines expressed as % (v/v).

Titrateable acidity (g L⁻¹) is expressed as g of tartaric acid L⁻¹.

Gluconic acid (mg L⁻¹) is expressed as mg L⁻¹.

^{A,B} Different Latin letters indicate significant statistical differences ($P < 0.05$) between the first and second harvests.

all cases, which matches the transformation of the sugar added (22 g L⁻¹) to the second fermentation.

Table 1 also shows the titrateable acidities of base and sparkling wines. In general, the titrateable acidities of the base and sparkling wines from the second harvest were significant lower than

those from the first harvest even though they were acidified with tartaric acid in order to minimise the differences. This is probably because the titrateable acidities of the wines from the first harvest were mainly due to the presence of high concentrations of malic acid, which does not precipitate during cold

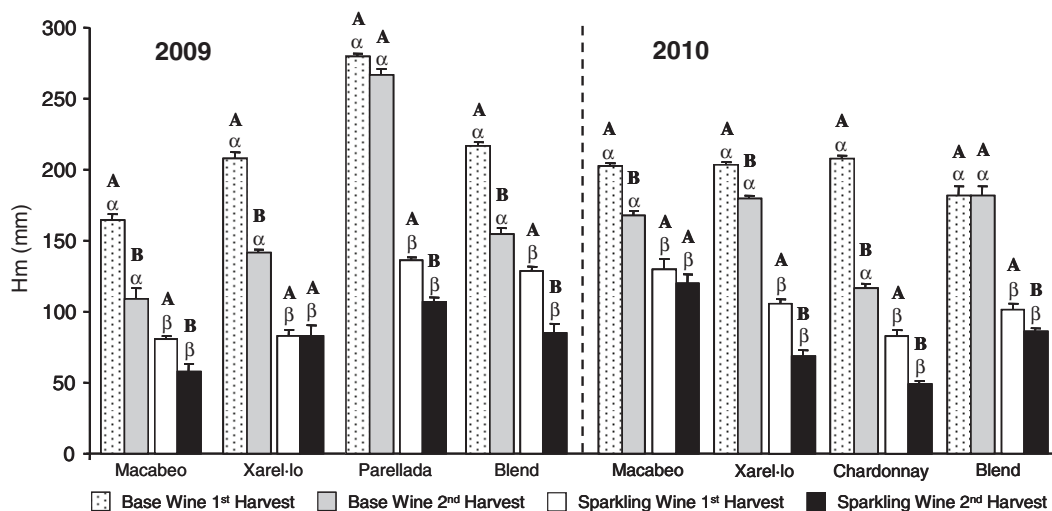


Figure 1. H_m values of base wines and sparkling wines. Different Latin letters indicate significant statistical differences ($P < 0.05$) between first and second harvests (A, B). Different Greek letters indicate significant statistical differences ($P < 0.05$) between the base wine and its corresponding sparkling wine (α , β). H_m is the maximum height reached by the foam after CO_2 injection through the glass frit, and represents foamability (the wine's ability to foam).

stabilisation. In contrast, the titratable acidities of wines from the second harvest were largely due to the presence of tartaric acid and a large proportion of this acid (potassium hydrogen tartrate) would have precipitated during cold stabilisation. In any case, without acidification the difference in titratable acidity between wines from the first and second harvests would be much greater.

Table 1 shows the gluconic acid concentration of the different base wines. Gluconic acid is regarded as an index marker for the presence of *Botrytis cinerea*.⁵² Even some AOC has established a maximum limit of its presence in wines in order to avoid the employment of grapes or wines seriously affected by this disease. Overall, the concentration of gluconic acid in most of the base wines studied is adequate since it is equal to or lower than 100 mg L^{-1} . However, Macabeo base wine made from the riper grapes of the 2009 vintage had a considerably higher gluconic acid concentration, which indicates that these grapes were affected by grey rot. Evidently, the blended base wine from the second 2009 harvest also contained appreciable amounts of this acid since the Macabeo base wine from the second harvest was a substantial part of the blend. In most cases, however, the concentration of gluconic acid in the base wines from the second harvest was significantly higher than in the first harvest. This is quite logical since it takes longer to obtain riper grapes and, therefore, the risk of developing grey rot is greater especially in 2009 when rainfall was greater. As mentioned above, the presence of *Botrytis cinerea* can seriously affect wine foamability.³⁰ Our results seem to confirm that the base wines from the second harvest, in which H_m has decreased most (Fig. 1), are precisely those in which the concentration of gluconic acid has also increased most (Macabeo and Xarel.lo from 2009 and Chardonnay from 2010).

Foaming properties of all the samples were measured with the Mosalux procedure.^{47,48} Some authors have reported that the foaming parameters obtained with Mosalux sometimes do not match with the real tasting perception by the consumers.¹⁰ These differences have been related with the fact that Mosalux measurements require previous filtration and degassing, and therefore do not take into account the real dissolved CO_2 content of the sparkling wine (responsible for bubble nucleation and foam in real tasting conditions).¹⁰ It has also been reported that filtration

influence negatively foam behaviour.⁷ In our particular case, we degassed by centrifugation (and not by filtration) the wines and tempered at 18°C for 24 h before analysis in order to minimise all possible sources of variability.

Figure 1 shows the maximum height of the foam (H_m) of base and sparkling wines. In all cases, the H_m of sparkling wines was significantly lower than in the corresponding base wines. This decrease in H_m after the second fermentation has been described elsewhere and has two probable causes. First, the second fermentation increases ethanol content, which is negative for foam;³⁷ and second, the use of bentonite as riddling agent removes such surface active agents as proteins.^{19,22,23}

Overall, the base wines from the first harvest had significantly higher H_m values than those from the second harvest and their corresponding sparkling wines behaved in a similar way. The only exceptions were Parellada from the 2009 vintage and the blend wines from 2010 (base wines), Xarel.lo from 2009 and Macabeo from 2010 (sparkling wines). This seems to indicate that the foamability of base wines is higher when the grapes are less ripe. A possible explanation for this may be that most of the base wines from the second harvest had a higher ethanol content. However, this is not always the case since some base wines of both vintages have similar alcohol levels but significant differences in H_m . This is the case of the Macabeo 2009 and Xarel.lo 2010 base wines. Moreover, the differences found in H_m were very high in some cases and could therefore not be explained only by differences in the alcoholic strength. This suggests that aspects other than ethanol probably also related with grape maturity also play a role.

Figure 2 shows the stable height of the foam (H_s) of base wines and sparkling wines. It was not possible to establish a general trend in this parameter since the changes in H_s between base wines and sparkling wines were erratic. In some cases H_s was lower in sparkling than in base wine whereas in others it was the same or even higher. Neither was there a clear relationship between the H_s in base wines and sparkling wines, and the different maturity levels of the grapes from the two vintages since significant differences were detected in only one case. Consequently it seems that, unlike H_m , H_s is not affected either by the transformation of base wine into sparkling wine or by grape maturity.

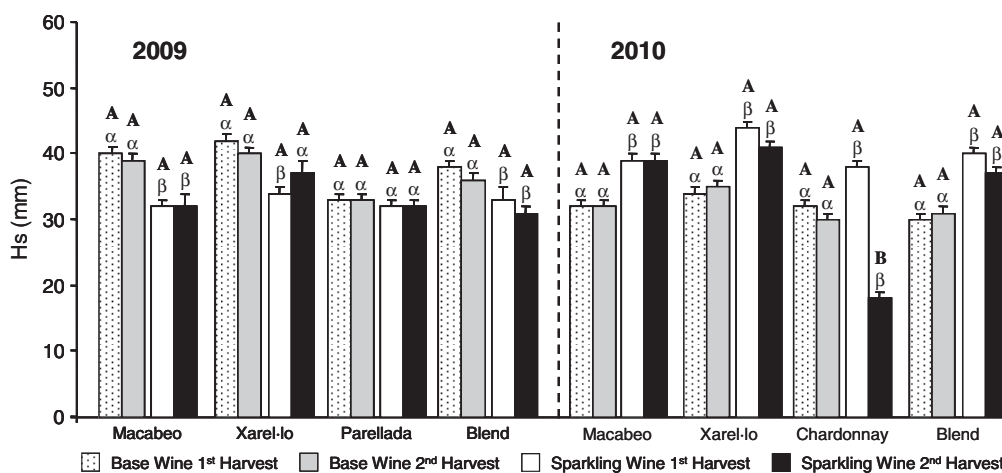


Figure 2. H_s values of base wines and sparkling wines. Different Latin letters indicate significant statistical differences ($P < 0.05$) between first and second harvests (A, B). Different Greek letters indicate significant statistical differences ($P < 0.05$) between the base wine and its corresponding sparkling wine (α , β). H_s is the stable height during CO_2 injection and represents foam stability.

Table 2. Proteins of base and sparkling wines

Cultivar	Ripening stage	Fraction	Base wine		Sparkling wine	
			2009	2010	2009	2010
Macabeo	First harvest	HMW	1.9 ± 0.1 ^{A,α}	1.8 ± 0.1 ^{A,α}	1.4 ± 0.1 ^{A,β}	2.1 ± 0.1 ^{A,α}
		IMW	8.1 ± 0.4 ^{A,α}	14.7 ± 0.3 ^{A,α}	4.5 ± 0.2 ^{A,β}	10.8 ± 0.3 ^{A,β}
		LMW	17 ± 1 ^{A,α}	39 ± 1 ^{A,α}	7.7 ± 0.3 ^{A,β}	15 ± 1 ^{A,β}
		Total	27 ± 1 ^{A,α}	56 ± 1 ^{A,α}	16 ± 1 ^{A,β}	30 ± 1 ^{A,β}
	Second harvest	HMW	1.7 ± 0.1 ^{A,α}	2.1 ± 0.1 ^{A,α}	1.7 ± 0.1 ^{B,α}	2.6 ± 0.2 ^{B,β}
		IMW	12.5 ± 0.1 ^{B,α}	10.7 ± 0.3 ^{B,α}	6.7 ± 0.1 ^{B,β}	10.6 ± 0.7 ^{A,α}
		LMW	39 ± 1 ^{B,α}	50 ± 1 ^{B,α}	18 ± 1 ^{B,β}	25 ± 2 ^{B,β}
		Total	54 ± 1 ^{B,α}	63 ± 1 ^{B,α}	28 ± 1 ^{B,β}	40 ± 2 ^{B,β}
Xarel.lo	First harvest	HMW	1.9 ± 0.1 ^{A,α}	2.4 ± 0.1 ^{A,α}	1.8 ± 0.1 ^{A,α}	2.7 ± 0.2 ^{A,α}
		IMW	14.0 ± 0.7 ^{A,α}	16.3 ± 0.6 ^{A,α}	8.4 ± 0.4 ^{A,β}	15.1 ± 0.5 ^{A,α}
		LMW	53 ± 2 ^{A,α}	48 ± 2 ^{A,α}	29 ± 2 ^{A,β}	36 ± 1 ^{A,β}
		Total	69 ± 3 ^{A,α}	66 ± 3 ^{A,α}	41 ± 2 ^{A,β}	55 ± 1 ^{A,β}
	Second harvest	HMW	2.2 ± 0.1 ^{A,α}	2.7 ± 0.1 ^{A,α}	3.0 ± 0.2 ^{B,β}	1.6 ± 0.1 ^{B,β}
		IMW	9.6 ± 0.1 ^{B,α}	10.3 ± 0.4 ^{B,α}	7.6 ± 0.4 ^{A,β}	8.4 ± 0.6 ^{B,β}
		LMW	53 ± 2 ^{A,α}	74 ± 3 ^{B,α}	30 ± 2 ^{A,β}	40 ± 3 ^{A,β}
		Total	65 ± 2 ^{A,α}	87 ± 3 ^{B,α}	42 ± 2 ^{A,β}	52 ± 3 ^{A,β}
Parellada/Chardonnay	First harvest	HMW	2.1 ± 0.1 ^{A,α}	1.6 ± 0.1 ^{A,α}	2.1 ± 0.1 ^{A,α}	2.7 ± 0.2 ^{A,β}
		IMW	3.8 ± 0.2 ^{A,α}	13.8 ± 0.7 ^{A,α}	2.8 ± 0.1 ^{A,β}	12.7 ± 0.3 ^{A,α}
		LMW	14 ± 1 ^{A,α}	36 ± 2 ^{A,α}	11 ± 1 ^{A,β}	18 ± 2 ^{A,β}
		Total	20 ± 1 ^{A,α}	52 ± 2 ^{A,α}	18 ± 1 ^{A,α}	35 ± 2 ^{A,β}
	Second harvest	HMW	1.6 ± 0.1 ^{B,α}	3.1 ± 0.1 ^{B,α}	1.6 ± 0.1 ^{B,α}	2.3 ± 0.1 ^{B,β}
		IMW	5.5 ± 0.3 ^{B,α}	13.2 ± 0.5 ^{A,α}	4.3 ± 0.3 ^{B,β}	7.0 ± 0.6 ^{B,β}
		LMW	17 ± 1 ^{B,α}	46 ± 2 ^{B,α}	17 ± 1 ^{B,α}	15 ± 1 ^{A,β}
		Total	24 ± 1 ^{B,α}	62 ± 2 ^{B,α}	24 ± 2 ^{B,α}	27 ± 2 ^{B,β}
Blend	First harvest	HMW	2.0 ± 0.1 ^{A,α}	1.5 ± 0.1 ^{A,α}	1.0 ± 0.1 ^{A,β}	2.8 ± 0.3 ^{A,β}
		IMW	8.0 ± 0.4 ^{A,α}	11.3 ± 0.4 ^{A,α}	5.6 ± 0.3 ^{A,β}	13.5 ± 0.5 ^{A,β}
		LMW	34 ± 2 ^{A,α}	42 ± 2 ^{A,α}	18 ± 1 ^{A,β}	28 ± 1 ^{A,β}
		Total	44 ± 2 ^{A,α}	54 ± 1 ^{A,α}	26 ± 1 ^{A,β}	46 ± 2 ^{A,β}
	Second harvest	HMW	1.5 ± 0.1 ^{B,α}	3.1 ± 0.1 ^{B,α}	1.9 ± 0.1 ^{B,β}	2.5 ± 0.2 ^{A,β}
		IMW	8.6 ± 0.4 ^{A,α}	10.1 ± 0.1 ^{A,α}	7.6 ± 0.2 ^{B,β}	8.0 ± 0.7 ^{B,β}
		LMW	39 ± 2 ^{B,α}	62 ± 1 ^{B,α}	23 ± 1 ^{B,β}	24 ± 2 ^{B,β}
		Total	49 ± 2 ^{B,α}	75 ± 1 ^{B,α}	35 ± 1 ^{B,β}	37 ± 3 ^{B,β}

All data are the mean ± SD of three replicates and are expressed in mg L^{-1} .

^{AB}Different Latin letters indicate significant statistical differences ($P < 0.05$) between the first and second harvests.

^{αβ}Different Greek letters indicate significant statistical differences ($P < 0.05$) between the base wine and its corresponding sparkling wine.

HMW, high molecular weight; IMW, intermediate molecular weight; LMW, low molecular weight.

Table 3. Polysaccharides and oligosaccharides of base and sparkling wines

Cultivar	Ripening stage	Fraction	Base wine		Sparkling wine	
			2009	2010	2009	2010
Macabeo	First harvest	HMW	51 ± 1 ^{A,α}	47 ± 1 ^{A,α}	56 ± 2 ^{A,β}	53 ± 1 ^{A,β}
		IMW	60 ± 2 ^{A,α}	37 ± 2 ^{A,α}	71 ± 1 ^{A,β}	35 ± 1 ^{A,α}
		LMW	23 ± 1 ^{A,α}	50 ± 3 ^{A,α}	36 ± 2 ^{A,β}	46 ± 2 ^{A,α}
		TPS	134 ± 4 ^{A,α}	134 ± 3 ^{A,α}	163 ± 1 ^{A,β}	134 ± 3 ^{A,α}
		TOS	27 ± 1 ^{A,α}	71 ± 3 ^{A,α}	45 ± 2 ^{A,β}	70 ± 6 ^{A,α}
	Second harvest	HMW	73 ± 1 ^{B,α}	66 ± 2 ^{B,α}	65 ± 1 ^{B,β}	69 ± 1 ^{B,α}
		IMW	94 ± 1 ^{B,α}	85 ± 2 ^{B,α}	57 ± 3 ^{B,β}	93 ± 2 ^{B,β}
		LMW	43 ± 1 ^{B,α}	79 ± 4 ^{B,α}	20 ± 1 ^{B,β}	72 ± 4 ^{B,α}
		TPS	210 ± 2 ^{B,α}	230 ± 5 ^{B,α}	141 ± 4 ^{B,β}	234 ± 6 ^{B,α}
		TOS	34 ± 1 ^{B,α}	104 ± 5 ^{B,α}	36 ± 2 ^{B,α}	79 ± 4 ^{A,β}
Xarel.lo	First harvest	HMW	49 ± 3 ^{A,α}	49 ± 2 ^{A,α}	53 ± 1 ^{A,α}	58 ± 2 ^{A,β}
		IMW	73 ± 4 ^{A,α}	55 ± 2 ^{A,α}	79 ± 1 ^{A,α}	48 ± 3 ^{A,β}
		LMW	84 ± 4 ^{A,α}	35 ± 2 ^{A,α}	74 ± 1 ^{A,β}	43 ± 4 ^{A,α}
		TPS	206 ± 9 ^{A,α}	139 ± 6 ^{A,α}	207 ± 2 ^{A,α}	149 ± 2 ^{A,β}
		TOS	73 ± 3 ^{A,α}	135 ± 1 ^{A,α}	80 ± 2 ^{A,α}	104 ± 9 ^{A,β}
	Second harvest	HMW	64 ± 3 ^{B,α}	58 ± 1 ^{B,α}	63 ± 3 ^{B,α}	67 ± 1 ^{B,β}
		IMW	83 ± 4 ^{A,α}	80 ± 3 ^{B,α}	76 ± 6 ^{A,α}	85 ± 2 ^{B,α}
		LMW	95 ± 5 ^{B,α}	64 ± 3 ^{B,α}	43 ± 3 ^{B,β}	71 ± 3 ^{B,α}
		TPS	242 ± 12 ^{B,α}	202 ± 1 ^{B,α}	181 ± 11 ^{B,β}	223 ± 3 ^{B,β}
		TOS	71 ± 3 ^{A,α}	111 ± 6 ^{B,α}	40 ± 2 ^{B,β}	91 ± 7 ^{A,β}
Parellada/Chardonnay	First harvest	HMW	42 ± 1 ^{A,α}	43 ± 2 ^{A,α}	43 ± 1 ^{A,α}	53 ± 2 ^{A,β}
		IMW	50 ± 2 ^{A,α}	39 ± 2 ^{A,α}	51 ± 3 ^{A,α}	41 ± 3 ^{A,α}
		LMW	33 ± 1 ^{A,α}	40 ± 1 ^{A,α}	31 ± 2 ^{A,α}	42 ± 4 ^{A,α}
		TPS	126 ± 4 ^{A,α}	122 ± 4 ^{A,α}	125 ± 6 ^{A,α}	137 ± 3 ^{A,β}
		TOS	60 ± 1 ^{A,α}	78 ± 3 ^{A,α}	50 ± 2 ^{A,β}	109 ± 5 ^{A,β}
	Second harvest	HMW	51 ± 1 ^{B,α}	71 ± 2 ^{B,α}	54 ± 3 ^{B,α}	80 ± 3 ^{B,β}
		IMW	54 ± 1 ^{A,α}	75 ± 2 ^{B,α}	62 ± 2 ^{B,β}	75 ± 6 ^{B,α}
		LMW	28 ± 1 ^{B,α}	80 ± 3 ^{B,α}	43 ± 3 ^{B,β}	66 ± 5 ^{B,β}
		TPS	133 ± 2 ^{A,α}	227 ± 5 ^{B,α}	159 ± 8 ^{B,β}	221 ± 7 ^{B,α}
		TOS	33 ± 1 ^{B,α}	93 ± 3 ^{B,α}	48 ± 3 ^{A,β}	115 ± 8 ^{A,β}
Blend	First harvest	HMW	50 ± 3 ^{A,α}	50 ± 2 ^{A,α}	59 ± 1 ^{A,β}	57 ± 2 ^{A,β}
		IMW	58 ± 3 ^{A,α}	52 ± 2 ^{A,α}	71 ± 3 ^{A,β}	50 ± 2 ^{A,α}
		LMW	29 ± 1 ^{A,α}	39 ± 2 ^{A,α}	44 ± 2 ^{A,β}	36 ± 2 ^{A,α}
		TPS	136 ± 7 ^{A,α}	140 ± 4 ^{A,α}	175 ± 4 ^{A,β}	143 ± 3 ^{A,α}
		TOS	37 ± 2 ^{A,α}	114 ± 5 ^{A,α}	64 ± 3 ^{A,β}	108 ± 5 ^{A,α}
	Second harvest	HMW	62 ± 1 ^{B,α}	60 ± 3 ^{B,α}	62 ± 1 ^{A,α}	70 ± 1 ^{B,β}
		IMW	74 ± 1 ^{B,α}	79 ± 2 ^{B,α}	78 ± 3 ^{A,α}	75 ± 5 ^{B,α}
		LMW	38 ± 1 ^{B,α}	69 ± 3 ^{B,α}	33 ± 1 ^{B,β}	57 ± 5 ^{B,β}
		TPS	174 ± 1 ^{B,α}	209 ± 6 ^{B,α}	173 ± 5 ^{A,α}	202 ± 1 ^{B,α}
		TOS	35 ± 2 ^{A,α}	108 ± 4 ^{A,α}	43 ± 1 ^{B,β}	111 ± 8 ^{A,α}

All data are the mean ± SD of three replicates and are expressed in mg L⁻¹.

^{A,B} Different Latin letters indicate significant statistical differences ($P < 0.05$) between the first and second harvests.

^{α,β} Different Greek letters indicate significant statistical differences ($P < 0.05$) between the base wine and its corresponding sparkling wine.

HMW, high molecular weight; IMW, intermediate molecular weight; LMW, low molecular weight; TPS, total polysaccharides; TOS, total oligosaccharides.

Table 2 shows the results of protein analysis by HRSEC-DAD. In all the wines studied, three fractions were obtained. The high molecular weight fraction (HMW) has a molecular weight higher than 80 kDa, the intermediate molecular weight fraction (IMW) has a molecular weight around 60 kDa and the low molecular weight fraction (LMW) has a molecular weight below 40 kDa.

Overall total protein concentration in sparkling wines is lower than in their corresponding base wines. This result has been reported previously and has been attributed to the deproteinising effect of the riddling agent bentonite.^{19,22,23} This decrease was mainly due to the intermediate and lower molecular weight (IMW and LMW) fractions whereas the high molecular weight (HMW)

fraction was, in general, less affected. It was more difficult to establish a clear pattern when base wines or sparkling wines from both harvests were compared. However, it seems that base wines and sparkling wines from the second harvest tend to have higher protein concentrations, especially of the LMW fraction. This general trend has been previously described by Murphey *et al.*⁵³ Xarel.lo from vintage 2009 was an exception because there is no increase in total protein content with maturity. This different behaviour may be related with the higher gluconic acid concentration of Xarel.lo wines of the second harvest. According Cilindre *et al.*,²⁰ botrytised grapes undergo a decrease in protein content by protein degradation due to enzymes secreted by *Botrytis cinerea*.

Table 4. Significant correlation coefficients between H_m (the maximum height reached by the foam after CO₂ injection through the glass frit) and the wine components analysed

Component	Pearson's correlation coefficient	P-value
Ethanol content (%; v/v)	-0.917	3.35E-12
HMW polysaccharides (mg L ⁻¹)	-0.647	9.82E-05
LMW proteins (mg L ⁻¹)	0.587	5.11E-04
Total proteins (mg L ⁻¹)	0.581	5.87E-04
IMW proteins (mg L ⁻¹)	0.470	5.82E-03
Gluconic acid (mg L ⁻¹)	-0.357	3.10E-02

HMW, high molecular weight; IMW, intermediate molecular weight; LMW, low molecular weight.

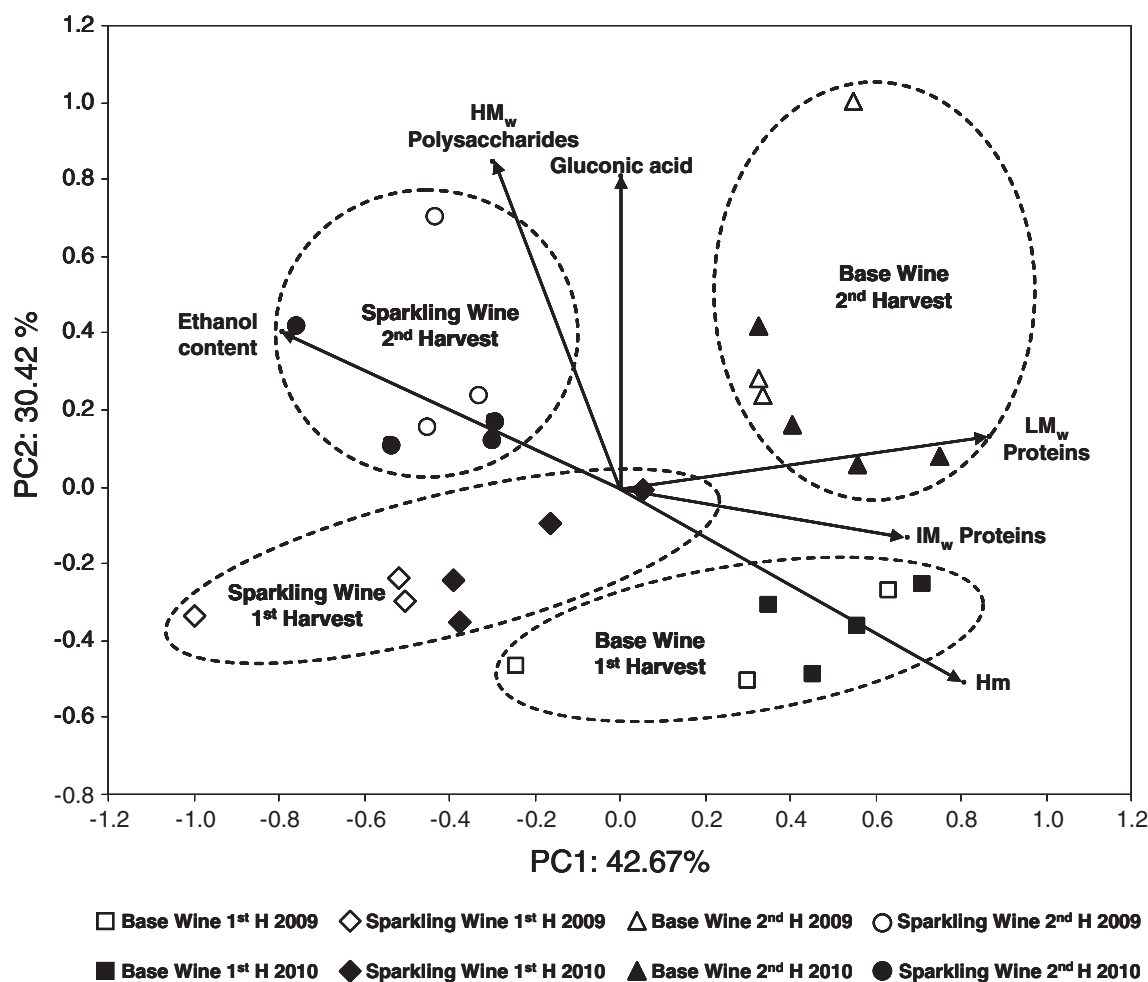
This possible protein degradation does not allow us to see the expected increase in protein concentration due to the maturity of the grapes.

Table 3 shows the results of polysaccharide analysis by HRSEC-RID. In all the wines studied, three fractions were obtained. The high molecular weight fraction (HMW) has a molecular weight higher than 180 kDa, the intermediate molecular weight fraction (IMW) has a molecular weight between 40 and 180 kDa and the

low molecular weight fraction (LMW) has a molecular weight between 7.5 and 40 kDa.

In this case no general trend was found between base and sparkling wines. In some cases sparkling wines had significantly higher polysaccharide concentrations whereas in others there were no differences or even significant decreases. It is at least curious that base wines with higher gluconic acid concentrations (Macabeo and Xarel.lo from 2009) produced sparkling wines with significantly lower concentrations of polysaccharides. It has been reported that *Botrytis cinerea* also releases considerable amounts of β -glucans and that it can be precipitated by ethanol.⁵⁴ Consequently, it is quite probable that the drastic decrease in polysaccharides observed in these wines after the second fermentation was due to the precipitation associated with the increase in ethanol content during alcoholic fermentation.

As in the case of proteins, in both base and sparkling wines from the second harvest polysaccharides were found in significantly higher concentrations than in their corresponding wines from the first harvest. Similar results have been reported in red wines, which is quite logical.⁵⁵ The progressive degradation of pectins throughout ripening in skin cell walls should favour polysaccharide solubilisation in the grape juice.⁵⁶ Consequently, wines from riper grapes should have a higher polysaccharide concentration. Moreover, riper grapes may also have higher amounts of β -glucans due to the greater risk of *Botrytis cinerea*.⁵⁴

**Figure 3.** Plot of varimax-rotated principal components analysis for base and sparkling wines.

Oligosaccharides were also measured by HRSEC-RID (Table 3). This fraction has a molecular weight lower than 7.5 kDa. In this case no clear trend was found since the comparison between base and sparkling wines or between harvests showed erratic behaviour.

Table 4 shows the Pearson's correlation coefficients obtained for H_m (only in the case of parameters for which $P < 0.05$). Parellada was not included because no differences were found between harvests. As expected, ethanol and gluconic acid correlated negatively with H_m . More surprisingly, the HMW polysaccharide fraction also correlated negatively. However, this negative effect may be associated with the presence of β -glucans secreted by *Botrytis cinerea* and other polysaccharides probably do not have a negative effect. In fact mannoproteins have been reported to have a positive effect.^{28,29} On the other hand, proteins, especially LMW and IMW fractions, correlated positively with H_m . This data is in agreement with other previously reported data.^{2,6,10}

As expected, H_s showed no significant correlation with any of the parameters analysed. This is quite logical because H_s behaved in an extremely erratic fashion, which made it very difficult to draw conclusions.

In order to better understand which factors determine the foaming properties of the base and sparkling wines a principal component analysis was performed. Figure 3 shows the plot of varimax-rotated principal components analysis. The analysis was performed with the parameters that significantly correlated with H_m . The first component explains 42.67% of the variance, and the second explains 30.42% (so the explained aggregate variance by the first two first components was 73.08%). The loadings are presented as arrows, the length and direction of which indicate the contribution made by both components and it is clear that ethanol (PC1, -0.79; PC2, 0.40) is absolutely opposite to H_m (PC1, 0.80; PC2, -0.51). The HMW fractions of polysaccharides (PC1, -0.30; PC2, 0.84) and gluconic acid (PC1, 0.00; PC2, 0.81) are also in opposite directions, a situation which also indicates some antagonism. In contrast, IMW and LMW protein fractions (PC1, 0.67; PC2, -0.13) (PC1, 0.86; PC2, 0.13) are somewhat directed in the positive direction of H_m , which confirms their positive effect on wine foamability.

A clear trend can also be observed in this plot. Base wines can be grouped and separated from sparkling wines through PC1 (ethanol and proteins have the highest coefficients) whereas grape maturity, as can be seen in base and sparkling wines, can be grouped and separated through PC2 (gluconic acid and the HMW fraction of polysaccharides have the highest coefficients).

CONCLUSION

The statistical analysis of the data set shows that the main factors affecting the foaming properties of base and sparkling wines are the ethanol content and HMW polysaccharide fraction, which have a negative effect on H_m , and proteins (IMW and LMW fractions), which have a positive effect. In contrast, no clear conclusions can be drawn for H_s , because it behaved in an erratic fashion. The main conclusion of this study is that advancing the dates of the harvest will improve the foaming properties of wines. This is a key point for Cava producers, for whom the effects of climate change are already very present.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank CDTI (project CENIT-Demeter) for financial support.

REFERENCES

- Liger-Belair G, *Uncorked: The Science of Champagne*, revised edition. Princeton University, Princeton, New Jersey (2004).
- Brissonnet F and Maujean A, Characterization of foaming proteins in a Champagne base wine. *Am J Enol Vitic* **44**:297–301 (1993).
- Maujean A, Histoire de bulles. *Revue Française d'Œnologie* **120**:11–17 (1989).
- Liger-Belair G, Marchal R, Robillard B, Vignes-Adler M, Maujean A and Jeandet P, Study of effervescence in a glass of Champagne: Frequencies of bubble formation, growth rates, and velocities of rising bubbles. *Am J Enol Vitic* **50**:317–323 (1999).
- Pueyo E, Martín-Alvarez PJ and Polo MC, Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cavas (sparkling wines). *Am J Enol Vitic* **46**:518–524 (1995).
- Vanrell G, Cabanillas P, Albet S, Canals JM, Arola L and Zamora F, Étude des composés influençant la mousse des Cavas. *Revue Française d'Œnologie* **196**:30–36 (2002).
- Robillard B, Delpuech E, Viaux I, Malvy J, Vignes-adler M and Duteurtre B, Improvements of methods for sparkling base wine foam measurements and effect of wine filtration on foam behavior. *Am J Enol Vitic* **44**:387–392 (1993).
- Marchal R, Chaboche D, Douillard R and Jeandet P, Influence of lysozyme treatments on Champagne base wine foaming properties. *J Agric Food Chem* **50**:1420–1428 (2002).
- Vanrell G, Esteruelas M, Canals JM and Zamora F, Influence du type de clarification du vin de base et des adjuvants de tirage sur la qualité de la mousse des vins effervescents. *Revue des Œnologues* **114**:28–30 (2005).
- Cilindre C, Liger-Belair G, Guillaume S, Jeandet P and Marchal R, Foaming properties of various Champagne wines depending on several parameters: Grape variety, aging, protein and CO₂ content. *Anal Chim Acta* **660**:164–170 (2010).
- Bamforth CW, The foaming properties of beer. *J Brew* **91**:370–383 (1985).
- Schramm LL, *Emulsions, Foams and Suspensions; Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2005).
- Brissonnet F and Maujean A, Identification of some foam-active compounds in Champagne base wines. *Am J Enol Vitic* **42**:97–102 (1991).
- Aguíé-Béghin V, Adriaensens Y, Péron N, Valade M, Rouxhet P and Douillard R, Structure and chemical composition of layers adsorbed at interfaces with Champagne. *J Agric Food Chem* **57**:10399–10407 (2009).
- Abdallah Z, Aguíé-Béghin V, Abou-Saleh K, Douillard R and Billiard C, Isolation and analysis of macromolecular fractions responsible for the surface properties in native Champagne wines. *Food Res Int* **43**:982–987 (2010).
- Waters EJ, Alexander G, Muhlack R, Pocock KF, Colby C, O'Neill BK, *et al.*, Preventing protein haze in bottled white wine. *Aust J Grape Wine Res* **11**:215–225 (2005).
- Esteruelas M, Poinsaut P, Sieczkowski N, Manteau S, Fort MF, Canals JM, *et al.*, Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine. *Food Chem* **113**:28–35. (2009).
- Vincenzi S, Marangon M, Tolin S and Curioni A, Protein evolution during the early stages of white winemaking and its relations with wine stability. *Aust J Grape Wine Res* **17**:20–27 (2011).
- Dambrouck T, Marchal R, Cilindre C, Parmentier M and Jeandet P, Determination of the grape invertase content (using PTA-ELISA) following various fining treatments versus changes in the total protein content of wine. relationships with wine foamability. *J Agric Food Chem* **53**:8782–8789 (2005).
- Cilindre C, Castro AJ, Clement C, Jeandet P and Marchal R, Influence of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine proteins (characterized by two dimensional electrophoresis/immunodetection) and wine foaming properties. *Food Chem* **103**:139–149 (2007).
- Pocock KF and Waters EJ, Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Aust J Grape Wine Res* **12**:212–220 (2006).
- Martínez-Rodríguez AJ and Polo MC, Effect of the addition of bentonite to the tirage solution on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chem* **81**:383–388 (2003).
- Vanrell G, Canals R, Esteruelas M, Fort F, Canals JM and Zamora F, Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chem* **104**:148–155 (2007).

- 24 Vidal S, Williams P, Doco T, Moutounet M and Pellerin P, The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization. *Carbohydr Polym* **54**:439–447 (2003).
- 25 Guadalupe Z and Ayestarán B, Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of Tempranillo red wines. *J Agric Food Chem* **55**:10720–10728 (2007).
- 26 Escot S, Feuillat M, Dulau L and Charpentier C, Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Aust J Grape and Wine Res* **7**:153–159 (2001).
- 27 Todd BEN, Fleet GH and Henschke PA, Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: Potential application in sparkling wine production. *Am J Enol Vitic* **51**:65–72 (2000).
- 28 Moreno-Arribas V, Pueyo E, Nieto FJ, Martín-Alvarez PJ and Polo MC, Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chem* **70**:309–317 (2000).
- 29 Nuñez YP, Carrascosa AV, González R, Polo MC and Martínez-Rodríguez AJ, Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champagne method. *J Agric Food Chem* **53**:7232–7237 (2005).
- 30 Marchal R, Tabary T, Valade M, Moncomble D, Viaux L, Robillard B, et al., Effects of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine foaming properties. *J Sci Food Agric* **81**:1371–1378 (2001).
- 31 Marchal R, Berthier L, Legendre L, Marchal-Delahaut J, Jeandet P and Maujean A, Effects of *Botrytis cinerea* infection on the must protein electrophoretic characteristics. *J Agric Food Chem* **46**:4945–4949 (1998).
- 32 Cilindre C, Jégou S, Hovasse A, Schaeffer C, Castro AJ, Clément C, et al., Proteomic approach to identify champagne wine proteins as modified by *Botrytis cinerea* infection. *J Proteome Res* **7**:1199–1208 (2008).
- 33 Francioli S, Buxaderas S and Pellerin P, Influence of *Botrytis cinerea* on the polysaccharide composition of Xarel.lo musts and cava base wines. *Am J Enol Vitic* **50**:456–460 (1999).
- 34 Dubourdieu D, Fournet B and Ribéreau-Gayon P, Molecular structure of extracellular β -D-glucan from *Botrytis cinerea*. *Carbohydr Res* **93**:294–299 (1981).
- 35 Comelles F, Bosch MP and Castro JJ, Relationship between physicochemical variables and foaming properties of grape varieties. *ACE Revista d'Enologia* **23**:7–16 (1991).
- 36 Péron N, Cagna A, Valade M, Marchal R, Maujean A, Robillard B, et al., Characterisation by drop tensiometry and by ellipsometry of the adsorption layer formed at the air/Champagne wine interface. *Adv Colloid Interface Sci* **88**:19–36 (2000).
- 37 Dussaud A, Robillard B, Carles B, Duteurtre B and Vignes-Adler M, Exogenous lipids and ethanol influences on the foam behaviour of sparkling base wines. *J Food Sci* **59**:148–151 (1994).
- 38 Andrés-Lacueva C, López-Tamames E, Lamuela-Raventós RM, Buxaderas S and de la Torre-Boronat MC, Characteristics of sparkling base wines affecting foam behaviour. *J Agric Food Chem* **44**:989–995 (1996).
- 39 López-Barajas M, Viu-Marco A, López-Tamames E, Buxaderas S and de la Torre-Boronat MC, Foaming in grape juices of white varieties. *J Agric Food Chem* **45**:2526–2529 (1997).
- 40 López-Barajas M, López-Tamames E, Buxaderas S, Tomàs X and de la Torre MC, Prediction of wine foaming. *J Agric Food Chem* **47**:3743–3748 (1999).
- 41 Schultz HR, Climate change and viticulture; a European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Aust J Grape and Wine Res* **6**:2–12 (2000).
- 42 Jones GJ, White MA, Cooper OR and Storchmann K, Climate change and global wine quality. *Clim Change* **73**:319–343 (2005).
- 43 Organisation Internationale de La Vigne et du Vin, *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*, Vol. **1**, OIV-MA-AS312-01B. OIV, Paris (2009).
- 44 Organisation Internationale de La Vigne et du Vin, *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*, Vol. **1**, OIV-MA-AS313-01. OIV, Paris (2009).
- 45 Organisation Internationale de La Vigne et du Vin, *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*, Vol. **1**, OIV-MA-AS312-01A. OIV, Paris (2009).
- 46 Canals JM and Zamora F, Comparación de la eficacia analítica del biosensor para la determinación de ácido glucónico en mostos y vinos de la empresa "Biolan microbiosensores S.L." con el método enzimático aplicado manualmente y mediante un autoanalizador. *Revista Enología March-Abril*: 1–6 (2010).
- 47 Maujean A, Poinsaut P, Dantan H, Brissonet F and Cossiez E, Étude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents II. Mise au point d'une technique de mesure de la moussabilité, de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bulletin de l'OIV* **711–712**:405–426 (1990).
- 48 Poinsaut P, Le Mosalux, appareil de mesure du pouvoir moussant d'un vin. *Revue des Œnologues* **59**:35–43 (1991).
- 49 Ayestarán B, Guadalupe Z and Leon D, Quantification of major grape polysaccharides (*Tempranillo* v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal Chim Acta* **513**:29–39 (2004).
- 50 Canals JM, Arola L and Zamora F, Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *Am J Enol Vitic* **49**:383–388 (1998).
- 51 De La Presa-Owens C, Lamuela-Raventós RM, Buxaderas S and De La Torre-Boronat MC, Characterization of Macabeo, Xarel.lo, and Parellada white wines from the Penedès Region. II. *Am J Enol Vitic* **46**:529–541 (1995).
- 52 Donèche B, Carbohydrate metabolism and gluconic acid synthesis by *Botrytis cinerea*. *Can J Bot* **67**:2888–2893 (1989).
- 53 Murphey JM, Spayd SE and Powers JR, Effect of grape maturation on soluble protein characteristics of Gewürztraminer and White Riesling juice and wine. *Am J Enol Vitic* **40**:199–207 (1989).
- 54 Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH and Nury FS, *Wine Analysis and Production*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (1995).
- 55 Gil M, Kontoudakis N, González E, Esteruelas M, Fort MF, Canals JM, et al., Influence of grape maturity and maceration length on colour, polyphenolic composition, and polysaccharide content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines. *J Agric Food Chem* **60**:7988–8001 (2012).
- 56 Nunan KJ, Sims IM, Bacic A, Robinson SP and Fincher GB, Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiol* **118**:783–792 (1998).

Capítulo II. Consecuencias enológicas de la inoculación secuencial con levaduras No-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbruekii* y *Metschnikowia pulcherrima*) y *Saccharomyces cerevisiae* en vino base cava.

En los últimos años el uso de inóculos de levaduras No-*Saccharomyces* se ha extendido en la industria enológica con el propósito de mejorar la calidad y complejidad de los vinos.

El objetivo es beneficiarse de las características positivas que pueden aportar al vino algunas levaduras no-*Saccharomyces*, sin que aparezcan los posibles defectos que la fermentación espontánea pudiera causar. Concretamente la inoculación secuencial se basa en introducir inicialmente una levadura no-*Saccharomyces*, y pasado un periodo de tiempo, que difiere en función de la levadura utilizada, adicionar un inóculo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que asegure que la fermentación alcohólica se lleve a cabo con éxito.

Existen múltiples estudios sobre el uso de este tipo de levaduras, ya sea como cultivo puro, como cultivos mixtos o mediante inoculación secuenciada. Los resultados son en general muy positivos y en ciertos aspectos podrían ser de utilidad para paliar algunas consecuencias del cambio climático. No obstante, no existen trabajos sobre su posible efecto en vinos espumosos.

En este capítulo se aborda el objetivo 2, en el que se plantea evaluar el impacto de la inoculación secuencial con dos levaduras no-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbruekii* y *Metschnikowia pulcherrima*) y una *Saccharomyces cerevisiae* sobre la composición y características espumantes en los vinos base.

Las analíticas de los vinos obtenidos fueron realizadas en el laboratorio del grupo *Tecnología Enológica* (TECNENOL) y en el grupo *Biotecnología Enológica* (BE) del departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili (URV, Tarragona). Las analíticas de aromas fueron realizados por encargo en el laboratorio de análisis de aromas de la Universidad de Zaragoza. Los resultados del ensayo fueron publicados en la revista *European Food Research and Technology* en el artículo titulado “**Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production.**”

Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production

Elena González-Royo · Olga Pascual · Nikolaos Kontoudakis · Mireia Esteruelas · Braulio Esteve-Zarzoso · Albert Mas · Joan Miquel Canals · Fernando Zamora

Received: 4 September 2014 / Revised: 25 November 2014 / Accepted: 26 November 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract The use of non-*Saccharomyces* yeasts for the production of quality wine has become increasingly frequent in recent years. Several studies of the influence of *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima* on chemical composition have been reported, especially in aspects concerning aroma. The aim of this article was to study the influence of sequential inoculation of these non-*Saccharomyces* yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* on the composition and quality of base wine for sparkling wine production. The results indicate that sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts may be an interesting tool for obtaining base wines with different characteristics. On the one hand, *T. delbrueckii* Biodiva™ strain increased glycerol concentration, reduced volatile acidity and exerted a positive effect on foaming properties improving foamability (Hm) and foam persistence (Hs). On the other hand, *M. pulcherrima* Flavia® strain also increased foam persistence (Hs) and changed the aromatic profile, increasing smoky and flowery notes.

Keywords *Torulaspora delbrueckii* · *Metschnikowia pulcherrima* · Sequential inoculation · Base wine · Foam · Proteins · Aroma

Introduction

Alcoholic fermentation is the anaerobic transformation of sugars, mainly glucose and fructose, into ethanol, carbon dioxide and other secondary products. This process, which is carried out by yeast, makes it possible to turn grape juice into wine. However, grape must is a non-sterile substrate that contains several types of yeasts and bacteria which can grow and consequently affect the final wine composition and quality. The presence of different yeasts in grape juice depends on several factors, such as the grape cultivar, the grape's maturity, pesticide treatments, the development of fungal plagues, climatic conditions and viticultural practices [1]. However, other factors are also important. All contact of grapes and must during harvest, transport and in particular, during winery operations significantly influence the final distribution of yeasts at the beginning of alcoholic fermentation [2].

Numerous studies have been performed to isolate and identify the yeasts present on the surface of grapes and winery equipment [1, 3]. Other studies have focused on the quantitative and qualitative changes in different yeast populations during alcoholic fermentation [4–6]. In general, these studies have confirmed that during spontaneous alcoholic fermentation, grape must is transformed into wine by the sequential activity of different yeast species. Under these conditions, fermentation generally begins with the growth of weakly fermentative yeast species belonging to the genera *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Torulaspora* and *Zygosaccharomyces* [7]. These species, known collectively as non-*Saccharomyces* yeasts, are practically undetectable after 2 or 3 days of fermentation [2, 3]. As these yeasts disappear, highly fermentative strains of the species *Saccharomyces cerevisiae* begin to multiply until they become solely

E. González-Royo · O. Pascual · N. Kontoudakis · M. Esteruelas · B. Esteve-Zarzoso · A. Mas · J. M. Canals · F. Zamora (✉)
Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, Campus de Sescelades, C/Marcel·li Domingo, s/n., 43007 Tarragona, Spain
e-mail: fernando.zamora@urv.cat

responsible for alcoholic fermentation [3]. Evidently, the succession of these different yeast species during alcoholic fermentation influences the final composition of the wine in some of their organoleptic key compounds in such a way that depending on which yeasts have grown, it may be positive in some cases or negative in others [8, 9]. Since some of these non-*Saccharomyces* yeasts can produce several negative by-products, wineries usually add sulphur dioxide to the grape juice to prevent their undesirable growth. Moreover, most wineries inoculate selected dry yeast (*S. cerevisiae*) in order to guarantee alcoholic fermentation without any deviation. However, other wineries, especially traditional wine cellars, still use spontaneous alcoholic fermentation, because they believe that the sequential development of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts confers greater complexity on wines.

The role of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking has been reassessed in recent years [10]. Some studies have looked at the use of controlled mixed fermentations using non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeast species [11, 12]. These studies have shown that mixed fermentations using controlled inoculations of *S. cerevisiae* starter cultures and non-*Saccharomyces* yeasts are a feasible way of improving wine complexity, because this practice has been observed that increases the typicality of wines and ensures a correct alcoholic fermentation [13]. This practice has also been reported as being able to increase some desirable metabolites, such as some acetate esters [14] and glycerol [15, 16]. Moreover, some non-*Saccharomyces* yeasts have been reported as being able to release more polysaccharides than *S. cerevisiae* strains [17].

Hanseniaspora and *Torulaspota* genera have also been reported as improving the presence of some interesting aromas [18, 19] and reducing volatile acidity [16, 20]. A non-*Saccharomyces* yeast, *Torulaspota delbrueckii*, formerly known as *Saccharomyces rosei* or *Saccharomyces delbrueckii*, has recently received considerable attention from the wine industry. This yeast is a typical representative of the natural microbiota on the grape's surface and just like *S. cerevisiae* can be found in most wine-producing regions [21].

Torulaspota delbrueckii has previously been suggested for the vinification of musts low in sugar and acidity, and it has been used for the production of red and rosé wines in Italy [22] and for Sauvignon Blanc in South Africa [12]. More recently, [19] used *T. delbrueckii* in pure cultures and cultures mixed with *S. cerevisiae* yeast to ferment botrytised musts. This study demonstrated that a mixed culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* was the best combination for improving the analytical profile of sweet wines because it considerably reduced the production of volatile acidity (53 %) and acetaldehyde (60 %). The presence of *T. delbrueckii* has also been reported to increase the presence

of some volatile compounds [23] because of its higher β -glucosidase activity [19]. In addition, some strains of *T. delbrueckii* also appeared to have a greater polysaccharide production capacity than *S. cerevisiae* [17, 24].

Another non-*Saccharomyces* yeast which is attracting attention from the wine industry is *Metschnikowia pulcherrima*. This yeast is generally present during the early stages of grape juice fermentation [25] and has also shown some relevant detectable effects in wine composition. In specific terms, *M. pulcherrima* is a high producer of β -glucosidase [26] and its presence in mixed cultures can decrease the volatile acidity and increase the production of medium-chain fatty acids, higher alcohol, esters, terpenols and glycerol [15, 27].

Some authors have also reported that *M. pulcherrima* can decrease the titratable acidity of the final wines [15, 28]. This effect on the total acidity can be considered positive or negative, depending on the initial acidity level of the grape juice [28]. It has also been reported that *M. pulcherrima* has a higher capacity to release polysaccharides during alcoholic fermentation compared to *S. cerevisiae* [24]. More recently, sequential fermentations using *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* have been reported as producing wines with a significantly lower ethanol concentration [16].

Another recently described interesting aspect is that *M. pulcherrima* has an antimicrobial activity. The presence of *M. pulcherrima* does not influence the growth of *S. cerevisiae* but has a broad and effective antimicrobial action on undesired wild spoilage yeasts, such as *Brettanomyces/Dekkera* [29].

Today, sparkling wines account for an important percentage of the high-quality wine market and they are the type of wines for which sales have increased most in recent years [30]. There are significant differences between sparkling and still wines, of which the presence of a high carbon dioxide concentration (10–12 g/L) is the most important. The persistence of the foam of sparkling wines is one of the major factors affecting their visual organoleptic characteristics [31]. The ability of sparkling wines to form a stable collar is considered a criterion of quality by consumers [32]. It has been reported that the proteins and mannoproteins composition of base wines exert a major influence on their foaming properties [31, 32]. Some authors have studied the influence of the different *S. cerevisiae* strains during the first and second fermentation of sparkling wines, as well as during the ageing period [33, 34]. However, to our knowledge, there are no previous specific studies of the influence of sequential inoculation of non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* during the first fermentation on the chemical composition and foaming properties of base wines in sparkling wine production.

The aim of this study was to determine the effect on the organoleptic quality and analytical composition of base

wines obtained by sequential inoculation of two different non-*Saccharomyces* (*M. pulcherrima* and *T. delbrueckii*) and *S. cerevisiae* during the first fermentation of base wines of the AOC Cava.

Materials and methods

Chemicals

All products were of high purity and suitable for high-performance liquid chromatography (HPLC). Absolute ethanol, hydrochloric acid, L-tartaric acid, sodium hydroxide, D-glucose and D-fructose were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Ammonium acetate, ammonium chloride, ammonium formate, L-glutamine, L-asparagine, L-alanine, L-isoleucine, L-methionine, L-threonine, L-cysteine, L-tyrosine, L-valine, glycine, L-phenylalanine, glutamic acid, L-serine, L-leucine, L-histidine, L-tryptophan and L-lysine were provided by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Difco yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulphate were purchased from B. D. Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA). Yeast extract, peptone, agar and lysine agar were purchased from Oxoid (Barcelona, Spain).

A Shodex P-82 pullulan calibration kit (P-5, $M_w = 5.9$ kDa; P-10, $M_w = 11.8$ kDa; P-20, $M_w = 22.8$ kDa; P-50, $M_w = 47.5$ kDa; P-100, $M_w = 112$ kDa; P-200, $M_w = 212$ kDa; P-400, $M_w = 404$ kDa; P-800, $M_w = 788$ kDa) was obtained from Waters (Barcelona, Spain), and a pullulan 1.3 kDa and four BioChemika dextrans (12, 25, 50 and 80 kDa) were obtained from Fluka (St. Louis, MO, USA). The polysaccharides used as external standards for quantification were pectins from citrus fruit ($\geq 90\%$), and dextrans synthesised by *Leuconostoc mesenteroides* ($\geq 99.9\%$) were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

The protein used as an external standard for quantification was bovine serum albumin (BSA) purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

All solutions were filtered beforehand through 0.22 μm acetate cellulose filters (Millipore GSE).

Grape samples

The study was carried out with grapes of the *Vitis vinifera* cv. Macabeo. The grapes were manually picked from vineyards of Juvé & Camps SL in Espiells [AOC Cava; 41° 27' 1.8972" (N) and 1° 49' 6.6216" (E)] during the 2013 vintage. The grapes were immediately transported to the experimental winery of the Oenology Faculty of the Rovira i Virgili University in Constantí (Tarragona, Spain).

Winemaking procedure

The grapes (1,200 kg) were crushed with an automatic crusher (Delta F2, Bucher Vaslin SA, Chalonnes sur Loire, France) and pressed with a pneumatic press (Marzola, Navarre, La Rioja, Spain) to obtain a yield of 0.6 L/kg of grape juice. Since non-*Saccharomyces* yeasts are usually very sensitive to high concentrations of sulphur dioxide, the grape juice was immediately sulphited with a relatively low dose (30 mg/L of potassium disulphite) and filtered with a rotary vacuum filter (Della Toffola, Treviso, Italia). Seventy litres of filtered grape juice was then pumped to each of nine stainless steel tanks with a capacity of 100 L. These tanks were equipped with a jacket for temperature control. The initial density of the grape juice was 1,071. Three tanks were immediately inoculated with 250 mg/L of a commercial *S. cerevisiae* yeast strain considered as control (QA23[®], Lallemand Inc., Montreal, Canada). Another three tanks were initially inoculated with 250 mg/L of a commercial *T. delbrueckii* (Biodiva[™], Lallemand Inc., Montreal, Canada), and 24 h later, when the density had fallen to around ten units, these tanks were reinoculated with 250 mg/L of the control *S. cerevisiae* yeast strain (QA23[®], Lallemand Inc., Montreal, Canada). Finally, the remaining three tanks were initially inoculated with 250 mg/L of a commercial *M. pulcherrima* (Flavia[®], Lallemand Inc., Montreal, Canada), and 36 h later, these tanks were reinoculated with 250 mg/L of the control *S. cerevisiae* yeast strain (QA23[®], Lallemand Inc., Montreal, Canada). All the grape juices were supplemented with 400 mg/L of a yeast fermentation nutrient (Nutrient Vit Blanc, Lallemand Inc., Montreal, Canada). All vinifications were performed at 18 ± 1 °C. Once the alcoholic fermentations were finished, the wines were racked and sulphited (40 mg/L of potassium disulphite). All the wines were maintained in airtight vessels at 4 °C until the analysis, which took place three months later, when the wines were stable against potassium hydrogen tartrate precipitation [35]. No treatment with bentonite was performed because base wines were nearly stable [36], and the use of bentonite as riddling agent during second fermentation guarantees the stability of the future sparkling wines [32].

Synthetic grape juice fermentations

Similar fermentations were also performed by triplicate in a synthetic grape juice reproducing the experimental conditions developed in the natural grape juice. The aim of this experimental approach was to study the effect of sequential inoculations in a simpler matrix. A modification of the synthetic grape juice described by Riou et al. [37] was used. The only change was in the sugar concentration that was 170 g/L (85 g/L glucose and 85 g/L fructose).

The yeast assimilable nitrogen (YAN) content in grape must was 300 mg N/L, as well as 120 mg N/L ammoniacal nitrogen (ammonium chloride), and 180 mg N/L amino acids (4.65 mg N/L asparagine, 11.39 mg N/L glutamic acid, 10.40 mg N/L serine, 47.87 mg N/L glutamine, 3.05 mg N/L histamine, 3.40 mg N/L glycine, 8.87 mg N/L threonine, 29.60 mg N/L arginine, 22.90 mg N/L alanine, 1.51 mg N/L tyrosine, 2.41 mg N/L cysteine, 5.29 mg N/L valine, 2.93 mg N/L methionine, 11.95 mg N/L tryptophan, 3.20 mg N/L phenylalanine, 3.47 mg N/L isoleucine, 5.14 mg N/L leucine, 1.62 mg N/L lysine). This synthetic grape juice also contained 1.70 g/L of the yeast nitrogen base (YNB) w/o amino acids and ammonium and 4 g/L tartaric acid, and adjusted to pH 3.2 with sodium hydroxide.

Wine sampling and yeast isolation during fermentations

Samples were taken from each vat during the vinification process at the beginning and the end of alcoholic fermentation. The initial point was 24 h after first inoculation, and the final point was when the density was lower than 995. Fifty-microlitres sterile plastic flasks were then filled with the must/wine from the centre of the vessels, kept under refrigerated conditions and transported to the laboratory. After dilutions, the samples were spread on two culture media plates. The first was YPD (yeast extract 1 % (w/v), peptone 1 % (w/v), glucose 2 % (w/v) and agar 2 % w/v) which allows all yeasts to grow [38]. The second culture medium was lysine agar (LYS), which is unable to support the growth of *S. cerevisiae* [39]. The plates were incubated for 48 h at 28 °C. Yeast colonies were counted, and ten colonies were randomly selected from each medium and from each fermentation sample for identification.

DNA extraction and identification of yeast colonies

Yeast identification was carried out by means of PCR-RFLP of the 5.8S-ITS ribosomal region, as previously described [40]. Specific differentiation between *C. zemplinina* and *C. stellata* was employing the restriction enzyme MboI [41]. The results are presented as the arithmetic mean of the percentage of imposition of the three replicates.

Standard wine analysis

The analytical methods recommended by the OIV (2014) [42] were used to determine the ethanol content, titratable acidity, pH, volatile acidity and glycerol.

Measurement of foaming properties

The samples were centrifuged (10 min at 12,000 g) and tempered at 18 °C for 24 h before analysis. All foam

measurements were taken using the Mosalux procedure [43]. A glass cylinder placed on a glass frit was filled with 100 mL of the sample. Carbon dioxide was then injected into the glass cylinder through the glass frit, with a constant gas flow of 115 mL/min under a constant pressure of 100 kPa.

Two parameters were measured: Hm corresponding to the maximum height reached by the foam after CO₂ injection through the glass frit and Hs corresponding to the stable height during CO₂ injection. Hm represented the foamability (the wine's ability to foam), and Hs represented the foam stability (persistence of the foam collar or the wine's ability to have a stable foam). Both parameters, Hm and Hs, are expressed in mm. All measurements were determined in triplicate.

Polysaccharides extraction from samples

The samples were processed using the methodology described by [44]. Briefly, 10 mL of wine samples was centrifuged for 20 min at 10,000×g in a Biofuge Primo (Heraeus, Hanau, Germany). The supernatant was concentrated to a final volume of 2 mL using a vacuum evaporator (Univap 100ECH, Uniequip, Martinsried, Germany). The total soluble polysaccharides were precipitated by the addition of 10 mL cold acidified ethanol (HCl 0.3 M in absolute ethanol) and kept for 24 h at 4 °C. The samples were then centrifuged (10,000×g, 15 min) and the supernatants discarded. Finally, the precipitates were dissolved in 1 mL of ultra-pure water, frozen to -20 °C and freeze-dried using a lyophilizer (Christ Alpha 1-4, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany).

Determination of polysaccharides by HRSEC-RID

The soluble fractions were analysed by high-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC) [44] in order to determine the molecular distribution and quantify the proteins obtained from samples. The lyophilised samples were resuspended in 1 mL of 50 mM ammonium formate, filtered through 0.22 µm acetate cellulose filters (Millipore GSE), and then, 100 µL was injected into the chromatographic system. The analyses were carried out in an HPLC Agilent 1200 Series system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) with a refractive index detector. Separation was carried out at 20 °C, using two different Shodex gel permeation HPLC columns (OHpak SB-803 HQ and SB-804 HQ, 300 mm × 8 mm I.D.; Showa Denko, Japan). The mobile phase consists of an aqueous solution of 50 mM ammonium formate applied with a constant flow of 0.6 mL/min for 60 min, and the cell RID temperature was 35 °C. The molecular weight distribution of the wine fractions was followed by calibration with pullulan and dextran

standards of different molecular weights (see above). The polysaccharides were quantified according to the peak area for each fraction, using the external standard method with pectin and dextran commercial standards. The calibration curve was obtained by injection of standard solutions, under the same conditions as for the samples analysed, in the range between 0 and 2 g/L.

Sample preparation for protein analysis and for enrichment of wines with colloids

Aliquots of 15 mL of white wines and synthetic wines were centrifuged (10 min at 12.000×g) in a Sorvall RC-5C (Heraeus, Hanau, Germany) and dialysed in tubes of a molecular weight cut-off of 3,500 Da (Membrane Filtration Products Inc., San Antonio, TX, USA). The dialysed samples were lyophilised (Christ Alpha 1–4, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany) and preserved at –20 °C until the time of analysis. A similar procedure was applied to aliquots of 200 mL of synthetic wines in order to obtain a colloid extract to enrich samples of 200 mL of control white wine with the released colloids from *S. cerevisiae* and both sequential inoculations. These enriched wines were used to measure the foaming properties in comparison with the original control wine.

Determination of proteins by HRSEC-DAD

The soluble fractions were analysed by high-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC) in order to determine the molecular distribution and quantify the proteins obtained from samples [45]. The lyophilised samples were resuspended in 0.6 µL of 300 mM ammonium acetate and were centrifuged at 12,000 g for 5 min. The supernatant was filtered through 0.22 µm acetate cellulose filters (Millipore GSE), and 100 µL of supernatant was then injected into the chromatographic system. The analyses were carried out in an HPLC Agilent 1200 Series system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) with a DAD detector monitored at 230, 280 and 320 nm. Separation was carried out at 20 °C using a Shodex gel permeation HPLC columns (OHpak SB-803 HQ, 300 mm × 8 mm I.D.; Showa Denko, Japan). The mobile phase consists of an aqueous solution of 300 mM ammonium acetate applied with a constant flow of 0.6 mL/min for 70 min. The proteins were quantified according to the peak area for each fraction and using the external standard method with BSA (see above) in the range between 0 and 10 mg/mL ($r^2 > 0.99$).

Analysis of volatile compounds

The analysis of volatile compounds was tasked to the Laboratory for Aroma Analysis and Oenology of the University

of Zaragoza (Zaragoza, Spain) according to the methods proposed and validated by Barata et al. [46].

The quantification of major compounds was carried out using the method previously described [47]. The extract was prepared in accordance with this method with adjustments [46]: in 15-mL screw-capped centrifuge tubes, containing 4.1 g of ammonium sulphate, were added 2.7 mL of wine, 6.3 mL of water, 20 µL of internal standard solution (2-butanol, 4-methyl-2-pentanol, 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone, heptanoic acid and 2-octanol at 200 µg/mL in ethanol), and 0.25 mL of dichloromethane. The tubes were shaken for 90 min and then centrifuged at 867×g for 10 min. Once the phases had been separated, the dichloromethane phase was recovered with a 0.5-mL syringe and transferred to a 0.3-mL vial. The extract was then analysed by GC in a Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph with FID. This instrument was equipped with capillary column DB-WAX (30 m and 0.32 mm I.D. and 0.5-µm film thickness) from J&W Scientific preceded by a 2 m × 0.53 mm uncoated precolumn. Chromatographic conditions were as follows: hydrogen as the carrier gas (2.2 mL/min; split injection mode 1:10 (split relation) with 3-µL injection volume; injector temperature at 250 °C; and detector temperature at 250 °C). The initial column temperature was 40 °C for 2 min, heated to 200 at 2 °C min, and remaining at that temperature for 30 min. Quantitative data were obtained by interpolation of relative peak areas in the calibration graphs built by interpolation of relative peak areas in the calibration graphs built by the analysis of synthetic wines containing known amounts of the analytes.

This analysis was carried out using the methods proposed and validated by [48] with adjustments [46]: standard SPE cartridges (1 mL total volume) filled with 50 mg of LiChrolut EN resins were placed in the vacuum manifold extraction system, and the sorbents were conditioned by rinsing the cartridges with 6 mL of dichloromethane, 2 mL of methanol, and finally, 2 mL of a water–ethanol mixture (12 %, v/v). The cartridges were then loaded with 15 mL of wine sample and 10 µL of a surrogate standards solution containing 3-octanone, β-damascene and heptanoic acid (all at 200 µL/g of ethanol). This mixture was passed through the SPE cartridges (2 mL/min) followed by a wash step using 5 mL of 40 % water–methanol solution. The resins were then dried by letting air pass through (negative pressure of 0.6 bars, 10 min). Analytes were recovered in a 2-mL vial, by elution with 0.6 mL of dichloromethane. Twelve microlitres of an internal standard solution (300 mg/L of 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone and 2-octanol) was added to the eluted sample. The extract was then analysed by GC with ion-trap MS detection. CP-3800 gas chromatographic

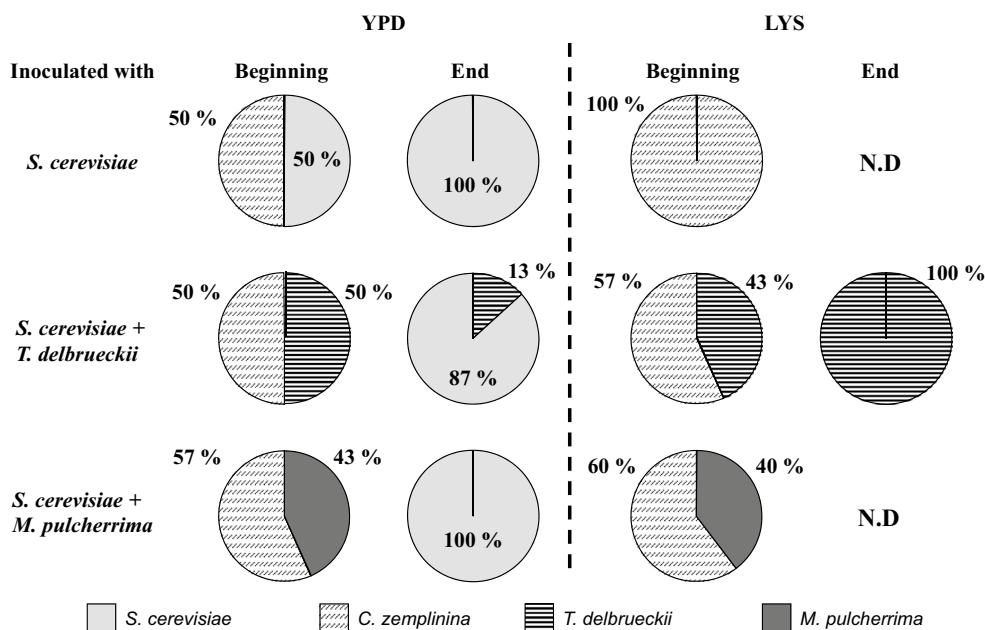


Fig. 1 Percentage of presence of the different yeasts at the beginning and at the end of alcoholic fermentation

analyses were performed under the conditions described in [48].

Sensory analysis

All sensory analyses were performed in the tasting room of the Faculty of Oenology of Tarragona (Rovira i Virgili University) which was designed according to UNE-EN ISO 8589:2010 [49]. Tasting was carried out with the ISO official tasting glasses (ISO 3591.1977). To evaluate the effect of sequential inoculation with *T. delbrueckii* or *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* versus the control fermented only with *S. cerevisiae* on wine organoleptic characteristics, all the wines were tasted by a group of nine expert tasters from the Rovira i Virgili University. Two sensory triangle tests were conducted to compare the control wine with both sequential inoculation wines according to UNE ISO 4120.1983. In all the cases, the main objective was to determine whether tasters were able to recognise the wine that was different. The second objective was to determine which wine was preferred by the panellists who correctly identified the different wines.

Statistical analysis

One-factor analysis of variance (ANOVA) was carried out using SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). The level of significance of sensory triangle tests was determined following Jackson's method [50].

Results and discussion

Yeast population kinetic

Figure 1 shows the percentage of presence of the different yeasts at the beginning and the end of alcoholic fermentation of the different experimental conditions. When the culture medium was YPD, a high presence of indigenous non-*Saccharomyces* yeast, *Candida zemplinina* (formerly *C. stellata*), was detected at the beginning of the fermentation in all the samples (between 50 and 57%). The presence of *C. zemplinina* at the beginning of alcoholic fermentation has previously been described as very common in spontaneous and in inoculated fermentation [2, 3]. However, the presence of the initially inoculated yeast was confirmed in all cases. Specifically, *S. cerevisiae* was present at 50%, whereas *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* were present at 50 and 43%, respectively, in their corresponding inoculated tanks. These data confirm that in all cases, the inoculated yeasts were present at the beginning of the alcoholic fermentation despite the high presence of *C. zemplinina*. The initial high population of *C. zemplinina* as well as the presence of the corresponding inoculated yeasts was confirmed when the LYS medium was employed. In the particular case of the grape juice inoculated with *S. cerevisiae*, the presence of *C. zemplinina* was 100% which is quite logical because only non-*Saccharomyces* can grow in this medium. By contrast, *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* were present

Table 1 Standard parameters

Condition	Parameter	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	<i>M. pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i>
White wine	Ethanol (% v/v)	10.7 ± 0.1 a	10.7 ± 0.0 a	10.6 ± 0.3 a
	TA (g/L tartaric acid)	5.68 ± 0.0 a	5.60 ± 0.1 a	5.60 ± 0.0 a
	pH	2.81 ± 0.0 a	2.80 ± 0.0 a	2.88 ± 0.1 a
	Volatile acidity (g/L acetic acid)	0.18 ± 0.01 a	0.12 ± 0.02 b	0.21 ± 0.02 a
	Glycerol (g/L)	4.7 ± 0.3 a	5.3 ± 0.1 b	5.3 ± 0.6 ab
Synthetic wine	Ethanol (% v/v)	9.10 ± 0.17 a	9.07 ± 0.21 a	9.13 ± 0.15 a
	TA (g/L)	4.68 ± 0.04 a	4.55 ± 0.09 a	4.60 ± 0.17 a
	pH	3.03 ± 0.02 a	2.98 ± 0.04 a	2.96 ± 0.02 a
	Volatile acidity (g/L acetic acid)	0.77 ± 0.04 a	0.23 ± 0.02 b	0.65 ± 0.08 a
	Glycerol (g/L)	6.5 ± 0.1 a	7.0 ± 0.1 b	6.4 ± 0.1 a

All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates ± standard deviation. TA titratable acidity
 Different letters indicate the existence of statistically significant differences ($p < 0.05$) between samples

at 43 and 40 %, respectively, in their corresponding inoculated tanks in the LYS medium at the beginning of alcoholic fermentation.

As expected, the preponderance of *S. cerevisiae* at the end of alcoholic fermentation was clear in all the cases in the YPD medium and was 100 % in the case of the tank inoculated only with *S. cerevisiae*, and also when sequential inoculation with *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* was carried out. This has been previously described by [51] probably due to the difficulty of surviving elevated alcoholic [52]. This preponderance was also present when the sequential inoculation with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* was applied. However, in that case, a slight presence of *T. delbrueckii* (13 %) was detected, confirming the ability of this non-*Saccharomyces* yeast to survive at high ethanol concentrations [20, 48]. These data were confirmed when the LYS medium was employed. In that case, the percentage of *T. delbrueckii* was 100 %. By contrast, no colonies were detected in the tanks inoculated only with *S. cerevisiae* or with *M. pulcherrima* and then with *S. cerevisiae*. These results are quite logical, since *S. cerevisiae* cannot grow in this medium and the other non-*Saccharomyces* yeast present at the initial point of the different medium, *C. zemplinina* and *M. pulcherrima* cannot survive at high ethanol concentrations [2, 4].

Taken together, these data confirm that all the inoculated yeasts were at least present in a significant level in their corresponding vats, although in all cases the presence of indigenous *C. zemplinina* was really high. This yeast is present in all fermentations around 50–60 %, and for this reason, it is expected that the effect of its presence on the properties of wine is comparable with control. The validity of the experimental design is consequently confirmed.

Standard parameters

Table 1 shows the standard parameters of the white wines and synthetic wines. The ethanol content, titratable acidity and pH of all the samples were very similar, indicating that no statistically significant differences ($p < 0.05$) were caused in these parameters by sequential inoculation of both non-*Saccharomyces* yeasts. *M. pulcherrima* has been previously described as being able to significantly decrease ethanol content [16], but this was not the case under our experimental conditions. The glycerol content and volatile acidity from sequential inoculations with *M. pulcherrima* were also similar to the control wines. However, the development of *T. delbrueckii* at the beginning of alcoholic fermentation produced some interesting differences in volatile acidity and glycerol concentration. Specifically, wines from sequential inoculation with *T. delbrueckii* had significantly higher glycerol content and significantly lower volatile acidity than their corresponding control wines. In the particular case of volatile acidity, this difference was drastic in the synthetic medium, in which the volatile acidity was more than three times lower. These data are consistent with previously published data, which have described *T. delbrueckii* as producing wines with lower volatile acidity and higher glycerol content [17, 21].

Foam parameters

Figure 2 shows the foam parameters of white wines and synthetic wines. The results for foamability (Hm) were very interesting. Sequential inoculation with the employed strain of *T. delbrueckii* seems to improve the foam characteristics of white wine, because both parameters, Hm and Hs, increased significantly in white wine (by 17 and 20 %, respectively). By contrast, sequential inoculation

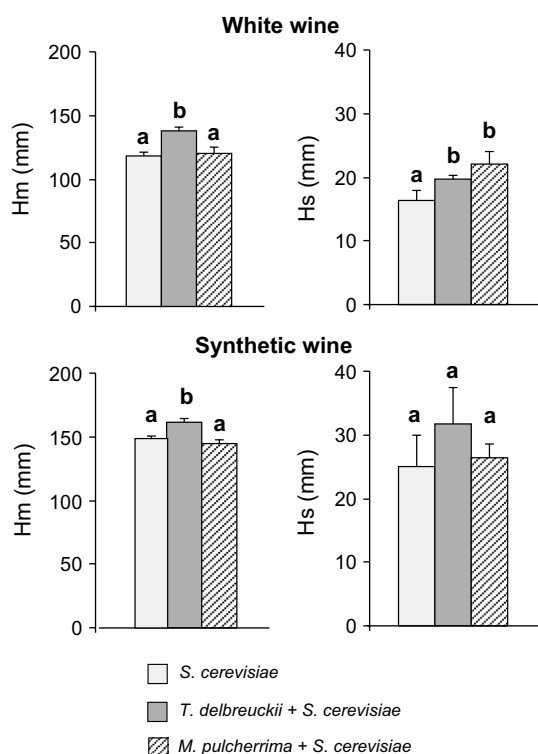


Fig. 2 Foam parameters of synthetic and natural wines. All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates \pm standard deviation. Different letters indicate the existence of statistically significant differences ($p < 0.05$)

with *M. pulcherrima* did not improve Hm, but significantly increased Hs in white wine, and the increase was even higher than in the case of *T. delbrueckii* (35 %).

This tendency was also observed in the synthetic wines but to a lesser degree. Specifically, Hm was slightly but significantly higher (9 %) in sequential inoculation, whereas no differences were observed in the case of *M. pulcherrima*. No significant differences were found in Hs in any

of the experimental conditions, possibly because Hs is not stable in that media.

Proteins and polysaccharides

Proteins and mannoproteins released by yeasts have been reported as exerting a positive effect on foam parameters [33]. Molecular exclusion HPLC of all the samples was performed for this reason (Table 2). The total protein content of white wines and synthetic wines was significantly higher in samples from sequential inoculation with *T. delbrueckii* than in the corresponding controls. These differences were mainly due to the lower molecular weight fraction (LMw; molecular weight < 60 kDa). Since proteins can stabilise the bubble's film because of their surface properties [33], the increase in LMw protein fraction may be related to the improved foam parameters observed in this wine.

It has been described that it exists a relationship between foam characteristics and chemical composition of base wines and their corresponding sparkling wines [36]. Consequently, it is expected that the corresponding sparkling wines maintain these characteristics.

By contrast, the total protein content of wines from sequential inoculation with *M. pulcherrima* was similar to the controls. Some slight but significant differences were observed in the high molecular weight fraction (HMw; molecular weight > 80 kDa). However, no differences were found in any of the other fractions.

Table 3 shows the polysaccharide fraction of the different wines. The total polysaccharide concentration of white wine fermented by sequential inoculation with *T. delbrueckii* was very similar to the controls. This similar behaviour was observed in all molecular weight fractions. However, sequential inoculation with *M. pulcherrima* produced a white wine with a significantly higher concentration of total polysaccharides. This increase was mainly

Table 2 Proteins

Condition	Parameter	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	<i>M. pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i>
White wine	HM _w ($M_w > 80$ kDa)	4.8 \pm 0.4 a	5.3 \pm 0.3 a	2.4 \pm 0.3 b
	IM _w (80 kDa > M_w > 60 kDa)	10.5 \pm 0.4 a	12.0 \pm 0.8 a	10.4 \pm 0.4 a
	LM _w ($M_w < 60$ kDa)	88.6 \pm 0.5 a	103.2 \pm 1.8 b	80.1 \pm 8.9 a
	Total protein	103.3 \pm 4.9 a	120.7 \pm 3.2 b	96.9 \pm 8.8 a
Synthetic wine	HM _w ($M_w > 80$ kDa)	4.1 \pm 0.4 a	5.7 \pm 0.0 b	7.4 \pm 0.8 c
	IM _w (80 kDa > M_w > 60 kDa)	5.1 \pm 0.4 a	4.8 \pm 0.0 a	5.7 \pm 1.1 a
	LM _w ($M_w < 60$ kDa)	28.0 \pm 4.3 a	52.0 \pm 0.1 b	29.5 \pm 1.1 a
	Total protein	37.2 \pm 4.1 a	62.6 \pm 0.0 b	41.0 \pm 3.7 a

All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates \pm standard deviation. HM_w high molecular weight fraction, IM_w intermediate molecular weight fraction, LM_w low molecular weight fraction

Different letters indicate the existence of statistically significant differences ($p < 0.05$) between samples

Table 3 Polysaccharides

Condition	Parameter	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	<i>M. pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i>
White wine	HM _w ($M_w > 144$ kDa)	55.8 ± 2.5 a	49.2 ± 5.6 a	68.8 ± 0.7 b
	IM _w (144 kDa > $M_w > 40$ kDa)	62.9 ± 4.6 ab	57.9 ± 6.6 a	69.9 ± 2.0 b
	LM _w (40 kDa > $M_w > 5$ kDa)	29.9 ± 5.4 a	26.1 ± 5.6 a	37.8 ± 6.3 a
	Total polysaccharides	148.7 ± 6.3 ab	139.0 ± 4.2 a	186.9 ± 27.1 b
	Total oligosaccharides	155.8 ± 53.5 ab	224.8 ± 37.5 a	114.0 ± 17.2 b
Synthetic wine	Total polysaccharides	55.2 ± 6.9 a	72.4 ± 7.0 b	52.4 ± 4.7 a
	Total oligosaccharides	232.7 ± 18.4 a	147.4 ± 1.9 b	105.2 ± 19.2 c

All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates ± standard deviation. HM_w high molecular weight fraction, IM_w intermediate molecular weight fraction, LM_w low molecular weight fraction

Different letters indicate the existence of statistically significant differences ($p < 0.05$) between samples

due to the high and the intermediate molecular weight fraction (HM_w; 144–1,000 kDa; IM_w; 40–144 kDa). *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* have previously been reported as releasing higher amounts of polysaccharides [17, 24]. However, this was not the case in our experimental conditions with *T. delbrueckii*. The oligosaccharide ($M_w < 5$ kDa) concentration of wines fermented with both sequential inoculations was also statistically similar to the controls. However, the oligosaccharide concentration of the wines fermented with sequential inoculation with *T. delbrueckii* was significantly higher than in wines fermented with sequential inoculation with *M. pulcherrima*.

The chromatogram profiles obtained in the synthetic wine were quite different to those obtained in the white wines, probably due to no polysaccharides from grapes being present in this medium. Only two peaks can be distinguished under these conditions—one peak for oligosaccharides, and other for polysaccharides. In this medium, the content of polysaccharides obtained by sequential inoculation with *T. delbrueckii* was significantly higher and the content of oligosaccharides significantly lower than in the controls. By contrast, sequential inoculation with *M. pulcherrima* led to similar polysaccharide concentrations and significantly lower oligosaccharide concentrations than in the control.

This dissimilar behaviour of *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* in synthetic wine as compared to white wine seems to indicate that the composition of the fermentation media exerts some influence on the polysaccharide and oligosaccharide release by these non-*Saccharomyces* yeasts. Indeed, some authors have suggested that the lower the content of colloids in the media, the higher the release of colloids by yeasts [53]. White wine comes from a grape juice containing grape polysaccharides, whereas the synthetic juice did not. Moreover, some of the original polysaccharides of the grape juice would have precipitated or been hydrolysed, making it impossible to establish a complete balance. In any case, sequential inoculation with *T.*

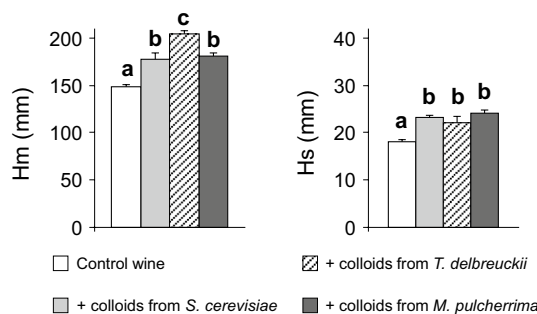


Fig. 3 Influence of the addition of the colloids released by the different yeasts on foam parameters of wine. All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates ± standard deviation. Different letters indicate the existence of statistically significant differences ($p < 0.05$)

delbrueckii produced larger amounts of polysaccharides than the controls in the synthetic medium. These data are consistent with those reported by other authors, who described *T. delbrueckii* as releasing more polysaccharides than *S. cerevisiae*, although this behaviour was not observed in the white wine.

The foaming properties of the different enriched control wines were measured in order to clarify whether the positive effects of sequential inoculation of *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* on the foam properties were due to the combination of colloids released by these yeasts during alcoholic fermentation (Fig. 3). In all cases, the enriched wines presented significantly enhanced parameters of the foam (Hm and Hs). However, the increase in Hm was significantly higher in the wines which were enriched with the colloids released by the sequential inoculation with *T. delbrueckii*. Consequently, these data confirm that sequential inoculation with *T. delbrueckii* has a clearly positive effect on this parameter. This improvement of the foam is presumably due to the released proteins included in the ensemble of colloids, which as mentioned above, exert a positive influence on bubble's film stability [31, 32].

Table 4 Fermentative volatile composition of white wines

Compounds	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	<i>M. pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i>
Acids (mg/L)			
Acetic acid	220.2 ± 21.4 a	147.5 ± 15.7 b	186.3 ± 17.0 a
Octanoic acid	20.11 ± 2.57 a	16.34 ± 1.44 a	15.86 ± 0.70 a
Decanoic acid	0.6 ± 0.0 a	0.3 ± 0.1 b	0.3 ± 0.0 b
Butanoic acid	0.94 ± 0.13 a	1.68 ± 0.07 b	1.03 ± 0.11 a
Butyric acid	1.27 ± 0.09 a	1.03 ± 0.06 b	1.04 ± 0.02 b
3-Methylbutanoic acid	1.04 ± 0.12 a	0.98 ± 0.03 a	1.07 ± 0.11 a
Hexanoic acid	4.62 ± 0.35 a	3.81 ± 0.14 b	3.75 ± 0.16 b
Total	248.8 ± 20.0 a	171.6 ± 16.8 b	200.4 ± 18.6 b
Higher alcohols (mg/L)			
3-Methyl-1-butanol	178.6 ± 11.3 a	213.9 ± 10.5 b	231.0 ± 23.8 b
β-Phenylethanol	53.6 ± 3.3 a	44.9 ± 3.6 b	48.2 ± 1.8 a
2-Methylpropanol	22.2 ± 2.1 a	32.8 ± 0.3 b	29.9 ± 1.5 b
1-Hexanol	0.92 ± 0.06 a	0.77 ± 0.06 b	0.92 ± 0.05 a
cis-3-hexen-1-ol	0.55 ± 0.03 a	0.54 ± 0.04 a	0.54 ± 0.02 a
Benzyl alcohol	0.01 ± 0.00 a	0.02 ± 0.01 a	0.01 ± 0.01 a
Methionol	1.04 ± 0.13	1.30 ± 0.22 a	0.64 ± 0.03 b
1-Butanol	0.51 ± 0.04 a	0.64 ± 0.03 b	0.52 ± 0.03 a
Total	257.4 ± 16.8 a	294.8 ± 14.1	311.7 ± 22.6 b
Aldehydes and ketons (mg/L)			
Acetaldehyde	2.33 ± 1.11 a	3.51 ± 1.53 ab	1.57 ± 0.14 b
Acetoin	0.52 ± 0.00 a	0.48 ± 0.09 a	0.44 ± 0.07 a
Major esters (mg/L)			
Ethyl propanoate	0.08 ± 0.01 a	0.10 ± 0.05 a	ld b
Butanoate Ethyl	0.19 ± 0.02 a	0.17 ± 0.05 a	0.13 ± 0.03 a
Isoamyl acetate	0.46 ± 0.04 a	0.62 ± 0.08 a	0.53 ± 0.02 a
Ethyl lactate	8.01 ± 0.71 a	6.31 ± 0.21 b	6.78 ± 0.23 c
Ethyl decanoate	0.39 ± 0.11 a	0.17 ± 0.06 b	0.14 ± 0.01 b
Diethyl succinate	0.41 ± 0.04 a	0.48 ± 0.01 ab	0.53 ± 0.04 b
2-phenyl ethyl acetate	2.37 ± 0.16 a	1.78 ± 0.19 b	1.82 ± 0.20 b
Ethyl acetate	24.4 ± 2.5 a	24.2 ± 2.2 a	19.6 ± 0.4 b
Ethyl hexanoate	1.03 ± 0.22 a	0.79 ± 0.12 a	0.68 ± 0.06 a
Ethyl octanoate	1.40 ± 0.10 a	0.99 ± 0.15 b	1.05 ± 0.14 b
1-Hexyl acetate	0.05 ± 0.02 a	0.03 ± 0.01 a	0.02 ± 0.02 a
Total	38.78 ± 2.52 a	35.59 ± 2.61 a	31.27 ± 0.31 b
Minor esters (μg/L)			
Isobutyl acetate	23.6 ± 3.6 a	26.0 ± 10.7 a	22.5 ± 1.5 a
Ethyl 2-methylbutanoate	8.28 ± 0.72 a	11.52 ± 3.03 a	9.35 ± 0.69 a
Ethyl isovalerate	15.93 ± 1.79 a	13.91 ± 2.28 a	19.13 ± 1.06 b
Butyl acetate	71.4 ± 8.4 a	69.5 ± 1.9 a	7.8 ± 1.1 b
Linalool acetate	1.02 ± 0.07 a	0.93 ± 0.16 a	0.22 ± 0.02 b
Ethyl dihydrocinnamate	0.43 ± 0.08 a	0.51 ± 0.07 a	0.38 ± 0.02 a
Ethyl 2-furoate	3.26 ± 0.23 a	3.16 ± 0.04 a	2.90 ± 0.25 a
Ethyl vanillate	0.33 ± 0.02 a	0.35 ± 0.02 a	0.24 ± 0.21 a
Methyl vanillate	3.19 ± 0.38 a	3.99 ± 0.32 ab	4.61 ± 0.29 b
Total	127.4 ± 12.9 a	130.0 ± 17.3 a	67.2 ± 1.1 b
Lactones (μg/L)			
γ-nonalactone	0.25 ± 0.01 a	0.25 ± 0.01 a	0.28 ± 0.01 b
γ-decalactone	1.57 ± 0.16 a	3.04 ± 0.59 b	3.72 ± 0.44 b
Total	1.82 ± 0.16 a	3.29 ± 0.59 b	4.00 ± 0.44 b

All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates ± standard deviation. Different letters indicate the existence of statistically significant differences ($p < 0.05$) between samples.

Volatile compounds

Table 4 shows the fermentative volatile composition of white wines. In general, the production of total acids by both sequential inoculations with non-*Saccharomyces* yeasts was significantly lower than in controls. However, acetic acid must be considered as accounting for more than 85 % in all cases, and the data should therefore be analysed separately.

The production of acetic acid by sequential inoculation with *T. delbrueckii* was significantly lower than in the controls. These data are consistent with the trends observed for the volatile acidity (Table 1) and agree with previously published data, which described acetic acid production during alcoholic fermentation as being minor when *T. delbrueckii* is present [19]. By contrast, sequential inoculation with *M. pulcherrima* originated white wines with acetic acid concentration which was similar to the controls.

Some slight but significant differences were found in some of the other acids, depending on the yeast. However, these differences were too small to provide any organoleptic difference.

The production of higher alcohols in white wines by both sequential inoculations with non-*Saccharomyces* yeasts was significantly higher, with 3-methyl-1-butanol being mainly responsible for this increase. In any case, these data confirm that the development of *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* significantly increases the production of higher alcohols, as described previously [15, 23].

The development of *T. delbrueckii* or *M. pulcherrima* during alcoholic fermentation has been reported as inducing lower production of acetaldehyde [20]. Our data confirm that this is true in sequential inoculation with *M. pulcherrima*, but not in the case of *T. delbrueckii*.

In general, the production of total major esters in wines from sequential inoculation with *T. delbrueckii* was similar to the controls, whereas it was lower in the wines from sequential inoculation with *M. pulcherrima*. However, the fact that ethyl acetate represents more than 60 % in all the samples must be considered. If ethyl acetate is not considered, no significant differences in the total major esters would be detected in any of the experimental conditions.

As was the case with higher alcohols, some slight but significant differences were found in some of the other major esters, depending on the yeast. However, these differences were too small to provide any important organoleptic difference.

With regard to the minor esters, no differences were found between the control wines and those fermented by sequential inoculation with *T. delbrueckii*. However, the presence of these minor esters was significantly lower in the wines from sequential inoculation with *M. pulcherrima*. This lower minor ester concentration was mainly due to a

drastic decrease in butyl acetate concentration (of around 90 %).

Some authors have found that the development of non-*Saccharomyces* yeasts tends to create wines with higher ester concentrations [9, 14]. As discussed above, no major differences were found in any of the sequential inoculation with non-*Saccharomyces*, with the sole exception of butyl acetate, which was at much lower levels in the wines produced from sequential inoculation with *M. pulcherrima*.

By contrast, the production of lactones by both sequential inoculations with non-*Saccharomyces* yeasts was significantly higher, and γ -decalactone was responsible for this increase.

In general, no great differences in the aromatic profile of fermentative volatile compounds were found in any of the experimental conditions. In the case of *T. delbrueckii*, these data are consistent with other studies, which found only slight differences [20].

Table 5 shows the volatile phenols of the different wines. Sequential inoculation with *T. delbrueckii* did not lead to major differences in volatile phenols. Only some slight but significant increases were detected in 4-ethylphenol and 4-vinylphenol. However, these compounds were in all cases far below the perception threshold, and they, therefore, have no sensory implications. By contrast, the total volatile phenols concentration of the wines from sequential inoculation with *M. pulcherrima* was significantly higher than in the controls. This increase was due to 4-vinylphenol, 2-methoxyphenol and especially 2,6-dimethoxyphenol. This latter compound, which has a smoky aroma [54], was present in wines from sequential inoculation with *M. pulcherrima* at a concentration four times higher than in the controls, and above its perception threshold (570 $\mu\text{g/l}$) [48]. Therefore, the presence of this compound should be perceived.

Sensory evaluation

Table 6 shows the sensory analysis results. Two triangular tests were performed, comparing the control with both sequential inoculation wines. Six tasters were able to distinguish the wines from sequential inoculation with *T. delbrueckii* from the control wines, whereas three could not. These data are statistically significant ($p < 0.05$) and consequently indicates the existence of sensory differences between these wines. Moreover, five of the six tasters who correctly identified the different wines preferred the wine from sequential inoculation with *T. delbrueckii*.

The comparison between wines from sequential inoculation with *M. pulcherrima* was even more significant ($p < 0.01$). In this case, eight tasters were able to distinguish between the wines, and five of them attributed smoky and flowery aromas to the wine fermented by sequential inoculation with *M.*

Table 5 Volatile phenols of white wines

Compounds ($\mu\text{g/L}$)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	<i>M. pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i>
<i>o</i> -Cresol	0.37 \pm 0.08 a	0.32 \pm 0.06 a	0.39 \pm 0.09 a
4-Ethylguaiaicol	1.91 \pm 0.27 a	4.64 \pm 1.53 a	4.19 \pm 1.08 a
<i>m</i> -Cresol	0.39 \pm 0.02 a	0.57 \pm 0.08 a	0.34 \pm 0.05 a
4-Propylguaiaicol	ld	ld	ld
Eugenol	0.42 \pm 0.09 a	0.51 \pm 0.06 a	0.49 \pm 0.01 a
4-Ethylphenol	0.10 \pm 0.03 a	0.27 \pm 0.06 b	0.12 \pm 0.04 a
2-Methoxy-4-vinylphenol	ld	ld	ld
2-Methoxy-4-propenyl	ld	ld	ld
Phenol,2,6-dimethoxy	150.7 \pm 19.9 a	154.7 \pm 44.6 a	629.1 \pm 128.9 b
4-Vinylphenol	78.3 \pm 6.7 a	98.2 \pm 8.4 b	100.4 \pm 4.5 b
4-Allyl-2,6-dimethoxyphenol	2.80 \pm 0.28 a	2.94 \pm 0.77 a	2.33 \pm 0.52 a
Phenol, 2-methoxy	9.56 \pm 2.55 a	10.07 \pm 2.79 a	27.09 \pm 4.30 b
Total	244.5 \pm 28.3 a	272.1 \pm 56.6 a	764.3 \pm 131.3 b

All data are expressed as the arithmetic mean of three replicates \pm standard deviation
 Different letters indicate the existence of statistically significant differences ($p < 0.05$) between samples

Table 6 Sensorial analysis results for wines

Triangular test	Positive identifications	<i>p</i>	Preferences		
			<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	<i>M. pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i> versus <i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	6/9	0.05	1	5	–
<i>S. cerevisiae</i> versus <i>M. pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i>	8/9	0.01	4	–	4

pulcherrima. The smoky perception is probably associated with the higher production of 2, 6-dimethoxyphenol since it has been previously described that has this olfactory note [54]. However, the detected flowery notes cannot be associated with any of the measured volatile compounds. In any case, there was no clear preference because among the tasters who correctly identified the different wines four preferred the control, while the other four preferred the wine from sequential inoculation with *M. pulcherrima*.

Conclusion

It can, therefore, be concluded that sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts may be a useful tool for obtaining base wines with different characteristics. On the one hand, the *T. delbrueckii* Biodiva™ strain exerts a positive effect on foaming properties, improving foamability (Hm) and foam persistence (Hs). On the other hand, *M. pulcherrima* Flavia® strain also increases foam persistence (Hs) and changes the aromatic profile by increasing smoky and flowery notes. Further studies are needed to verify whether these different characteristics produced by sequential inoculation of non-*Saccharomyces* remain in the

corresponding sparkling wines after the second fermentation and bottle ageing.

Acknowledgments The authors thank Juvé & Camps SA winery for providing the grapes and Lallemand Inc. for financial support.

Conflict of interest None.

Compliance with Ethics Requirements This article does not contain any studies with human or animal subjects.

References

- Sabaté J, Cano J, Esteve-Zarzoso B, Guillamón JM (2002) Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol Res* 157:267–274
- Constantí M, Poblet M, Arola L, Mas A, Guillamón JM (1997) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am J Enol Vitic* 48:339–344
- Beltran G, Torija MJ, Novo M, Ferrer N, Poblet M, Guillamón JM, Rozès N, Mas A (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst Appl Microbiol* 25:287–293
- Schütz M, Gafner J (1993) Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J Appl Bacteriol* 75:551–558

5. Guillamón JM, Sabaté J, Barrio E, Cano J, Querol A (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol* 169:387–392
6. Esteve-Zarzoso B, Peris-Torán MJ, García-Maiquez E, Uruburu F, Querol A (2001) Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl Environ Microbiol* 67:2056–2061
7. Urso R, Rantsiou K, Dolci P, Rolle L, Comi G, Cocolin L (2008) Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Res* 8:1053–1062
8. Heard GM, Fleet GH (1985) Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl Environ Microbiol* 50:727–728
9. Plata C, Millán C, Mauricio JC, Ortega JM (2003) Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol* 20:217–224
10. Jolly NP, Varela C, Pretorius IS (2014) Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeast in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res* 14:215–237
11. Ciani M, Maccarelli F (1997) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J Microbiol Biotechnol* 14:199–203
12. Jolly NP, Augustyn OPR, Pretorius LS (2003) The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *S Afr J Enol Vitic* 24:8–10
13. Amerine MA, Berg HW, Cruess WV (1972) The technology of winemaking, 3rd edn. The AVI Publishing Company Inc, Westport
14. Rojas V, Gil J, Piñaga F, Manzanares P (2003) Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int J Food Microbiol* 86:181–188
15. Sadineni Naresh V, Kondapalli N, Obulam V (2012) Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine. *Ann Microbiol* 62:1353–1360
16. Contreras A, Hidalgo C, Henschke PA, Chambers PJ, Curtin C, Varela C (2014) Evaluation of non-*Saccharomyces* yeast for the reduction of alcohol content in wine. *Appl Environ Microbiol* 80:1670–1678
17. Giovani G, Rosi I, Bertuccioli M (2012) Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-*Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation. *Int J Food Microbiol* 160:113–118
18. Maturano YP, Rodríguez Assaf LA, Toro ME, Nally MC, Vallejo M, Castellanos de Figueroa LI, Combina M, Vazquez F (2012) Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *Int J Food Microbiol* 155:43–50
19. Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdiou D (2008) Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol* 122:312–320
20. Sadoudi M, Tourdot-Maréchal R, Rousseaux S, Steyerd D, Gallardo-Chacón JJ, 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 Microbiol* 32:243–253
21. Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS (2006) The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *S Afr J Enol Vitic* 27:15–38
22. Castelli T (1955) Yeasts of wine fermentations from various regions of Italy. *Am J Enol Vitic* 6:18–19
23. Azzolini BT, Emanuele F, Fabio V, Paola MF (2012) Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of amarone wine. *Eur Food Res Technol* 235:303–313
24. Domizio P, Liu Y, Bisson LF, Barile D (2014) Use of non-saccharomyces wine yeast as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiol* 43:5–15
25. Prakitchaiwattana CJ, Fleet GH, Heard GM (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res* 4:865–877
26. Rodríguez ME, Lopes C, Valles S, Giraudo MR, Caballero A (2007) Selection and preliminary characterization of β -glycosidases producer patagonian wild yeasts. *Enzyme Microb Technol* 41:812–820
27. Rodríguez ME, Lopes CA, Barbagelata RJ, Barda NB, Caballero AC (2010) Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *Int J Food Microbiol* 138:19–25
28. 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 Microbiol* 28:873–882
29. Oro L, Ciani M, Comitini F (2014) Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J Appl Microbiol* 116:1209–1217
30. Ody-Brasier A, Vermeulen F (2014) The price you pay: price-setting as a response to norm violations in the market for Champagne grapes. *Adm Sci Q* 59:109–144
31. Vanrell G, Canals R, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, Zamora F (2007) Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chem* 104:148–155
32. Brissonnet F, Maujean A (1993) Characterization of foaming proteins in a Champagne base wine. *Am J Enol Vitic* 44:297–301
33. Martínez-Rodríguez A, Carrasco AV, Barcenilla JM, Angeles Pozo-Bayón MA, Carmen Polo M (2001) Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. *Food Microbiol* 18:183–191
34. Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, Buxaderas S, De La Torre-Boronat MDC (1997) Influence of variety and aging on foaming properties of Cava (sparkling wine). *J Agric Food Chem* 45:2520–2525
35. Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE (1996) Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, New York
36. Esteruelas M, Poinssaut P, Sieczkowski N, Manteau S, Fort F, Canals JM, Zamora F (2009) Comparison of methods for estimating protein stability in white wines. *Am J Enol Vitic* 60:302–311
37. Riou C, Nicaud JM, Barre P, Gaillardin C (1997) Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Yeast* 10:903–915
38. Yarrow D (1998) Methods for isolation, maintenance and identification of yeast. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The yeast. A taxonomic study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam
39. Angelo J, Siebert KJ (1987) A new medium for the detection of wild strains in brewing culture yeast. *J Am Soc Brew Chem* 45:135–140
40. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A (1999) Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8 rRNA and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 49:329–337
41. Spiczki M (2004) Species identification and comparative molecular and physiological molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. *J Basic Microbiol* 4:471–479
42. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2014) Methods of analysis of wines and must. <http://www.oiv.int/oiv/info/enmethodesinternationalesvin>

43. Poinssaut P (1991) Le mosalux appareil de mesure du pouvoir moussant du vin. *Rev Oenol* 59:36–43
44. Ayestarán B, Guadalupe Z, León D (2004) Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo V.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal Chim Acta* 513:29–39
45. Canals JM, Arola L, Zamora F (1998) Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *Am J Enol Vitic* 49:383–388
46. Barata A, Campo E, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V, Cacho J, Ferreira V (2011) Analytical and sensorial characterization of the aroma of wines produced with sour rotten grapes using GC-O and GC-MS: identification of key aroma compounds. *J Agric Food Chem* 59:2543–2553
47. Ortega C, López R, Cacho J, Ferreira V (2001) Fast analysis of important wine volatile compounds: development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionization detection analysis of dichloromethane microextracts. *J Chromatogr* 923:205–214
48. López R, Aznar M, Cacho J, Ferreira V (2002) Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr* 966:167–177
49. AENOR (2010) *Análisis sensorial*. AENOR, Madrid
50. Jackson RS (2002) Quantitative (technical) wine assessment. In: Taylor SL (ed) *Wine tasting. A professional handbook*, 1st edn. Academic Press, Hong Kong
51. Santos J, Sousa MJ, Cardoso H, Inácio J, Silva S, Spencer-Martins I, Leão C (2008) Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology* 154:422–430
52. Parapouli M, Hatziloukas E, Drainas C, Perisynakis A (2010) The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine flavor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:85–93
53. Guilloux-Benatier M, Guerreau J, Feuillat M (1995) Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms. *Am J Enol Vitic* 46:486–492
54. Culleré L, Escudero A, Cacho J, Ferreira V (2004) Gas chromatography–olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines. *J Agric Food Chem* 52:1653–1660

Capítulo III. Efecto de la cepa de levadura y de la suplementación con levadura seca inactiva durante la fermentación alcohólica en la concentración de polisacáridos del vino.

Los múltiples beneficios que conlleva el enriquecimiento en polisacáridos en el vino han sido extensamente descritos en la bibliografía. Así por ejemplo, se ha descrito que favorecen la estabilización del vino frente a la quiebra proteica y la precipitación de las sales del ácido tartárico. Asimismo se ha postulado que favorecen la estabilidad del color y que suavizan la astringencia del vino tinto, además de aumentar la untuosidad, y disminuir el impacto de ciertos aromas indeseables.

Por esta razón, la industria enológica actual ha buscado mecanismos que permitan el enriquecimiento del vino en estas macromoléculas, ya sea mediante métodos de vinificación o mediante el uso de levaduras o productos a base de levadura que lo favorezcan.

Los vinos tintos procedentes de uvas con una madurez fenólica deficiente acostumbran a ser más astringentes y amargos. En este contexto se ha

postulado que el enriquecimiento con polisacáridos puede amortiguar estas sensaciones negativas. Este es un punto de gran importancia en las condiciones que implica el cambio climático dado que el desfase entre la madurez de la pulpa y la madurez fenólica obliga en ocasiones a vendimiar uva con una madurez fenólica insuficiente.

En este capítulo se abordan el objetivo 3 y parte del objetivo 4.

El tercer objetivo plantea evaluar el impacto de la inoculación de una cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) con alta capacidad de liberación de polisacáridos sobre la composición de un vino tinto.

El cuarto objetivo 4 se plantea evaluar el efecto de la suplementación del mosto con tres levaduras secas inactivas comerciales en condiciones de fermentación en tinto.

Las analíticas de los vinos obtenidos fueron realizadas en el laboratorio del grupo *Tecnología Enológica*(TECNENOL). Los resultados del ensayo fueron publicados en la revista *American Journal of Enology and Viticulture* en el artículo titulado “**Effect of yeast strain and supplementation with inactive yeast during alcoholic fermentation on wine polysaccharides**”

Effect of Yeast Strain and Supplementation with Inactive Yeast during Alcoholic Fermentation on Wine Polysaccharides

Elena González-Royo,¹ Andoni Urtasun,¹ Mariona Gil,¹ Nikolaos Kontoudakis,¹ Mireia Esteruelas,¹ Francesca Fort,¹ Joan Miquel Canals,¹ and Fernando Zamora^{1*}

Abstract: Polysaccharides appear to exert some sort of positive sensory effect on wine composition. For this reason, attempts have been made to increase their concentration by strategies such as the use of yeast strains with a greater capacity for releasing polysaccharides and supplementation with inactive yeast pretreated to favor the release of polysaccharides in red wines. The aim of this study was to determine whether these new strategies are useful for enriching the polysaccharides in red wines. Our results confirm that both strategies provide wines with higher polysaccharide concentrations. Wines fermented with a high polysaccharide-releasing yeast strain had a 32% higher polysaccharide concentration than controls. Wines supplemented with inactive yeasts also had significant increases (11 to 20%) in polysaccharides.

Key words: wine, polysaccharides, yeasts, inactive yeasts, alcoholic fermentation

Although polysaccharides are present in wine in relatively low concentrations, they have several sensory and technological implications. Some polysaccharides can hinder processes such as settling (Villettaz et al. 1984) and filtration (Vernhet et al. 1999), while others can improve the stability of tartaric acid salts (Gerbaud et al. 1997), proteins (Waters et al. 1994), and the color of red wines (Guadalupe et al. 2007). Polysaccharides also seem to affect some sensory attributes of wine, such as mouthfeel and unctuousity (Vidal et al. 2004), astringency (Carvalho et al. 2006), aromatic persistence (Chalier et al. 2007), and the stability of the foam of sparkling wine (Vanrell et al. 2007).

Polysaccharides are components of cell walls that cover and protect the plasma membrane of plant cells (grape berries) (Carpita and Gibeau 1993, Vidal et al. 2001) and microorganisms involved in the winemaking process (yeasts and lactic acid bacteria) (Caridi 2006). Moreover, grape fungal diseases may enrich wine polysaccharide, which can lead to technological problems (Francioli et al. 1999). The use of enological additives such as arabic gum or carboxymethyl-

cellulose can also alter the composition of wine polysaccharides. Hence, wine polysaccharides can be classified in terms of their origin in grape polysaccharides, microbial polysaccharides, and additive polysaccharides.

There are several types of polysaccharides in berry cell walls (Vidal et al. 2003). However, many of them are enzymatically degraded or precipitated during alcoholic fermentation, so wine only contains appreciable amounts of arabinogalactan proteins (AGP) and type II rhamnogalacturonans (RG-II) (Vidal et al. 2003, Guadalupe and Ayestarán 2007). AGP are polymers of galactose $\beta(1\rightarrow3)$ with branches of galactose $\beta(1\rightarrow6)$ heavily substituted with arabinose at positions 3 and 4. Their molecular weight is between 50 and 200 kDa and they contain only 5% of peptide fraction. AGP are very soluble in grape juice and they are the most abundant polysaccharide (40%) in most wines (Doco et al. 1996).

RG-II are polymers of galacturonic acid branched with four different side chains containing primarily rhamnofuranose, arabinofuranose, and galactopyranose. They have a molecular weight of ~5 kDa and represent ~20% of wine polysaccharides. RG-II can complex with heavy metals (lead), preventing their absorption by the intestine (Doco et al. 2000).

Yeast is the other major source of wine polysaccharides, and yeasts can release significant amounts of mannoproteins (Giovani and Rosi 2007, Ayestarán et al. 2004). Mannoproteins are polymers of mannose $\alpha(1\rightarrow2)$ and $\alpha(1\rightarrow3)$ with branches of other monosaccharides and a peptide fraction that is less than 30% (Klis et al. 2002). Their molecular weight is highly variable (5 to 800 kDa) and they are negatively charged at wine pH (Vernhet et al. 1996). Mannoproteins are released from yeast during the exponential phase of growth, particularly by autolysis whenever wine remains in contact with yeast lees during aging (Dupin et al. 2000).

¹Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, Campus de Sescelades, C/Marcel·lí Domingo, s/n. 43007 Tarragona, Spain.

*Corresponding author (email: fernando.zamora@urv.cat)

Acknowledgments: The authors thank CICYT (AGL2011-29708-C02-01), CDTI (project CENIT Demeter), and Lallemand Inc. for financial support. Lallemand yeasts were used in this study.

Publication costs of this article defrayed in part by page fees.

Manuscript submitted May 2012, revised Aug 2012, Oct 2012, accepted Nov 2012

Copyright © 2013 by the American Society for Enology and Viticulture. All rights reserved.

doi: 10.5344/ajev.2012.12071

Since polysaccharides seem to improve some sensory wine attributes, winemakers are looking for procedures to increase their concentration in wines. The most frequent strategy is to increase the length of time the wine is in contact with the lees (Fornairon-Bonnefond et al. 2002, Del Barrio-Galán et al. 2011a, 2012). This practice, however, involves a risk of developing wine defects such as the appearance of reductive characters and *Brettanomyces* taints (Pérez-Serradilla and Luque de Castro 2008). Two strategies to avoid these problems have recently been proposed: the use of yeast strains with a greater capacity for releasing polysaccharides (Gonzalez-Ramos et al. 2010) and the supplementation of wines with inactive yeast pretreated to favor the release of polysaccharides (Guadalupe et al. 2007, Pozo-Bayón et al. 2009, Rodriguez-Bencomo et al. 2010, Del Barrio-Galán et al. 2011b). The aim of this study was to determine whether these new strategies are really useful for enriching red wines in polysaccharides.

Materials and Methods

Standards and reagents. A pullulan calibration kit Shodex P-82 (P-5, molecular weight [MW] 5.9 kDa; P-10, MW 11.8 kDa; P-20, MW 22.8 kDa; P-50, MW 47.5 kDa; P-100, MW 112 kDa; P-200, MW 212 kDa; P-400, MW 404 kDa; P-800, MW 788 kDa) was obtained from Waters (Barcelona, Spain), while a pullulan 1.3 kDa and the four dextrans Bio-Chemika (12, 25, 50, and 80 kDa) were obtained from Fluka (St. Louis, MO). The polysaccharides used as external standards were pectins from citrus and dextrans synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The remaining chemicals were of high purity and were purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

Grape samples. The study was carried out with *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. The grapes were collected from the vineyards of the Juvé y Camps winery in Sant Sadurní d'Anoia (AOC Penedès) in 2010.

Macérations in model wine solutions. Three commercial inactive yeasts were used: Optired, Booster Rouge, and Noblesse (all Lallemand Inc., Montreal, Canada). All macerations were carried out in two different synthetic solutions at a concentration 100 times higher than the concentration recommended by the manufacturer to facilitate the purification of the released substances and consequently the subsequent sensory analysis. Specifically, 45 g of each of the inactive yeasts was added to hermetic flasks containing 1.5 L of solution A or solution B. Solution A was composed of 4 g/L tartaric acid at 13% (v/v) ethanol adjusted to pH 3.5 with sodium hydroxide. Solution B was composed of mineral water at 13% (v/v) ethanol adjusted to pH 3.5 with acetic acid. Solution A was used to better reproduce the wine chemical composition for kinetic analysis of polysaccharide release. Tartaric acid and sodium hydroxide were substituted by acetic acid in solution B since their acidic, salty taste can affect sensory analysis. Acetic acid has the advantage of being volatile enough to be completely eliminated by lyophilization.

Macerations were carried out in both solutions for 15 days. In the case of solution A, 10 mL samples were extracted for polysaccharide analysis at 1, 3, 7, and 15 days. In the case

of solution B, samples were taken only at the end of 15 days of maceration. These samples were lyophilized and stored at -20°C until the day of sensory analysis.

Winemaking procedure. All Cabernet Sauvignon bunches were manually destemmed and the grapes were randomly distributed in groups of 6 kg each. The grapes were crushed with a semiautomatic crusher (Gual, Villafranca del Penedès, Spain) and sulfited (100 mg/L potassium disulfite). A total of 21 microvinifications were carried out in 8 L tanks especially prepared for submerged cap winemaking using an adaptation of a published winemaking procedure (Sampaio et al. 2007). Three tanks were inoculated with 200 mg/L of a commercial high polysaccharide-releasing yeast strain (HPS, Lallemand Inc.) and the other 18 tanks were inoculated with 200 mg/L of a control yeast strain (EC1118, Lallemand Inc.). Groups of three tanks inoculated with control yeast were supplemented with 300 mg/L of Optired, Booster Rouge, or Noblesse, respectively, while the remaining three tanks were considered as controls.

All microvinifications were performed at $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and the cap was submerged by means of a plastic perforated screen (Sampaio et al. 2007). The temperature and the density of the must were controlled daily. Two punch downs were carried out to foster phenolic compound extraction. The first was performed at a must density of ~ 1050 g/L and the second at 1030 g/L. After 15 days of maceration, the wines were racked, sulfited (100 mg/L potassium disulfite), and refrigerated for one month at 4°C . Malolactic fermentation was inhibited to prevent possible variations in the rhythm of this transformation that could affect each sample differently. The wines were then decanted and bottled. All the samples were stocked at $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$ until analysis. All wines were centrifuged at 8500 rpm for 20 min in a Hermle Z233 MK2 centrifuge (Wehingen, Germany) just before color and chemical analysis.

Standard grape and wine analysis. Analytical methods recommended by OIV (OIV 2005) were used to determine the sugar content, titratable acidity, and pH of the grapes as well as the ethanol content, titratable acidity, and pH of the wines.

Color parameters and phenolic compound analysis. Color intensity (CI) was estimated using the method described by Glories (Glories et al. 1984). Total phenolic index (TPI) was determined by measuring absorbance at 280 nm and expressed as absorbance units (Ribéreau-Gayon et al. 1999). Total anthocyanin concentration was determined spectrophotometrically using the method described by Niketic-Aleksic and Hrazdrina (1972). The proanthocyanidin concentration was estimated by precipitation with methyl-cellulose (Sarneckis et al. 2006).

Polysaccharide extraction from samples. Samples were processed using the methodology described by Ayestarán et al. (2004). Briefly, 10 mL of sample was centrifuged for 20 min at 8500 rpm (Hermle Z233 MK2) and the supernatant concentrated to a final volume of 2 mL using a vacuum evaporator (UNIVAP 100ECH, Progen Scientific, London, UK). Total soluble polysaccharides were precipitated by the addition of 10 mL cold acidified ethanol (HCl 0.3M in absolute ethanol) and kept for 24 hr at 4°C . Samples were centrifuged

(8500 rpm, 15 min), the supernatants discarded, and the pellets washed several times with cold ethanol to remove the interference materials. Finally, the precipitates were dissolved in 1 mL ultrapure water, frozen to -80°C, and freeze-dried using an ALPHA 1-4 lyophilizer (Martin Christ GmbH, Osterode, Germany).

Determination of polysaccharides by HR-SEC-RID. In order to determine the molecular distribution and quantify the polysaccharides obtained from samples, the soluble fractions were analyzed by high-resolution size-exclusion chromatography (HR-SEC) (Ayestarán et al. 2004). The lyophilized samples were resuspended in 1 mL 50 mM ammonium formate, filtered through a cellulose filter with a pore size of 0.22 µm, and then 100 µL was injected into the chromatographic system. The analyses were carried out in an 1200 Series System HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) consisting of a degasser module (G1322A), quaternary pump (G1311A), autosampler (G1329A), column oven (G1316A), and refractive index detector (RID) (G1362A). Separation was carried out at 20°C using two different Shodex gel permeation HPLC columns (OHpak SB-803 HQ and SB-804 HQ, 300 mm x 8 mm i.d.; Showa Denko, Tokyo, Japan). The mobile phase consisted of an aqueous solution of 50 mM ammonium formate applied with a constant flow of 0.6 mL/min for 60 min, and the temperature of RID cell was 35°C. The molecular weight distribution of the wine fractions was followed by calibration with pullulan and dextran standards of different molecular weights (see above). The polysaccharides were quantified according to the peak area for each fraction and using the external standard method with pectin and dextran commercial standards (Sigma-Aldrich) ranging from 0 to 2 g/L ($r^2 > 0.99$).

Sensory analysis. A bench tasting of all the samples obtained by maceration of the different inactive yeasts was carried out by a group of eight tasters from the Rovira i Virgili University. For each sample, tasters were required to evaluate the intensity of four sensory attributes on a scale of 1 to 10: sweetness, bitterness, mouthfeel, and structure/body. Mineral water was used as a reference control. A sensory training session was held beforehand so that the experts could agree upon criteria for each one of the different sensory attributes. Specifically, mouthfeel was considered as the unctuousness generated by the samples, whereas structure/body was considered, in the case of these macerated samples, as the overall sensation of concentration.

To facilitate sensory perception, lyophilized samples obtained from macerations of inactive yeast in model wine solution were dissolved in mineral water in a proportion that was five times greater than that recommended by the manufacturer. Samples were served randomly in dark glasses. Wines were tasted in a similar way, but five sensorial attributes were used: astringency, bitterness, structure/body, mouthfeel, and overall quality. Structure/body was also considered as the overall sensation of concentration even though tannins were the main component.

Statistical analysis. All data are expressed as the arithmetic average of three replicates. One-factor ANOVA tests was carried out with SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results and Discussion

No statistically significant differences were found among wines in ethanol content, titratable acidity, and pH, suggesting that the grapes used were homogeneous enough to make it possible to compare the different experimental treatments (Table 1). In addition, no differences were found in anthocyanin concentrations. In contrast, some slight but significant differences were found in color intensity, total phenolic index, and proanthocyanidin concentrations. In particular, the wines fermented with the high polysaccharide-releasing yeast strain (HPS) had higher color intensity, total phenolic index, and proanthocyanidin concentration than wines fermented with the control yeast strain (EC1118). These data suggest that the use of the HPS may produce wines with a higher proanthocyanidin concentration due to two possibilities: the first that the HPS favors proanthocyanin extraction during the maceration/fermentation process and the second that proanthocyanidin wall absorption of the HPS would be lower than that of the control yeast strain. This phenomenon, which has been previously described (Cuinier 1997), may also explain this experimental data. In this case, the greater color intensity could be caused by copigmentation, which is favored by the higher proanthocyanidin concentration (Boulton 2001) since there were no significant differences in anthocyanin concentration or pH.

On the other hand, supplementation with Optired and Noblesse did not cause any significant difference in any of these parameters. In contrast, supplementation with Booster Rouge gave wines with a significantly lower total phenolic index and proanthocyanidin concentration. A similar decrease in

Table 1 Standard chemical parameters, color intensity, and phenolic composition of wines after treatment with wine yeasts.

Parameter	EC1118 (control)	HPS	Optired	Booster Rouge	Noblesse
Ethanol (% v/v)	12.5 ± 0.2 a ^a	12.6 ± 0.2 a	12.3 ± 0.2 a	12.4 ± 0.1 a	12.3 ± 0.2 a
Titratable acidity ^b	6.5 ± 0.22 a	6.20 ± 0.25 a	6.60 ± 0.27 a	6.66 ± 0.22 a	6.45 ± 0.18 a
pH	3.45 ± 0.05 a	3.50 ± 0.03 a	3.46 ± 0.02 a	3.46 ± 0.04 a	3.50 ± 0.03 a
Color intensity	19.14 ± 0.18 a	19.79 ± 0.31 b	19.38 ± 0.15 ab	19.30 ± 0.27 ab	18.87 ± 0.36 a
Total phenolic index	57.8 ± 2.0 a	62.5 ± 1.9 b	55.9 ± 3.6 ac	52.3 ± 3.2 c	57.2 ± 1.5 a
Anthocyanidins (mg/L)	815 ± 24 a	851 ± 36 a	811 ± 79 a	770 ± 79 a	786 ± 45 a
Proanthocyanidins (g/L)	1.94 ± 0.10 ac	2.43 ± 0.23 b	2.02 ± 0.07 a	1.69 ± 0.18 c	1.87 ± 0.15 ac

^aAll data express the arithmetic average of three replicates with standard deviation. Different letters indicate statistically significant differences.

^bTitratable acidity expressed as g/L tartaric acid.

total phenolic index caused by the use of industrial man-proteins has been described (Ayestarán et al. 2004) and the phenomenon was attributed to the precipitation of the mannoprotein-proanthocyanidin complexes, which may explain why the astringency usually softens when these products are used.

Molecular exclusion chromatograms of wine obtained with the control yeast strain (EC1118) and the HPS are shown (Figure 1). Both wines presented similar profiles with four fractions of different molecular weights (MW). F1 corresponded to a MW between 144 and 1100 kDa, F2 between 40 and 144 kDa, F3 between 6 and 40 kDa, and F4 between 1 and 5 kDa. Two other fractions were also detected, but as their molecular weights were too low, they were not polysaccharides.

The chromatograms clearly confirm that the HPS yeast released higher amounts of polysaccharides than the control strain (Figure 1). The quantitative integration of the peaks of these chromatograms confirms this data (Table 2). Specifically, the polysaccharide concentration of the wines fermented with the HPS yeast was 32% higher than that of the wines fermented with the control strain. This increase was statistically significant in nearly all molecular weight fractions and was particularly high in the F4 fraction (1 to 5 kDa). These results are in agreement with those obtained by other authors. In particular, Gonzalez-Ramos et al. (2010) used exactly the same yeast strains and obtained an increase of 18% in the polysaccharide concentration of wines fermented with HPS compared to wines fermented with EC1118. More recently, Quirós et al. (2012) obtained an enrichment of more than 50% in the polysaccharide concentration of wines fermented

with an EC1118 recombinant yeast strain obtained by deleting both copies of *KNR4/SMI1* as described by Gonzalez-Ramos et al. (2008).

According to the bench tasting, the wines fermented with the HPS were considered to be somewhat less bitter than those fermented with the control EC1118 strain. The observed polysaccharide enrichment of wine might exert a positive effect on wine quality by smoothing this negative attribute.

The polysaccharide kinetic release from the various inactive yeasts during macerations in model wine solution is shown (Figure 2). Unlike grape juice, the synthetic solution used for maceration did not contain polysaccharides, so it could be ensured that all polysaccharides found in this experiment were from the inactive yeast. Overall, the three different inactive yeasts released similar amounts of total polysaccharides after 15 days of maceration. However, the release kinetics of Noblesse appeared to be slower than those of Optired and Booster Rouge (Figure 2A). Moreover, Optired and Booster Rouge released more high molecular weight polysaccharides than Noblesse (Figure 2B). In contrast, Noblesse seemed to release greater amounts of smaller molecules (Figure 2C).

The lyophilized samples obtained by maceration of the three inactive yeasts in a model wine solution were also subjected to bench tasting, which indicated that maceration of inactive yeasts increased the four sensory attributes with regard to mineral water used as control. These findings depended on the inactive yeast used. More specifically, Optired conferred mainly sensations of structure/body and mouthfeel but also had sweet and bitter sensations. Booster Rouge essentially conferred mouthfeel and Noblesse conferred sweetness and mouthfeel. Inactive yeasts may release polysaccharides and possibly other substances that exert some sensory influence. This hypothesis needs further testing.

Molecular exclusion chromatograms of control wines and of those obtained by supplementation with the three different inactive yeasts are shown in Figure 3. Supplementation with

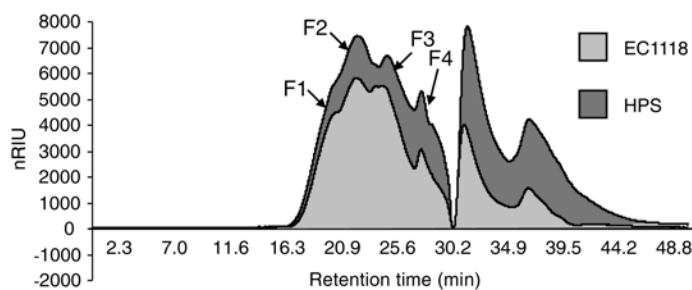


Figure 1 Molecular exclusion chromatogram of polysaccharides of wines fermented with two different yeast strains (F1: 144–1100 kDa; F2: 40–144 kDa; F3: 6–40 kDa; F4: 1–5 kDa).

Table 2 Influence of two yeast strains on the concentration of different wine polysaccharide fractions. Results are shown as absolute values (mg/L) as well as percentage (%) increase.

Polysaccharide	EC1118 (control)	HPS	Δ (%)
F1 (144–1100 kDa)	132 ± 6 a ^a	154 ± 14 a	16.6
F2 (40–144 kDa)	188 ± 5 a	239 ± 6 b	27.4
F3 (6–40 kDa)	258 ± 14 a	335 ± 28 b	29.8
F4 (1–5 kDa)	96 ± 11 a	162 ± 22 b	69.6
Total	674 ± 46 a	890 ± 25 b	32.1

^aAll data express the arithmetic average of three replicates with standard deviation. Different letters indicate statistically significant differences.

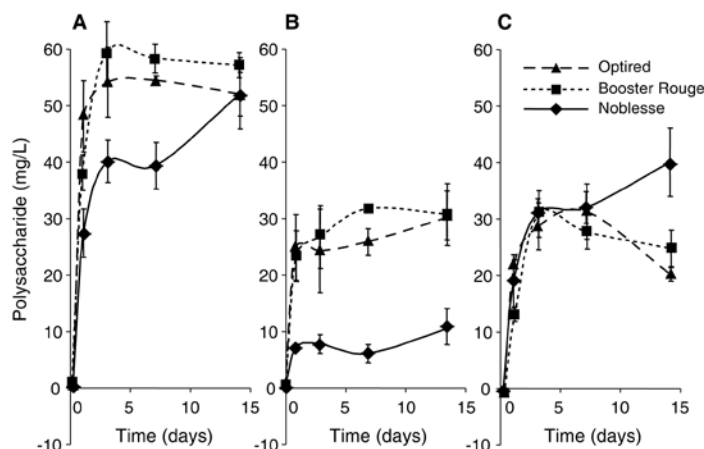


Figure 2 Polysaccharide kinetic release from inactive yeast during macerations in model wine solution. All data expressed the arithmetic average of three replicates with standard deviation. **A:** total polysaccharides; **B:** high molecular weight fraction (MW 10–1100 kDa); **C:** low molecular weight fraction (MW < 10 kDa).

the three inactive yeasts produced wines with higher concentrations of polysaccharides. Quantitative integration of the peaks of these chromatograms confirms this data (Table 3). Specifically, wines supplemented with Optired, Booster Rouge, and Noblesse had a total polysaccharide concentration 14.3, 19.8, and 11.0% higher than control wines, respectively. In all cases, the increase in total polysaccharide concentration was statistically significant. More specifically, supplementation with Optired significantly increased the fractions with highest molecular weights (F1, F2, and F3), whereas no significant increase was observed in the lowest fraction (F4). Supplementation with Booster Rouge led to significant increases in all fractions, while Noblesse only significantly increased the lower molecular weight fraction (F4).

Bench tasting seemed to indicate some slight differences among the wines. All inactive yeasts seemed to diminish bitterness and increase mouthfeel. In all cases, the overall quality of supplemented wines was considered to be higher than that of the control wines.

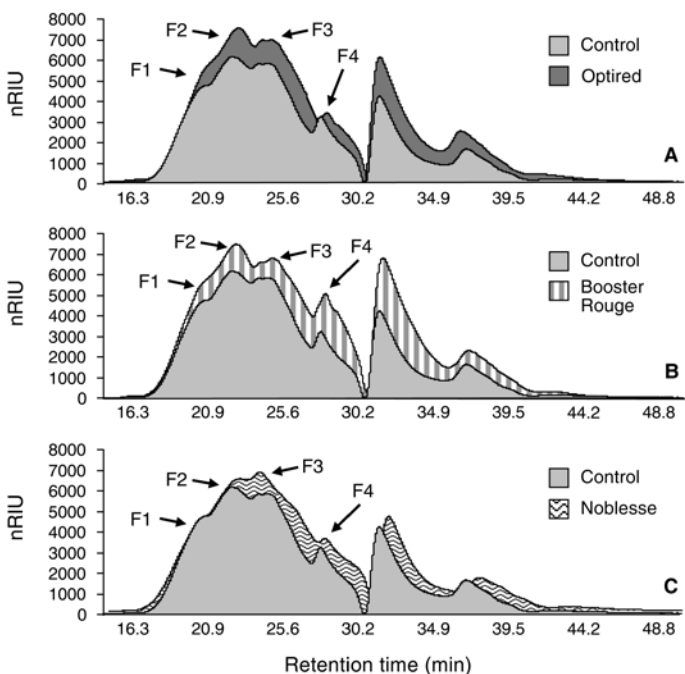


Figure 3 Molecular exclusion chromatogram of polysaccharides of wines supplemented with three different inactive yeasts (F1: 144–1100 kDa; F2: 40–144 kDa; F3: 6–40 kDa; F4: 1–5 kDa).

Conclusions

Results suggest that wine can be enriched in polysaccharides using a high polysaccharide-releasing yeast strain (HPS) and by supplementation with inactive yeasts. The use of the HPS yeast seems to exert a positive effect on wine quality inasmuch as the wine obtained was considered less bitter than the control wine. Therefore, both strategies can be used to improve wine quality (texture sensations), especially when grapes are not ripe enough. Additional studies are required to further characterize the chemical nature of the released compounds and their implications for the sensory composition of wine.

Literature Cited

Ayestarán, B., Z. Guadalupe, and D. Leon. 2004. Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal. Chim. Acta* 513:29-39.

Boulton, R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52:67-87.

Caridi, A. 2006. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *A. Van Leeuw. J. Microb.* 89:417-422.

Carpita, N.C., and D.M. Gibeaut. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3:1-30.

Carvalho, E., N. Mateus, B. Plet, I. Pianet, E. Dufourc, and V. De Freitas. 2006. Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* 54:8936-8944.

Chalier, P., B. Angot, D. Delteil, T. Doco, and Z. Gunata. 2007. Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem.* 100:22-30.

Cuinier, C. 1997. Ceppi di lievito e composizione fenolica dei vini rossi. *Vignevini* 7/8:39-42.

Del Barrio-Galán, R., S. Pérez-Magariño, and M. Ortega-Heras. 2011a. Techniques for improving or replacing ageing on lees of oak aged red wines: The effects on polysaccharides and the phenolic composition. *Food Chem.* 127:528-540.

Del Barrio-Galán, R., S. Pérez-Magariño, M. Ortega-Heras, P. Williams, and T. Doco. 2011b. Effect of aging on lees and of three different dry yeast derivative products on verdejo white wine composition and sensorial characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 59:12433-12442.

Del Barrio-Galán, R., S. Pérez-Magariño, M. Ortega-Heras, Z. Guadalupe, and B. Ayestarán. 2012. Polysaccharide characterization of commercial dry yeast preparations and their effect on white and red wine composition. *LWT-Food Sci. Technol.* 48:215-223.

Doco, T., J.M. Brillouet, and M. Moutounet. 1996. Evolution of grape (Carignan noir cv.) and yeast polysaccharides during fermentation and post-maceration. *Am. J. Enol. Vitic.* 47:108-110.

Table 3 Influence of supplementation with inactive yeasts on the concentration of different wine polysaccharide fractions. Results are shown as absolute values (mg/L) as well as percentage (%) increase.

Polysaccharides	EC1118 (control)	Optired	Δ (%)	Booster Rouge	Δ (%)	Noblesse	Δ (%)
F1 (144–1100 kDa)	133 ± 6 a ^a	149 ± 4 b	11.9	143 ± 4 b	7.5	132 ± 1 a	-0.1
F2 (40–144 kDa)	188 ± 5 a	254 ± 4 b	35.5	217 ± 3 c	15.6	201 ± 21 ac	6.9
F3 (6–40 kDa)	258 ± 14 a	298 ± 6 b	15.4	293 ± 23 b	13.7	283 ± 20 ab	9.5
F4 (1–5 kDa)	96 ± 11 a	96 ± 16 a	0.7	155 ± 27 b	61.5	133 ± 18 b	38.7
Total	674 ± 46 a	770 ± 12 b	14.3	807 ± 48 b	19.8	748 ± 22 b	11.0

^aAll data express the arithmetic average of three replicates with standard deviation. Different letters indicate statistically significant differences.

- Doco, T., P. Williams, M. Moutounet, and P. Pellerin. 2000. Revue internationale: Viticulture, oenologie, économie, droit. Bull. OIV 73:837-838.
- Dupin, I.V.S., B.M. McKinnon, C. Ryan, M. Boulay, A.J. Markides, G.P. Jones, P.J. Williams, and E.J. Waters. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: Their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. J. Agric. Food Chem. 48: 3098-3105.
- Fornairon-Bonnefond, C. Camarasa, M. Moutounet, and J.M. Salmon. 2002. New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: A bibliographical review. J. Int. Sci. Vigne Vin 36:49-69.
- Francioli, S., S. Buxaderas, and P. Pellerin. 1999. Influence of *Botrytis cinerea* on the polysaccharide composition of Xarel.lo musts and cava base wines. Am. J. Enol. Vitic. 50:456-460.
- Gerbaud, V., N. Gabas, J. Blouin, P. Pellerin, and M. Moutounet. 1997. Influence of wine polysaccharides and polyphenol on the crystallisation of potassium hydrogen tartrate. J. Int. Sci. Vigne Vin 31:65-83.
- Giovani, G., and I. Rosi. 2007. Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation. Int. J. Food Microbiol. 116:19-24.
- Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges. 1ère partie. Les équilibres des anthocyanes et des tannins. Conn. Vigne Vin 18:195-217.
- Gonzalez-Ramos, D., E. Cebollero, and R. Gonzalez. 2008. A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze. Appl. Env. Microbiol. 74:5533-5540.
- Gonzalez-Ramos, D., A. Muñoz, A. Ortiz-Julien, A. Palacios, J.M. Heras, and R. Gonzalez. 2010. A *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strain overproducing mannoproteins selected through classical genetic methods. J. Int. Sci. Vigne Vin 44:243-249.
- Guadalupe, Z., and B. Ayestarán. 2007. Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of Tempranillo red wines. J. Agric. Food Chem. 55:10720-10728.
- Guadalupe, Z., A. Palacios, and B. Ayestarán. 2007. Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. J. Agric. Food Chem. 55:4854-4862.
- Klis, F.M., P. Mol, K. Hellingwerf, and S. Brul. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. 26:239-256.
- Niketic-Aleksic, G.K., and G. Hrazdrina. 1972. Quantitative analysis of the anthocyanin content in grape juices and wine. Lebensm.-Wiss. Technol. 5:163-165.
- OIV. 2005. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Organisation International de la Vigne et du Vin, Paris.
- Pérez-Serradilla, J.A., and M.D. Luque de Castro. 2008. Role of lees in wine production: A review. Food Chem. 111:447-456.
- Pozo-Bayón, M.A., I. Andujar-Ortiz, J.M. Alcalde-Hidalgo, P.J. Martín-Alvarez, and M.V. Moreno-Arribas. 2009. Characterization of commercial inactive dry yeast preparations for enological use based on their ability to release soluble compounds and their behavior toward aroma compounds in model wines. J. Agric. Food Chem. 57:10784-10792.
- Quirós, M., R. Gonzalez, and P. Morales. 2012. A simple method for total quantification of mannoprotein content in real wine samples. Food Chem. 134:1205-1210.
- Ribéreau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean, and D. Dubourdieu. 1999. Handbook of Enology. Vol. 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Rodríguez-Bencomo, J.J., M. Ortega-Heras, and S. Pérez-Magarino. 2010. Effect of alternative techniques to ageing on lees and use of non-toasted oak chips in alcoholic fermentation on the aromatic composition of red wine. Eur. Food Res. Technol. 230:485-496.
- Sampaio, T.L., J.A. Kennedy, and M.C. Vasconcelos. 2007. Use of microscale fermentations in grape and wine research. Am. J. Enol. Vitic. 58:534-539.
- Sarneckis, C.J., R.G. Dambergs, P. Jones, M. Mercurio, M.J. Herd-erich, and P.A. Smith. 2006. Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: Development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. Aust. J. Grape Wine Res. 12:39-49.
- Vanrell, G., R. Canals, M. Esteruelas, F. Fort, J.M. Canals, and F. Zamora. 2007. Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (cava). Food Chem. 104:148-155.
- Vernhet, A., P. Pellerin, C. Prieur, J. Osmianski, and M. Moutounet. 1996. Charge properties of some grape and wine polysaccharide and polyphenolic fractions. Am. J. Enol. Vitic. 47:25-30.
- Vernhet, A., P. Pellerin, M.P. Belleville, J. Planque, and M. Moutounet. 1999. Relative impact of major wine polysaccharides on the performances of an organic microfiltration membrane. Am. J. Enol. Vitic. 50:51-56.
- Vidal, S., P. Williams, M.A. O'Neill, and P. Pellerin. 2001. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: Tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. Carbohydr. Polym. 45:315-323.
- Vidal, S., P. Williams, T. Doco, M. Moutounet, and P. Pellerin. 2003. The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization. Carbohydr. Polym. 54:439-447.
- Vidal, S., L. Francis, P. Williams, M. Kwiatkowski, R. Gawel, V. Cheyner, and E. Waters. 2004. The mouthfeel properties of polysaccharides and anthocyanins in wine like medium. Food Chem. 85:519-525.
- Villettaz, J.C., D. Steiner, and H. Trogus. 1984. The use of a beta glucanase as an enzyme in wine clarification and filtration. Am. J. Enol. Vitic. 35:253-256.
- Waters, E.J., P. Pellerin, and J.M. Brillouet. 1994. A wine arabinogalactan-protein that reduces heat-induced wine protein haze. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58:43-48.

Capítulo IV.Efecto de la suplementación con tres levaduras secas inactivas comerciales en la composición química y la astringencia de una solución modelo similar al vino y de un vino tinto.

Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, la suplementación con levaduras secas inactivas comporta ciertos beneficios en las características organolépticas del vino tinto, siendo principalmente el aporte de polisacáridos el responsable de muchos de sus beneficios.

En la bibliografía se ha descrito que el aumento de la concentración de polisacáridos en vino puede favorecer la disminución de la astringencia. Este hecho tiene una gran importancia cuando la uva presenta una madurez fenólica deficiente. Por lo general la uva inmadura aporta una gran cantidad de tanino de semilla y una menor proporción de tanino de piel. Dado que el tanino de las semillas está fuertemente galoilado, los vinos que se

obtienen suelen presentar una gran astringencia.

En este contexto, en el siguiente capítulo se aborda parte del objetivo 4, en el que se plantea evaluar el impacto de la suplementación con levaduras secas inactivas sobre la composición del vino tinto, centrándonos principalmente en el efecto sobre su composición en taninos y su astringencia.

Para ello, se realizaron maceraciones en una solución sintética similar al vino a la que se adicionó un tanino de semilla comercial que previamente se había caracterizado (medio simple). Paralelamente se realizó una experiencia similar con un vino tinto de tanicidad elevada (medio complejo).

Las analíticas de los vinos obtenidos fueron realizadas en el laboratorio del grupo *Tecnología Enológica* (TECNENOL). Los resultados del ensayo se han enviado para su publicación a la revista *Journal of the Science of Food and Agriculture* en el artículo titulado **“The effect of supplementation with three commercial inactive dry yeasts on the chemical composition and astringency of model wine solution and red wine”**

The effect of supplementation with three commercial inactive dry yeasts on the chemical composition and astringency of model wine solution and red wine

Elena González-Royo, Mireia Esteruelas, Nikolaos Kontoudakis, Francesca Fort, Joan Miquel Canals and Fernando Zamora

^a Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Grup de Recerca en Tecnologia Enològica (Tecnenol), Universitat Rovira i Virgili, Campus de Sescelades, c/Marcel·li Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain.

Abstract:

Nowadays the supplementation of red wines with commercial inactive dry yeasts is a widespread practice in winemaking leading to better balanced wines through increased mouthfeel and smooth astringency perception. The aim of this article is to study, in a red wine and in a model wine solution, how supplementation with three commercial inactive dry yeasts affects chemical composition and astringency. This will give us a better understanding of the action mechanism involved. The results obtained indicate that this action mechanism seems to be related to two different phenomena. The first is that inactive yeasts release polysaccharides and oligosaccharides which can increase mouthfeel and act to inhibit interactions between salivary protein and tannins, while the second involves the direct effect they have on the precipitation of proanthocyanidins, especially the larger polymers, which have been described as the most astringent. It can be concluded that supplementation with inactive yeasts is indeed a useful tool for smoothing the astringency of red wines.

Key words: inactive yeasts, red wine, polysaccharides, proanthocyanidins, astringency.

INTRODUCTION

The composition of phenolic compounds in red wine is one of the main determinants of its quality. Certain sensory attributes such as color, body and astringency are directly associated with the composition of anthocyanins and tannins.¹⁻⁴ Anthocyanins are

responsible for the color of red wine, while tannins participate in some of the major organoleptic properties of red wines, such as body, mouthfeel and, in particular, astringency and bitterness.⁵

Astringency is possibly one of the most important sensory attributes of red wines. It has been described as an oral sensation that causes the drying, roughening and puckering of the mouth epithelia, and a complete terminology has been developed to describe this complex sensation in red wines.⁶ It is caused by the capacity of certain phenolic compounds, especially tannins, to bind salivary proteins.^{7,8} Other mechanisms have also been described, including the influence of colloidal particles and the involvement of the laminin receptor.⁹

Two large families of compounds are included under the term “tannins”. The first of these is condensed tannins or proanthocyanidins, which are released from the solid parts of the grape during the maceration process that takes place during red winemaking. The second is hydrolysable tannins, which include gallotannins and ellagitannins.¹⁰ These are not present in grapes but can be present in wines because of the wine’s contact with wood during barrel ageing or because of the addition of commercial enological tannins.¹¹

Proanthocyanidins are present in the skins, seeds and stems.¹²⁻¹⁴ The nature of proanthocyanidins depends heavily on their origin. Seed proanthocyanidins are polymers composed of (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-3-gallate.¹⁵ Skin proanthocyanidins also contain (-)-epigallocatechin, while the proportion of (-)-epicatechin-3-gallate is much lower.¹⁶ In addition, seed proanthocyanidins have a lower degree of polymerization (mDP) than skin proanthocyanidins.¹⁷ Consequently skins have procyanidins and prodelfinidins with a higher mDP, whereas seeds only have procyanidins with a higher proportion of galloylation and a lower mDP.

It is widely acknowledged that high quality red wines have a balanced level of astringency. When there is excessive astringency, wines are considered aggressive and/or rough. In contrast, when there is too little astringency they may taste flat, insipid and uninteresting. Tannins and especially proanthocyanidins, as mentioned earlier, have been widely related to astringency perception.¹⁸ In this regard, several variables involving proanthocyanidin composition have been related to astringency, such as their total concentration, mDP¹⁹ and monomeric composition.^{3,20} Specifically, a rougher

sensation with increased ‘coarseness’, ‘drying’ and ‘chalkiness’ has been reported in correlation with a higher degree of proanthocyanidin galloylation.³ In contrast, the presence of (-)-epigallocatechin units in the proanthocyanidin tend to lower the perception of ‘coarseness’.³ Because seed proanthocyanidins have a higher proportion of (-)-epicatechin gallate and no (-)-epigallocatechin, they are generally accepted to be more astringent than skin proanthocyanidins.

Salivary protein-tannin interactions appear to be the main astringency mechanism in red wines.^{7,21} Polysaccharides could inhibit this interaction in red wines, as has previously been proposed for lowering astringency in ripening fruits.²² Several studies have been carried out showing that complex polysaccharides can disrupt protein-tannin interaction by different mechanisms, either inhibiting protein-tannin interactions^{23,24} or inhibiting the precipitation of protein-tannin complexes.^{25,26} Polysaccharides would thus limit the concentration of available proanthocyanidins because they can interact with tannins or proanthocyanidin aggregates to yield soluble complexes.²⁷ This same phenomenon would reduce wine astringency.

It has been reported that the most acidic fraction of arabinogalactan proteins have the ability to inhibit the formation of aggregates between the grape seed tannins and the two different salivary proteins.²⁸ More recently Quijada et al⁵ have shown that polysaccharides, especially mannoproteins and rhamnogalacturonan II, exert a clear opposition to astringency perception.

Yeast mannoproteins have been described for their positive influence on a number of technological and quality properties of red wines, such as inhibition of tartrate salt crystallization,²⁹ reduction of protein haze,³⁰ stimulation of malolactic fermentation³¹ and color stabilization.³² Recent studies have also reported that yeast mannoproteins can increase body and mouthfeel,³³ and also smooth the astringency of red wines.⁵

Given that mannoproteins seem to improve wine quality, enologists are interested in finding out how wines can become richer in these compounds. The most frequent strategy for increasing mannoprotein concentration involves ageing wine in contact with lees.^{33,35} This practice, however, entails certain risks such as the appearance of reductive characters and *Brettanomyces* taints.³⁶ For this reason the use of inactive dry yeasts as a source of mannoproteins has been introduced into the market during recent years

because in theory this practice can make wines richer in mannoproteins in a similar way to contact with lees but without any of the drawbacks.^{32,34,37,38}

A recent study³⁹ shows that ageing wines on lees and in particular adding commercial inactive dry yeasts to white wines increase mouthfeel and decrease the acidity and astringency perception of the wines after treatment. The study also shows that lees and yeast derivative products can interact with or absorb some of the phenolic compounds present in wines, reducing their concentration.

It has also been reported that supplementation with commercial inactive yeasts in grape juice during winemaking and also during oak ageing can significantly decrease the proanthocyanidin content of red wines, coinciding with a decrease in high molecular weight mannoproteins.³¹ This suggests that a precipitation of the coaggregates mannoprotein-tannin occurs during treatment. Del Barrio-Galán et al.³⁵ have observed in sensory analysis that some of these commercial products have the ability to reduce green tannins, thereby increasing softness on the palate.

In a previous study⁴⁰ we observed that wines supplemented with three commercial inactive dry yeasts had a significantly higher polysaccharide concentration (11% to 20%).

In the light of all this we may wonder what the mechanism is whereby supplementation with inactive dry yeasts reduces wine astringency. Polysaccharide enrichment may be one possibility and the precipitation of certain proanthocyanidins another. Hence the aim of this article is to study -in a red wine and also in a model wine solution - how supplementation with three commercial inactive dry yeasts affects the chemical composition of wine in order to better understand the action mechanism.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

All products were of high purity and suitable for high performance liquid chromatography (HPLC). Absolute ethanol, methanol, formic acid, tartaric acid, acetic acid, sodium hydroxide and hydrochloric acid were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Ammonium acetate, ammonium formate, acetaldehyde, phloroglucinol, ascorbic acid and sodium acetate were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Proanthocyanidinic tannin (Protan Pépin) was purchased from AEB Ibérica S.A. (Barcelona, Spain).

Malvidin-3-O-glucoside chloride, proanthocyanidin dimer B2, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin and (-)-epicatechin-3-O-gallate were purchased from Extrasynthès (Genay, France). Phloroglucinol, L-ascorbic, 4-methylcatechol and 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACH) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

The albumin from chicken egg was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). The external standard for quantifying astringency index was tannic acid purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

A pullulan calibration kit Shodex P-82 (P-5, Mw = 5.9 kDa; P-10, Mw = 11.8 kDa; P-20, Mw = 22.8 kDa; P-50, Mw = 47.5 kDa; P-100, Mw = 112 kDa; P-200, Mw = 212 kDa; P-400, Mw = 404 kDa; P-800, Mw = 788 kDa) was obtained from Waters (Barcelona, Spain), and a pullulan 1.3 kDa and four dextrans BioChemika (12, 25, 50, and 80 kDa) were obtained from Fluka (St. Louis, MO, USA). The polysaccharides used as external standards for quantification were pectins from citrus fruit ($\geq 90\%$) and dextrans synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* ($\geq 99.9\%$) purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

The protein used as an external standard for quantification was bovine serum albumin (BSA) purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

All solutions were previously filtered through 0.22 μm acetate cellulose filters (Millipore GSE).

Macerations with inactive dry yeasts.

Three commercial inactive yeasts were used: Optired[®], Booster Rouge[®] and Noblesse[®] (Lallemand Inc., Montreal, Canada). All macerations were carried out in the concentration recommended by the manufacturer (300 mg L⁻¹) in hermetic flasks containing 1.5 L of each of the maceration media for 15 days at room temperature (18 \pm 1 °C).

Maceration media.

Macerations were performed in two model wine solutions (A and B) and in a red wine. Solution A was composed of 13% (v/v) ethanol, 4 g L⁻¹ tartaric acid adjusted to pH 3.5 with sodium hydroxide in high purity water (Milli-Q) (Millipore Iberia, Madrid, Spain). Solution B was identical to Solution A but supplemented with 2g L⁻¹ of a commercial proanthocyanidin extracted from seeds (Protan Pépin, AEB). Solution A was used to reproduce the extraction from these products in hydroalcoholic solution, while solution B was used to reproduce the interactions with proanthocyanidins in a relatively simple matrix. Finally a red wine was also used as a maceration medium in order to reproduce the real process. A cabernet sauvignon from AOC Penedès was selected because it is rich in proanthocyanidins. The chemical characteristics of this red wine were: ethanol content: 14.5% (v/v); titratable acidity: 6 g L⁻¹ (expressed as tartaric acid); pH: 3.17; and total polyphenolic index (TPI): 60.0.

Standard wine analysis.

The analytical methods recommended by OIV (OIV 2014)⁴¹ were used to determine the standard parameters of the wine (ethanol content, titratable acidity and pH).

Color parameters and phenolic compound analysis.

Color intensity (CI) was estimated using the method described by Glories.⁴² The total phenolic index (TPI) was determined by measuring absorbance at 280 nm, expressed as absorbance units.⁴² The CIELAB coordinates, lightness (L*), chroma (C*), hue (h*), red-greenness (a*) and yellow-blueness (b*) were determined following the method suggested by Ayala et al.⁴³ and data processing was performed using MSCVsoftware.⁴⁴ The total color difference (ΔE_{ab}^*) between all samples was obtained using the expression $\Delta E_{ab}^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$. The astringency index was estimated using the method described by Llaudy et al.⁴⁵

HPLC anthocyanidin analysis.

Reversed-phase HPLC analyses of the anthocyanidins were carried out by injecting 40 μ L of wine into an Agilent 1200 Series liquid chromatograph (HPLC-DAD) and using an Agilent Zorbax Eclipse XDBC18, 4.6 \times 250 mm, 5 μ m column (Agilent Technologies). The solvents used were 10% aqueous formic acid (Solvent A) and a mixture of 45% methanol, 45% water and 10% formic acid (Solvent B) in accordance with the method described by Gil et al.⁴⁶ Chromatograms were recorded at 530 nm and

anthocyanin standard curves were made using malvidin-3-O-glucoside chloride. Compounds were identified by recording their UV spectra with the diode array detector and comparing these with the UV spectra reported in the literature. The five anthocyanidin-3-monoglucosides of wine (delphinidin, cyanidin, peonidin, petunidin and malvidin) and their respective acetylated and p-coumarylated anthocyanins were quantified.

Polysaccharide extraction from samples.

The samples were processed using the methodology described by Ayestarán, Guadalupe and Leon.⁴⁷ Briefly, 10mL of wine samples were centrifuged for 20 minutes at 8500 rpm in a Biofuge Primo (Heraeus, Hanau, Germany). The supernatant was concentrated to a final volume of 2 mL using a vacuum evaporator (Univap 100ECH, Uniequip, Martinsried, Germany). The total soluble polysaccharides were precipitated by the addition of 10 mL cold acidified ethanol (HCl 0.3M in absolute ethanol) and kept for 24 h at 4°C. The samples were then centrifuged (8500rpm, 15 min) and the supernatants discarded. Finally the precipitates were dissolved in 1 mL of ultra pure water, frozen to -20°C and freeze-dried using a lyophilizer (Christ Alpha 1-4, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany).

Determination of polysaccharides by HRSEC-RID.

In order to determine molecular distribution and quantify the polysaccharides obtained from the samples, the soluble fractions were analyzed by high-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC).⁴⁷ The lyophilized samples were resuspended in 1 mL of 50 mM ammonium formate, filtered through 0.22 µm acetate cellulose filters (Millipore GSE), and then 100µL was injected into the chromatographic system. The analyses were carried out in an HPLC Agilent 1200 Series system (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA) with a refractive index detector. Separation was carried out at 20°C using two different Shodex gel permeation HPLC columns (OHpak SB-803 HQ and SB-804 HQ, 300 mm x 8 mm I.D.; Showa Denko, Japan). The mobile phase consisted of an aqueous solution of 50 mM ammonium formate applied with a constant flow of 0.6 mL min⁻¹ for 60 min, and the temperature of cell RID was 35°C. The molecular weight distribution of the wine fractions was followed by calibration with pullulan and dextran standards of different molecular weights (see above). The polysaccharides were quantified according to the peak area for each fraction, using the external standard

method with pectin and dextran commercial standards. The calibration curve was obtained by the injection of standard solutions, under the same conditions as for the samples analyzed, in a range between 0 and 2 g L⁻¹.

Sample preparation for proanthocyanidins analysis following acid-catalysis with phloroglucinol.

The sample preparation for proanthocyanidins analysis was carried out in accordance with the method proposed by Kennedy and Jones.⁴⁸ Acid-catalysis cleavage in the presence of excess phloroglucinol was used to analyze the monomeric composition of proanthocyanidin and its mean degree of polymerization (mDP). Ten milliliters of wine were evaporated under a low-pressure vacuum (Univapo 100 ECH, Uni Equip, Martinsried, Germany). It was then resuspended in 6 mL of distilled water and afterwards applied to Set Pak Plus tC18 environmental cartridges (Waters, Milford, MA) that had been previously activated with 10 mL of methanol and 15 mL of water.

The sample was washed with 15 mL of distilled water and then the proanthocyanidins were eluted with 12 mL of methanol, immediately evaporated under vacuum, and then redissolved in 2 mL of methanol. Finally 100 µL of this sample was reacted with a 100 µL phloroglucinol solution (0.2 N HCl in methanol, containing 100 g L⁻¹ phloroglucinol and 20 g L⁻¹ ascorbic acid) at 50°C for 20 min. The reaction was stopped by adding 1000 µL of 40mM aqueous sodium acetate.

Determination of proanthocyanidins by HPLC-DAD.

Reversed-phase HPLC analysis (Agilent Series 1200 HPLC-DAD) was carried out in accordance with the method used by Kennedy and Jones.⁴⁸ The solvents used were 1% aqueous acetic acid (Solvent A) and methanol (Solvent B) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The elution conditions were 1.0 mL min⁻¹.

Elution was performed with a gradient starting at 5% B for 10 min, a linear gradient from 5% to 20% B in 20 min, and a linear gradient from 20% to 40% B in 25 min. The column was then washed with 90% B for 10 min and reequilibrated with 5% B for 5 min before the next injection. The monomers (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-3-O-gallate were identified by comparing their retention times with those of the pure compounds. The phloroglucinol adducts of (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin and (-)-epicatechin-3-O-gallate were identified by HPLC-TOF

analysis. The analyses were performed with the Agilent 1200 Series HPLC using an Agilent 6210 time-of-flight (TOF) mass spectrometer equipped with an electrospray ionization system (ESI). Elution was carried out under the same HPLC analysis conditions as those described by Kennedy and Jones.⁴⁸ The capillary voltage was 3.5 kV. Nitrogen was used both as a dry gas at a flow rate of 12 L min⁻¹ at 35°C and as a nebulizer gas at 60 psi. Spectra were recorded in positive ion mode between m/z 50 and 2400. This assay was also carried out without the addition of phloroglucinol to measure the quantity of monomers that make up the proanthocyanidins naturally present in the wines.

The number of terminal subunits was considered to be the difference between the total monomers measured in normal conditions (with phloroglucinol) and those obtained when the analysis was performed without phloroglucinol addition. The number of extension subunits was considered as the sum of all the phloroglucinol adduct. The mean degree of polymerization (mDP) was calculated by adding terminal and extension subunits (in moles) and dividing by the terminal subunits. The total proanthocyanidin concentration was considered as the sum of all terminal and extension subunits.

Sample preparation for protein analysis.

The sample preparation for protein analysis was carried out in accordance with the method used by Canals et al.⁴⁹

Aliquots of 15 mL of synthetic wines were centrifuged (10 min at 12,000g) in a Sorvall RC-5C (Heraeus, Hanau, Germany) and dialyzed in tubes of a molecular weight cut-off of 3500 Da (Membrane Filtration Products Inc., San Antonio, TX, USA). The dialyzed samples were lyophilized (Christ Alpha 1-4, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany) and preserved at -20°C until the time of analysis.

Determination of proteins by HRSEC-DAD.

In order to determine molecular distribution and quantify the proteins obtained from the samples, the soluble fractions were analyzed by high-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC).⁴⁹ The lyophilized samples were resuspended in 0.6 μL of 300 mM ammonium acetate and centrifuged at 12,000g for 5 min. The supernatant was filtered through 0.22 μm acetate cellulose filters (Millipore GSE) and then 100 μL of supernatant was injected into the chromatographic system. The analyses were carried

out in an HPLC Agilent 1200 Series system (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA) with a DAD detector monitored at 230, 280 and 320nm. Separation was carried out at 20°C using a Shodex gel permeation HPLC column (OHpak SB-803 HQ, 300 mm x 8 mm I.D.; Showa Denko, Japan). The mobile phase consisted of an aqueous solution of 300 mM ammonium acetate applied with a constant flow of 0.6 mL min⁻¹ for 70 min. The proteins were quantified according to the peak area for each fraction using the external standard method with BSA (see above) in a range between 0 and 10 mg mL⁻¹ ($r^2 > 0.99$).

Sensory analysis. All the sensory analyses were performed in the tasting room of the Faculty of Enology of Tarragona (University Rovira i Virgili), which was designed according to UNE-EN ISO 8589:2010.⁵⁰ All the wines were tasted by a group of eight expert enologists from the Rovira i Virgili University. Two training sessions in tasting were carried out previously to standardize criteria among the panelists. Dark glasses were used to prevent the panelists from being influenced by the color of the samples.⁵¹ Two trials were carried out: one for the synthetic wine and another for the red wine. Tasters had to score from 1 to 5 the intensity of the astringency of the different samples, which were served anonymously and in random order.

Statistical analysis. One-factor analysis of variance (ANOVA) was carried out using SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS AND DISCUSSION.

Table 1 shows the effects that the supplementation with three inactive yeasts had on the color, TPI and astringency index of synthetic wine B and a red wine. The results for synthetic wine A are not shown in the table since this medium did not contain any phenolic compound. The addition of Noblesse[®] and especially of Optired[®] and Booster Rouge[®] significantly reduced the color intensity of the synthetic wine. These modifications to the color were also reflected in the CIElab coordinates inasmuch as L* and H* were significantly increased, whereas with C* the red-greenness (a*) and the yellow-blueness (b*) components significantly decreased. TPI was also affected by the supplementation with the three inactive yeasts given that this index decreased significantly in all cases. Supplementation with Optired[®] also significantly reduced the astringency index, but no significant differences were found with the other inactive yeasts.

Table 1. Influence of supplementation of synthetic wine and red wine with inactive yeasts on color, total polyphenol index and astringency index.

	Parameter	Control	Optired®	Noblesse®	Booster Rouge®
Synthetic wine B	IC	4.9 ± 0.0 a	3.8 ± 0.1 b	4.1 ± 0.1 b	3.6 ± 0.2 b
	L*	92.9 ± 0.1 a	94.3 ± 0.4 b	94.1 ± 4.2 b	94.8 ± 0.3 b
	C*	25.6 ± 0.1 a	19.8 ± 0.3 b	21.5 ± 0.1 b	18.1 ± 0.2 b
	CIELAB H*	86.5 ± 0.4 a	87.3 ± 0.4 b	87.3 ± 0.3 b	88.2 ± 0.1 b
	a*	1.6 ± 0.2 a	1.0 ± 0.1 b	1.0 ± 0.1 b	0.6 ± 0.0 b
	b*	25.5 ± 0.0 a	19.7 ± 0.3 b	21.5 ± 0.1 b	18.3 ± 0.3 b
	IPT	20.7 ± 0.2 a	18.5 ± 0.4 b	18.8 ± 0.5 b	18.2 ± 0.2 b
Astringency Index	0.28 ± 0.01 a	0.24 ± 0.01 b	0.30 ± 0.01 a	0.26 ± 0.01 a	
Red Wine	IC	12.6 ± 0.1 a	12.3 ± 0.1 b	12.4 ± 0.0 b	12.2 ± 0.2 b
	L*	89.6 ± 0.5 a	89.7 ± 0.1 a	89.4 ± 0.0 a	89.8 ± 0.2 a
	C*	13.0 ± 0.0 a	13.5 ± 0.1 b	12.8 ± 0.1 b	13.3 ± 0.3 b
	CIELAB H*	356.9 ± 1.0 a	349.8 ± 0.2 b	356.8 ± 0.2 a	350.1 ± 0.2 b
	a*	13.0 ± 0.0 a	13.3 ± 0.1 b	12.8 ± 0.1 b	13.1 ± 0.3 a
	b*	-0.56 ± 0.0 a	-2.39 ± 0.1 b	-0.72 ± 0.0 b	-2.27 ± 0.1 b
	IPT	66.7 ± 0.3 a	65.5 ± 0.2 b	64.3 ± 0.4 b	64.0 ± 0.3 b
Astringency Index	0.47 ± 0.03 a	0.42 ± 0.02 b	0.45 ± 0.03 a	0.45 ± 0.02 a	

All data are the mean ± sd of three replicates. CI: Color Intensity; L*: Lightness; C*: Chroma; H*: Hue; a: the red–greenness; b: yellow–blueness; TPI: Total Polyphenol Index; Astringency index is expressed as g/L of tannic acid. Different Latin letters indicate significant statistical differences ($p < 0.05$) between the control and each of the supplemented yeast (a,b)

In general, the effects of the supplementation of the red wine with inactive yeasts showed a similar tendency as in the synthetic wine, although the differences in color were quite smaller. As was observed with the synthetic wine, TPI also diminished significantly in the red wine when inactive yeasts were added. Optired® also significantly reduced the astringency index, but this effect was not significant with the other inactive yeasts. Overall these data indicate that supplementation with inactive yeasts eliminates some of the phenolic compounds present in synthetic and red wine that have an effect on color and in some cases on astringency.

These results agree with those obtained by other authors which revealed the capacity of the yeast to retain or adsorb different wine phenolic compounds^{32,34,52} and to form mannoprotein–polyphenol colloidal complexes, which produce less astringency and a greater roundness and softness in the mouth.^{31,33,53-57}

To find out whether the observed differences in color were large enough to be distinguished by the human eye, the total color differences (ΔE_{ab}^*) were calculated (Table 2). It has been reported that the human eye can generally distinguish two colors when $\Delta E_{ab}^* \geq 1$. However, it is also generally accepted that tasters can only distinguish the color of two wines through the glass when $\Delta E_{ab}^* \geq 5$.⁵⁸ It seems, therefore, that the decrease in color generated by supplementation with inactive yeasts can be distinguished in the case of synthetic wines. In contrast, the decrease in the color of the red wine was significant but too small to be detected by consumers.

Table 2. Influence of supplementation of synthetic wine and red wine with inactive yeasts on total color differences (ΔE_{ab}^*)

Treatment	Control	Optired [®]	Noblesse [®]	Booster Rouge [®]
Control	-	6.0	4.2	7.7
Optired [®]	1.9	-	1.6	1.7
Noblesse [®]	0.4	1.8	-	3.5
Booster Rouge [®]	1.8	0.5	1.6	-

Average values for Total Color Differences (ΔE_{ab}^*). Shaded in grey: comparison between synthetic wines. Not shaded: comparison between red wines.

The effect of the supplementation of red wine with inactive yeasts on anthocyanins is shown in Table 3. In general no significant differences were detected in total anthocyanin concentrations, although some slight but significant decreases were observed in the total monoglucosides of the red wines treated with Noblesse[®] and the total acetylated anthocyanidins of the red wines treated with all the inactive yeasts. However, these differences were again very small and therefore consistent with the slight differences observed in the wine color.

Table 3. Influence of supplementation of red wine with inactive yeasts on anthocyanins

Anthocyanins (mg/L)	Control	Optired®	Noblesse®	Booster Rouge®
delphinidin-3-glucoside	30.5 ± 0.1 a	30.5 ± 2.5 a	29.8 ± 0.3 b	30.6 ± 0.9 a
cyanidin-3-glucoside	10.6 ± 0.0 a	10.4 ± 0.1 a	10.5 ± 0.3 a	10.6 ± 0.1 a
petunidin-3-glucoside	25.4 ± 0.0 a	25.1 ± 0.4 a	24.3 ± 0.1 a	24.7 ± 0.5 a
peonidin-3-glucoside	22.9 ± 0.1 a	23.9 ± 0.1 b	21.9 ± 0.9 b	23.5 ± 0.3 b
Malvidin-3- glucoside	72.4 ± 0.1 a	72.5 ± 0.4 a	70.3 ± 0.7 b	71.4 ± 0.8 a
Total monoglucosides	161.8 ± 0.2 a	162.5 ± 1.9 a	156.8 ± 1.1 b	160.7 ± 2.0 a
Delphinidin -3-(6"-acetyl)glucoside	13.0 ± 0.7 a	13.5 ± 0.1 a	13.5 ± 0.1 a	13.5 ± 0.1 a
Cyanidin -3-(6"-acetyl)glucoside	8.7 ± 0.2 a	8.6 ± 0.0 a	8.8 ± 0.1 a	8.6 ± 0.0 a
petunidin- 3 -(6"-acetyl)glucoside	9.0 ± 1.1 a	7.7 ± 0.2 a	7.6 ± 0.0 b	7.7 ± 0.0 b
peonidin- 3 -(6"-acetyl)glucoside	9.0 ± 0.4 a	9.8 ± 0.0 b	9.6 ± 0.1 b	9.7 ± 0.1 b
Malvidin- 3 -(6"-acetyl)glucoside	14.8 ± 5.4 a	8.6 ± 0.0 b	8.4 ± 0.1 b	8.6 ± 0.0 b
Total acetylated	57.8 ± 0.6 a	48.1 ± 0.2 b	47.9 ± 0.2 b	48.1 ± 0.1 b
cianidin-3-(trans-p-coumaroyl)glucoside	6.3 ± 0.0 a	6.7 ± 0.0 b	6.6 ± 0.2 b	6.8 ± 0.1 b
petunidin-3-(trans-p-coumaroyl)glucoside	6.9 ± 0.0 a	7.0 ± 0.1 a	7.0 ± 0.0 a	7.0 ± 0.0 a
peonidin-3-(trans-p-coumaroyl)glucoside	7.2 ± 0.2 a	7.3 ± 0.2 a	7.4 ± 0.1 a	7.4 ± 0.1 a
malvidin-3-(cis-p-coumaroyl) glucoside	9.4 ± 0.1 a	9.3 ± 0.2 a	9.0 ± 0.1 a	9.1 ± 0.1 a
Total coumarylated	29.7 ± 0.3 a	30.3 ± 0.1 a	30.0 ± 0.1 a	30.3 ± 0.0 a
Total anthocyanins	249.3 ± 1.1 a	240.9 ± 2.2 a	234.7 ± 1.4 a	239.1 ± 2.1 a

All data are the mean ± sd of three replicates. Different Latin letters indicate significant statistical differences ($p < 0.05$) between the control and each of the supplemented yeast (a,b)

Table 4. Influence of supplementation of red wine with three inactive yeasts on the polysaccharides and oligosaccharides concentration.

Parameter (mg L ⁻¹)	Control	Optired®	Noblesse®	Booster Rouge®
HMw > 144 kDa	145 ± 13 a	131 ± 1 a	163 ± 14 a	149 ± 13 a
IMw: 40-144 kDa	212 ± 2 a	246 ± 15 b	177 ± 6 b	231 ± 3 b
LMw: 5-40 kDa	218 ± 27 a	259 ± 11 b	139 ± 22 b	230 ± 13 a
Total polysaccharides	575 ± 29 a	636 ± 27 b	480 ± 14 b	610 ± 30 a
Total oligosaccharides	340 ± 93 a	370 ± 3 a	321 ± 31 a	230 ± 14 b

All data are the mean ± sd of three replicates. HM_w: High Molecular weight. IM_w: Intermediate; Molecular weight; LM_w: Low molecular weight; Total polysaccharides: = M_w > 5 kDa; Total oligosaccharides = 5 kDa < M_w < 10 kDa. Different Latin letters indicate significant statistical differences ($p < 0.05$) between the control and each of the supplemented yeast (a,b)

Table 4 shows the influence of the supplementation with inactive yeasts on the red wine polysaccharide concentration. The results did not show a clear trend since the total polysaccharide concentration significantly increased in the case of Optired[®], remained at a similar level in the case of Booster Rouge[®] and decreased in the case of Noblesse[®]. The increase in polysaccharide concentration detected in wines supplemented with Optired[®] was due to the intermediate molecular weight fraction (IMw: 40-144 kDa) and the low molecular weight fraction (LMw 5-40 kDa). Supplementation with Booster Rouge[®] only significantly increased the IMw fraction, while supplementation with Noblesse[®] significantly decreased the IMw and LMw fractions. Supplementation with Optired[®] and Noblesse[®] did not affect the oligosaccharides (< 5 kDa) concentration whereas Booster Rouge[®] significantly reduced them. Some previous works have reported that inactive yeasts increase the polysaccharide concentration in red wine.^{31,35,55} However, Guadalupe et al⁵⁵ observed that the original increase sometimes disappeared after oak ageing, coinciding with a substantial reduction in proanthocyanidin content. Some authors suggest that a precipitation of coaggregates mannoprotein-tannin was responsible, and this seems to be confirmed by our results. The observed decrease in the TPI of synthetic wines and red wines supplemented with inactive yeasts suggests that interactions between phenolic compounds and polysaccharides may produce the precipitation of certain aggregates.

Table 5. Influence of supplementation of synthetic wines with three inactive yeasts on the polysaccharides and oligosaccharides concentration.

Polysaccharides (mg/L)	Solution	Control	Optired [®]	Noblesse [®]	Booster Rouge [®]
Total polysaccharides	Synthetic Wine A (without tannin)	0 ± 0 aα	15 ± 1 bα	3 ± 1 bα	17 ± 0 bα
	Synthetic Wine B (with tannin)	0 ± 0 aα	8 ± 1 bβ	1 ± 0 bβ	11 ± 3 bβ
Total oligosaccharides	Synthetic Wine A (without tannin)	0 ± 0 aα	17 ± 4 bα	28 ± 1 bα	30 ± 7 bα
	Synthetic Wine B (with tannin)	0 ± 0 aα	0 ± 0 aβ	7 ± 2 bβ	9,7 ± 2 bβ

All data are the mean ± sd of three replicates. Total polysaccharides = M_w>10 kDa total oligosaccharides = 10 kDa < M_w>0 kDa. Different Latin letters indicate significant statistical differences (p<0.05) between the control and each of the supplemented yeast (a,b). Different Greek letters indicate significant differences (p<0.05) between the two synthetic wines for each of the treatments inactive dry yeast. (α, β).

Table 5 shows the effects of the supplementation with inactive yeasts on synthetic wine A (without seed proanthocyanidins) and synthetic wine B (with seed proanthocyanidins). All the inactive yeasts released polysaccharides and oligosaccharides in both conditions, but the concentrations were always significantly higher when no tannin was present. Consequently this data confirms that certain polysaccharides and oligosaccharides released by inactive yeasts precipitate in the presence of seed proanthocyanidins. All the inactive yeasts also released proteins (Table 6), although the concentrations were much lower than those of polysaccharides and therefore their role should be considered negligible. The presence of seed proanthocyanidins completely eliminated all proteins in the case of Noblesse[®] and Booster Rouge[®], but not in the case of Optired[®].

Table 6. Influence of supplementation of synthetic wines with three inactive yeasts on the protein concentration.

Total proteins (Mw<80kDa)	Control	Optired [®]	Noblesse [®]	Booster Rouge [®]
Synthetic wine A (without tannin) (mg L ⁻¹)	0.0 ± 0.0 αα	2.6 ± 0.9 βα	1.2 ± 0.3 βα	2.5 ± 0.1 b
Synthetic wine B (with tannin) (mg L ⁻¹)	0.0 ± 0.0 αα	2.5 ± 0.6 βα	0.0 ± 0.0 aβ	0.0 ± 0.0 aβ

All data are the mean ± sd of three replicates. Different Latin letters indicate significant statistical differences (p<0.05) between the control and each of the supplemented yeast (a,b). Different Greek letters indicate significant differences (p<0.05) between the two synthetic wines for each of the treatments inactive dry yeast. (α, β).

Table 7 shows the effects of supplementation with inactive yeasts on the proanthocyanidins of synthetic wine and red wine. In the control of synthetic wine the most abundant monomer was (-)-epicatechin (EP) followed by (+) catechin (C). The control of synthetic wine also had a high proportion of (-)-epicatechin gallate (ECG) and very small proportion of (-)-epigallocatechin (EGC). This is quite logical given that this synthetic wine contains only seed proanthocyanidins which, according to the

literature¹⁵, are highly galloylated and have no EGC. The small proportion of EGC detected may be due to the presence of skin remnants in the raw material used for proanthocyanidin purification. In the red wine the major monomer was also EP followed by C, but the proportion of EGC was considerably higher and the proportion of ECG considerably lower than in the synthetic wine. This data is also quite logical since red wine, in addition to seed proanthocyanidins, also has skin proanthocyanidins which have a lower proportion of EGC and a higher proportion of EGC than seed proanthocyanidins.¹⁶

Table 7. Influence of supplementation with inactive yeasts on proanthocyanidins

Medium	Proanthocyanidins	Control	Optired®	Noblesse®	Booster Rouge®
Synthetic wine	PA (mg/L)	1201 ± 82 a	915 ± 59 b	980 ± 69 b	1029 ± 44 b
	mDP	5.9 ± 0.1 a	5.3 ± 0.2 b	5.4 ± 0.1 b	5.9 ± 0.4 a
	%C	20.1 ± 0.1 a	9.9 ± 0.2 b	10.7 ± 0.8 b	20.5 ± 2.0 a
	%EC	69.9 ± 0.6 a	78.7 ± 0.2 b	76.6 ± 0.5 b	67.6 ± 1.5 a
	%ECg	9.5 ± 0.6 a	11.4 ± 0.0 b	10.9 ± 0.4 b	9.6 ± 0.2 a
	%EGC	0.5 ± 0.0 a	1.0 ± 0.2 b	1.8 ± 0.0 b	2.2 ± 0.4 b
	mMMW	305 ± 1 a	308 ± 0.0 b	307 ± 1 b	305 ± 0.4 a
	mPAMW	1810 ± 27 a	1623 ± 42 b	1659 ± 37 b	1790 ± 79 a
	PA (mmol/L)	0.66 ± 0.04 a	0.56 ± 0.05 b	0.59 ± 0.03 b	0.58 ± 0.04 b
	mDP-EPA	-	9.8 ± 0.3 b	10.3 ± 0.3 b	6.4 ± 0.3 b
Red wines	PA (mg/L)	1275 ± 66 a	1015 ± 3 b	1135 ± 85 a	1015 ± 67 b
	mDP	6.0 ± 0.1 a	5.3 ± 0.1 b	5.6 ± 0.1 b	5.3 ± 0.1 b
	%C	10.7 ± 0.4 a	12.4 ± 0.1 b	12.2 ± 0.3 b	12.6 ± 0.5 b
	%EC	65.7 ± 0.3 a	65.1 ± 0.2 a	62.9 ± 2.5 a	63.4 ± 3.4 a
	%EGC	3.3 ± 0.4 a	3.5 ± 0 a	3.9 ± 0.3 a	3.7 ± 0.3 a
	%ECG	20.3 ± 0.6 a	19.0 ± 0.2 b	21.1 ± 2.1 a	20.4 ± 3.2 a
	mMMW	298.6 ± 0.5 a	298.6 ± 0.0 a	299.5 ± 0.9 a	299.1 ± 1 a
	mPAMW	1803 ± 37 a	1577 ± 31 b	1665 ± 20 b	1578 ± 37 b
	PA (mmol/L)	0.71 ± 0.02 a	0.64 ± 0.01 b	0.67 ± 0.01 b	0.64 ± 0.05 b
	mDP-EPA	-	14.2 ± 0.3 b	20.7 ± 1.3 b	14.1 ± 0.4 b

All data are the mean ± sd of three replicates. PA: Total proanthocyanidins; mDP: mean degree of polymerization; % C: percentage of (+) catechin; %EP: percentage of (-)-epicatechin; % EGC: percentage of (-)-epigallocatechin; %ECG: percentage of (-)-epicatechin gallate. ,mMMW: mean monomeric molecular weight of proanthocyanidins; mPAMW; Mean molecular weight of proanthocyanidins; PA: proanthocyanidin concentration; mDP-PAE: Mean degree of polymerization of eliminated proanthocyanidin. Different Latin letters indicate significant statistical differences (p<0.05) between the control and each of the supplemented yeast (a,b). Only mDP-PAE was compared with mDP control for statistical analysis.

In the synthetic wine, the addition of the three inactive yeasts significantly decreased the total proanthocyanidin concentration. This trend was also observed in the red wine with the exception of Noblesse[®], in which no differences were found. The mean degree of polymerization of proanthocyanidins (mDP) decreased significantly when the synthetic wine and the red wine were treated with all the inactive yeasts, the exception being Booster Rouge[®] in synthetic wine. This tendency seems to indicate that the use of inactive yeasts brings about a loss of proanthocyanidins of high molecular weight.

Some differences were found in the monomeric composition of proanthocyanidins in the synthetic wine and in the red wine treated with the three inactive dry yeasts. However, these small differences show no clear trend. Specifically, in the synthetic wine containing only seed proanthocyanidins, Optired[®] and Noblesse[®] decreased the proportion of (+)-catechin and increased the proportion of (-)-epicatechin, which suggests that polymers containing higher proportions of (+)-catechin were preferentially eliminated by supplementation with these inactive yeasts. However, this trend was not observed in the red wine since a small but significant increase in the proportion of (+)-catechin was observed. As regards the other two monomers, EGC and ECG, only small differences were found. These slight differences showed no clear trend, making it very difficult to draw conclusions.

A basic mathematical approach using a simple equation was performed to better understand what was happening. The mean monomeric molecular weight of proanthocyanidins (mMMW) was calculated taking into account the molecular weight of each of the monomers and their corresponding percentages. The mean molecular weight of proanthocyanidins (mPAMW) was calculated as the product of the mMMW and the mDP. The proanthocyanidin concentration (PA) expressed in mmol L⁻¹ was calculated as the quotient between the PA expressed in mg L⁻¹ and the mPAMW. Finally, the mDP of the proanthocyanidins eliminated by the supplementation with inactive yeasts was calculated following the equation shown in Figure 1.

Figure 1. Equation for calculating the mean degree of polymerization of eliminated proanthocyanidin

$$\text{mDP-PAE} = \frac{\text{PAC} \times \text{mDP-PAC} - \text{PAT} \times \text{mDP-PAT}}{\text{PAC} - \text{PAT}}$$

PAC: Proanthocyanidin concentration of control (expressed as mmol/L)

PAT: Proanthocyanidin concentration of treatment (expressed as mmol/L)

mDP-PAE: Mean degree of polymerization of eliminated proanthocyanidin

mDP-PAC: Mean degree of polymerization of proanthocyanidin of control

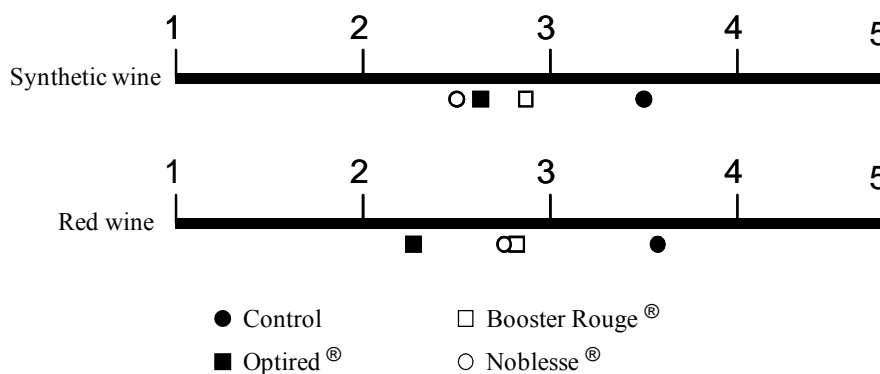
mDP-PAT: Mean degree of polymerization of proanthocyanidin of treatment

Overall these calculated values allow a better understanding of how inactive yeasts act in red wines. In the synthetic wine containing only seed proanthocyanidins and in the red wine containing seed and skin proanthocyanidins, all the inactive yeasts significantly decreased the molar concentration of proanthocyanidins, confirming that inactive yeast really does eliminate proanthocyanidins. As mentioned earlier, the mDP of the proanthocyanidins tends to decrease when inactive yeasts are used, suggesting that large proanthocyanidin molecules are preferentially eliminated by these enological additives. In general the data obtained by applying the equation in Figure 1 confirms this fact. Hence the mDP of the eliminated proanthocyanidins (mDP-EPA) was higher than the original mDP in the synthetic wine, although in the case of Booster Rouge[®] the differences were very small. In the red wine, the mDP-EPA was even higher than in the synthetic wine for all the inactive yeasts, thereby confirming that all the inactive yeasts preferentially eliminated proanthocyanidins of high polymerization. This is interesting because it is known that the astringency of proanthocyanidins is greater when the polymer is larger.¹⁹ It seems, therefore, that inactive yeasts can smooth wine astringency because they mainly eliminate proanthocyanidins with a high mDP, and it is these that are the most astringent.

Two hedonic scale sensory evaluations were performed to compare the intensity of the astringency of both controls (synthetic wine B and the red wine) with that of the corresponding wines treated with the different inactive yeasts. Since the standard deviations obtained in sensory trials were relatively high, no significant differences could be detected. Unfortunately this is a common problem because the sensation of astringency is a highly dynamic process and is continually changing during ingestion and especially after swallowing and expectorating.⁵⁹ In addition, the perception of astringency varies greatly between individuals^{60,61} and increases with repeated intake,

especially if the time between intakes is shortened.^{59,62} All this makes the objective assessment of astringency rather complicated even when the panelists are well trained.

Figure 2. Increasing order of astringency appreciation



Each point corresponds to the arithmetic mean of the scoring of the 8 tasters for each sample

Despite the lack of significance, a clear trend was observed between the controls and the corresponding samples treated with the different inactive yeasts. When the means of the intensities of astringency of the different samples are represented on a scale of 1 to 5 (Figure 2), both controls - synthetic wine and red wine - are located at higher values than their counterparts treated with all the inactive yeasts. A total of 6 out of 8 tasters considered that the synthetic wines and also the red wines treated with Optired[®] and Noblesse[®] were less astringent than their corresponding controls (Table 8). In the case of Booster Rouge[®], only 4 tasters considered that the treated synthetic wine was less astringent than its corresponding control, whereas 5 tasters thought the same about the treated red wine. Therefore it seems that, at least in the case of Optired[®] and Noblesse[®], supplementation can be useful for smoothing wine astringency.

Table 8. Number of tasters who consider that the treated sample is less astringent than the control sample

Media	Optired [®]	Noblesse [®]	Booster Rouge [®]
Synthetic wine B	6/8	6/8	4/8
Red wine	6/8	6/8	5/8

It can be concluded that supplementation with inactive yeasts really is a useful tool for smoothing the astringency of red wines. The action mechanism seems to be related to two different phenomena, one being that the inactive yeasts release polysaccharides and

oligosaccharides which can act to inhibit interactions between salivary protein and tannins, and the other being that they have a direct effect on the precipitation of proanthocyanidins, especially the larger polymers which have been described as the most astringent.

Acknowledgments: The authors are grateful to Lallemand Inc. for its financial support.

REFERENCES

1. Arnold RA and Noble AC, Bitterness and astringency of grape seed phenolics in a model wine solution. *Am J Enol Vitic* **29**: 150–152(1978).
2. Gawel R, Red wine astringency: a review. *Aust J Grape Wine Res* **4**: 74–95 (1998).
3. Vidal S, Francis L, Guyot S, Marnet N, Kwiatkowski M, Gawel R, Cheynier V and Waters EJ, The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J Sci Food Agric* **83**: 564–573 (2003).
4. He F, Liang N-N, Mu L, Pan Q-H, Wang J, Reeves MJ and Duan C-Q, Anthocyanins and their variation in red wines: I. monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules* **17**: 1571–1601 (2012).
5. Quijada-Morín N, Williams P, Rivas-Gonzalo JC, Doco T and Escribano-Bailón MT, Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chem* **154**: 44–51(2014).
6. Gawel R, Oberholster A and Francis IL, A “mouth-feel wheel”: terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine. *Aust J Grape Wine Res* **6**: 203–207(2000).
7. Luck G, Liao H, Murray NJ, Grimmer HR, Warminski EE, Williamson MP, Lilley TH and Haslam E, Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry* **37**: 357–371 (1994).

8. de Freitas V and Mateus N, Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J Agric Food Chem* **49**: 940–945 (2001).
9. Schwarz B and Hofmann T, Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *Eur Food Res Techno* **227**: 1693–1698 (2008).
10. Santos-Buelga C and de Freitas V, Influence of phenolics on wine organoleptic properties in *Wine chemistry and biochemistry*, ed. by Moreno-Arribas MB and Polo CM, New York, pp. 554-555 (2009)
11. Clifford MN and Scalbert A, Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. **80**: 1118–1125 (2000).
12. Lea AGH, Bridle P, Timberlake CF and Singleton VL, The procyanidins of white grapes and wines. *Am J Enol Vitic.* **30**: 289–300 (1979).
13. de Freitas V and Glories Y. Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white vitis vinífera varieties. *J Sci Food Agric* **79**: 1601–1606 (1999).
14. Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A and Dubordieu D, The chemistry of wine stabilization and treatments in *Handbook of Enology* ed. by Ribéreau-Gayon and Glories, Chichester, pp. 232–234 (2000).
15. Santos J, Sousa MJ, Cardoso H, Inácio J, Silva S, Spencer-Martins I and Leão, C, Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiol* **154**: 422–430 (2008).
16. Souquet JM, Cheynier V, Brossaud F and Moutounet M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* **43**: 509–512 (1996).

17. Cheynier V, Prieur C, Guyot S, Rigaud J and Moutounet M. The structures of tannins in grapes and wines and their interaction with proteins in *Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits*, ed. by Watkins TR , Washington DC , pp. 81-93 (1997).
18. Kennedy JA, Ferrier J, Harbertson JF and des Gachons CP, Analysis of tannins in red wine using multiple methods: correlation with perceived astringency. *Am J Enol Vitic* **57**: 481–485 (2006).
19. Preys S, Mazerolles G, Courcoux P, Samson A, Fischer U, Hanafi M, Bertrand D and Cheynier V, Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Anal Chim Acta* **563**: 126–136 (2006).
20. Quijada-Morín N, Regueiro J, Simal-Gándara J, Tomás E, Rivas-Gonzalo JC and Escribano-Bailón MT, Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *J Agric Food Chem***60**: 12355–12361 (2012).
21. De Freitas V, Mateus N, Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins. *J Agric Food Chem***49**: 940–945 (2001).
22. Ozawa T, Lilley TH and Haslam E, Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry* **26**:2937–2942 (1987).
23. Carvalho E, Mateus N, Plet B, Pianet I, Dufourc E and De Freitas V. Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *J Agric Food Chem* **54**: 8936–8944 (2006).
24. Escot S, Feuillat M, Dulau L and Charpentier C. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Aust J Grape Wine Res* **7**: 153–159 (2001).
25. de Freitas V, Carvalho E and Mateus N. Study of carbohydrate influence on protein–tannin aggregation by nephelometry. *Food Chem* **81**: 503–509 (2003).

26. Mateus N, Carvalho E, Luís C and de Freitas V. Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein–tannin aggregates. *Anal Chim Acta* **513**: 135–140 (2004).
27. Riou V, Vernhet A, Doco T and Moutounet M, Aggregation of grape seed tannins in model wine—effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocoll* **16**: 17–23 (2002).
28. Carvalho E, Mateus N, Plet B, Planet I, Dufourc E and de Freitas V. Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *J Agric Food Chem* **54**: 8936–8944 (2006).
29. Waters EJ, Pellerin P and Brillouet J-M, A saccharomyces mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydr Polym* **23**: 185–191(1994).
30. Guilloux-Benatier M, Guerreau J and Feuillat M, Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms. *Am J Enol Vitic* **46**: 486–492 (1995).
31. Guadalupe Z and Ayestarán B, Effect of commercial mannoprotein addition on polysaccharide, polyphenolic, and color composition in red wines. *J Agric Food Chem* **56**: 9022–9029 (2008).
32. Guadalupe Z, Palacios A and Ayestarán B, Maceration enzymes and mannoproteins: a possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *J Agric Food Chem* **55**: 4854–4862 (2007).
33. Fornairon-Bonnefond C, Camarasa C, Moutounet M and J.M. Salmón, New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: A bibliographical review. *J Int Vigne et du Vin* **36**: 49–69 (2002).
34. Del Barrio-Galán R, Pérez-Magariño S, Ortega-Heras M, Williams P and Doco T, Effect of aging on lees and of three different dry yeast derivative products on

- verdejo white wine composition and sensorial characteristics. *J Agric Food Chem* **59**: 12433–12442 (2011).
35. Del Barrio-Galán R, Pérez-Magariño S, Ortega-Heras M, Guadalupe Z and Ayestarán B, Polysaccharide characterization of commercial dry yeast preparations and their effect on white and red wine composition, *LWT - Food Sci. Technol* **48**: 215–223 (2012).
36. Pérez-Serradilla JA and de Castro MDL, Role of lees in wine production: A Review. *Food Chem* **111**: 447–456 (2008).
37. Pozo-Bayón MÁ, Andujar-Ortiz I, Alcaide- Hidalgo JM, Martín-Álvarez PJ and Moreno-Arribas MV, Characterization of commercial inactive dry yeast preparations for enological use based on their ability to release soluble compounds and their behavior toward aroma compounds in model wines. *J Agric Food Chem* **57**: 10784–10792 (2009).
38. Rodríguez-Bencomo J, Ortega-Heras M and Pérez-Magariño S, Effect of alternative techniques to ageing on lees and use of non-toasted oak chips in alcoholic fermentation on the aromatic composition of red wine. *Eur Food Res Technol* **230**: 485–496 (2010).
39. Del Barrio-Galán R, Pérez-Magariño S and Ortega-Heras M, Techniques for improving or replacing ageing on lees of oak aged red wines: the effects on polysaccharides and the phenolic composition. *Food Chem* **127**: 528–540 (2011).
40. González-Royo E, Urtasun A, Gil M, Kontoudakis N, Esteruelas M, Fort F, Canals JM and Zamora F, Effect of yeast strain and supplementation with inactive yeast during alcoholic fermentation on wine polysaccharides. *Am J Enol Vitic* **64**: 268–273 (2013).
41. Methods of analysis of wines and must in *Compendium of international methods of wine and must analysis* ed. by the Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, Paris, France, v 2, Sect I, IV (2014).

<http://www.oiv.int/oiv/info/enmethodesinternationalesvin>

42. Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A and Dubordieu D, The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments in *Phenolic Compounds Handbook of Enology*, eds. by Wiley, Chichester, UK, pp 141–203 (2006).
43. Ayala F, Echávarri JF and Negueruela AI, A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rosé wines. *Am J Enol Vitic* **48**: 357–363 (1997).
44. Ayala F, Echávarri JF and Negueruela, AI MSCVes.zip. URL <http://www.unizar.es/negueruela/MSCV.es>,[2001].
45. Llaudy MC, Canals R, Canals J-M, Rozés N, Arola L and Zamora F, New method for evaluating astringency in red wine. *J Agric Food Chem* **52**:742–746 (2004).
46. Gil M, Kontoudakis N, González E, Esteruelas M, Fort F, Canals JM and Zamora F, Influence of grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of cabernet sauvignon and tempranillo wines. *J Agric Food Chem* **60**: 7988-8001 (2012).
47. Ayestarán B, Guadalupe Z and León D, Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo V.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal Chim Acta* **513**: 29–39 (2004).
48. Kennedy JA and Jones GP, Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J Agric Food Chem* **49**: 1740–1746 (2001).
49. Canals JM, Arola L and Zamora F, Protein Fraction Analysis of White Wine by FPLC. *Am J Enol Vitic* **49**: 383–388(1998).
50. AENOR, Guía general para el diseño de una sala de cata(ISO 8589:2007) in *Análisis sensorial*, ed. by AENOR. Madrid (2010).

51. Stillman JA, Color influences flavor identification in fruit flavored beverages. *Journal of Food Science* **58**: 810–812 (1993).
52. Salmon JM, Fornairon-Bonnefond C and Mazauric JP, Interactions between wine lees and polyphenols: influence on oxygen consumption capacity during simulation of wine aging. *J Food Sci* **67**: 1604–1609 (2002).
53. Feuillat M, Escot S, Charpentier C, and Dulau L, Élevage des vins rouges sur lies fines. Interêt des interactions entre polysaccharides de levure et polyphénols du vin. *La Revue des Oenologues* **98**: 17–18 (2001).
54. Fuster A and Escot S, Élevage des vins rouges sur lies fines: Choix de la levure fermentaire et ses conséquences sur les interactions polysacchariques pariétaux. *La Revue des Oenologues* **104**: 20–22 (2002).
55. Guadalupe Z, Martínez L and Ayestarán B, Yeast mannoproteins in red winemaking: effect on polysaccharide, polyphenolic, and color composition. *Am J Enol Vitic* **61**:191–200 (2010).
56. 1. Poncet-Legrand C, Doco T, Williams P and Vernhet A, Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: effect of polysaccharide molecular weight. *Am J Enol Vitic* **58**: 87–91(2007)
57. Vidal S, Francis L, Guyot S, Marnet N, Kwiatkowski M, Gawel R, Cheynier V and Waters EJ, The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J Sci Food Agric* **83**: 564–573(2003).
58. Pérez-Magariño S and González-Sanjosé ML, Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. *Food Chem* **81**:301–306 (2003).

59. Noble AC, Application of time-intensity procedures for the evaluation of taste and mouthfeel. *Am. J. Enol. Vitic* **46**: 128-136(1995).
60. Bajec MR and Pickering GJ, Astringency: Mechanisms and Perception. *Crit Rev Food Sci Nut* **48**: 1-18(2008).
61. Fischer U, Boulton RB and Noble AC, Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli. *Food Qual Pref* **5**: 55-64 (1994).
62. Velentova H, Skrvánková S, Panovská Z and Pokorný J, Time-intensity studies of astringency taste. *Food Chem* **78**: 29-37 (2002).

IV. DISCUSIÓN GENERAL

El hilo conductor de la presente memoria se fundamenta en cómo se pueden paliar algunos de los efectos que el cambio climático provoca sobre la composición y calidad del vino, mediante el empleo de algunas de las nuevas herramientas que la biotecnología nos proporciona. De todo lo expuesto en la introducción se desprende que las nuevas condiciones climáticas que el calentamiento global provoca, ejerce un efecto directo el proceso de maduración de las uvas pudiendo provocar que éstas deban ser vendimiadas con una madurez inadecuada.

Es sobradamente conocido que la madurez de la uva condiciona severamente la calidad del vino final. En este sentido la bibliografía existente incluye numerosas publicaciones que así lo demuestran. El grupo de investigación en Tecnología Enológica (TECNENOL) del departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili, en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, ha trabajado en esta temática durante los últimos años. Especialmente en la problemática del desfase entre la madurez tecnológica (pulpa) y la madurez fenólica (pieles y semillas) de la uva tinta y sus consecuencias sobre la composición y calidad del vino tinto, así como sus posibles soluciones en bodega. No obstante, la inadecuada madurez de la uva no solo afecta a los vinos tintos, sino que también ejerce un efecto negativo sobre los vinos blancos. En este contexto, existe mucha menos información, y en el caso de los vinos espumosos menos aún.

Así, uno de los grandes dilemas que se plantean los productores de Cava es la decisión de la fecha óptima de vendimia bajo estas nuevas condiciones que el cambio climático está generando. Las primaveras más secas y los veranos más cálidos hacen que la uva alcance antes el contenido adecuado de azúcares y que consuma los ácidos más rápidamente. Este fenómeno comporta la aparición de un desequilibrio en los parámetros de madurez de la uva y genera el gran dilema antes mencionado que se concretaría en la siguiente cuestión. ¿Qué es mejor? Vendimiarse cuando el grado alcohólico probable es el adecuado y acidificar para compensar la falta de acidez, o adelantar la vendimia al momento de acidez óptima y enriquecer el mosto para compensar su carencia en azúcares.

En el caso del vino tinto, la problemática es algo distinta. Como ya se ha comentado, el cambio climático genera un desfase entre el grado de madurez tecnológica de la uva y el grado de maduración de pieles y semillas. En consecuencia, se obtienen vinos con alta graduación alcohólica, acidez baja y pH más alto, pero no maduros fenólica y aromáticamente. Este fenómeno conlleva que estos vinos sean desequilibrados, demasiado astringentes o amargos, con colores pobres o irregulares, y con aromas más vegetales.

Por ello, la presente Tesis Doctoral se planteó evaluar el verdadero efecto de la madurez de la uva sobre las propiedades espumantes de los vinos base de la DO Cava para verificar el efecto que puede comportar el cambio climático, y de este modo responder al dilema antes planteado. Y posteriormente evaluar algunas herramientas que nos permitirían paliar los efectos antes descritos y de este modo mejorar la calidad de los vinos espumosos (Cava) y de los vinos tintos.

Así pues, mediante el ensayo del capítulo I se ha podido describir las diferencias en composición química de vinos base y cavas realizados con uvas cosechadas a diferentes niveles de maduración, aportando información sobre el efecto del momento de vendimia, sobre la composición química del vino y más específicamente su efecto en la propiedades espumantes del vino base y del Cava. Estos datos nos han permitido concluir que para la uva destinada a la producción de vinos espumosos resulta más adecuado adelantar la fecha de vendimia y enriquecer el mosto hasta la graduación deseada. Asimismo, se ha podido establecer una relación entre las propiedades espumantes y la composición química de vinos y Cavas.

La biotecnología actual también nos ofrece múltiples herramientas para mejorar la calidad del vino final. Así por ejemplo, el uso de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas está ampliamente extendido en la industria enológica, con excelentes resultados, ya que favorece la obtención de vinos con calidad más uniformes que los que se producían con las fermentaciones espontáneas, pero a expensas, según los productores de perder complejidad en el vino final. Por ese motivo, recientemente se ha propuesto la utilización de levaduras No-*Saccharomyces* seleccionadas, en cultivos mixtos o mediante inoculaciones secuenciales. El propósito es beneficiarse de esa mayor complejidad que aporta la sucesión de diferentes levaduras a lo largo de la fermentación espontánea pero sin ninguno de sus posibles inconvenientes o riesgos. El

uso de estas levaduras está adquiriendo mucha importancia en la industria, no solo por favorecer la complejidad del vino, sino porque algunas de estas levaduras se ha observado que son capaces de modificar ciertos parámetros del vino de interés enológico, así por ejemplo hay levaduras que nos permiten obtener una acidez mayor o menor, una graduación menor o incluso un aporte en polisacáridos, glicerol, aromas y otros compuestos beneficiosos en la calidad del producto final.

Como se comentó en el capítulo I, la calidad de la espuma es uno de los parámetros más importantes en la producción de vinos espumosos ya que junto con el color es lo primero que ve el consumidor. Este parámetro está influenciado por múltiples compuestos como proteínas, aminoácidos y polisacáridos entre otros. Se ha descrito en la bibliografía que la concentración de todos estos compuestos depende del grado de madurez de la uva en el momento de ser cosechada. En este contexto, podríamos pensar que el uso de las levaduras No-*Saccharomyces* puede ser una herramienta para paliar los efectos que implica una vendimia de madurez deficiente.

En el ensayo del capítulo II se ha evaluado el efecto de la fermentación secuencial de dos levaduras No-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbruekii* y *Metschnikowia pulcherrima*) y una levadura *S. cerevisiae*, sobre la calidad final del vino base. Los resultados obtenidos indican claramente que el empleo de la inoculación secuenciada con *Torulaspora delbruekii* puede ser de gran utilidad ya que proporciona al vino base una mejor espuma.

Por otro lado, en la actualidad dentro de la selección de levaduras encontramos algunas levaduras con capacidad para acelerar ciertos procesos de vinificación largos y complejos, como por ejemplo la crianza sobre lías. Uno de los criterios de calidad que se utiliza para seleccionar el inóculo de fermentación en este caso, es la facilidad de autolisado. Otro criterio de selección muy utilizado en la actualidad es la facilidad de liberar ciertos compuestos como los compuestos nitrogenados, los polisacáridos o las manoproteínas.

Los múltiples beneficios de los polisacáridos y las manoproteínas sobre la calidad del vino han sido ampliamente descritos, pudiendo suavizar la astringencia, aumentar la untuosidad, minimizar el impacto de algunos aromas indeseables o incluso estabilizar el color. Todos estos beneficios nos ayudarían a paliar los efectos negativos que se han observado en los vinos tintos debido a una madurez deficiente de la uva. En ese sentido,

todas las metodologías y productos comerciales que permitan el aporte de polisacáridos en vino están adquiriendo importancia en la industria enológica.

Por otro lado, además de la selección de levaduras, la biotecnología nos ha proporcionado en las últimas décadas una variedad de productos obtenidos a partir de levaduras enológicas (*S. cerevisiae*). Estos productos adquieren diferente nomenclatura (paredes de levadura, cortezas, extractos de levadura, levaduras secas inactivas, manoproteínas, etc...) en función de su composición y/o procedimiento de fabricación. Según la bibliografía, estos productos tienen múltiples aplicaciones, además de ser una posible alternativa a la crianza sobre lías, tanto en vino blanco, como en vino tinto. Aunque su comportamiento en algunos ámbitos no está del todo claro, se ha observado que la gran aportación en polisacáridos por parte de estos productos al vino es probablemente el principal motivo por lo que estos productos proporcionan muchos de sus efectos positivos sobre la calidad del vino final.

En este contexto, en el capítulo III se ha evaluado el efecto de la aplicación de diferentes levaduras secas inactivas comerciales, (Optired[®], Booster Rouge[®], Noblesse[®]) en mosto, sobre el aporte en polisacáridos y sobre la composición química del vino tinto final. También se ha evaluado el uso de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (HPS) con alta capacidad de liberación de polisacáridos sobre la composición del vino tinto. Los resultados obtenidos indican que tanto las levaduras secas inactivas como la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (HPS) incrementan de forma significativa la concentración del vino en polisacáridos.

Debido a los resultados obtenidos en el capítulo III, y al hecho de que se ha descrito que los polisacáridos pueden minimizar la astringencia del vino tinto, en el capítulo IV se evaluó el efecto de estas levaduras secas inactivas sobre los taninos condensados o proantocianidinas. Para ello, se estudió el efecto de la adición de diferentes levaduras secas inactivas comerciales (Optired[®], Booster Rouge[®], Noblesse[®]) en una solución sintética similar al vino que contenía un tanino de semilla comercial, y posteriormente en un vino tinto. Los resultados obtenidos indican que la adición de levaduras secas inactivas provoca una disminución de la concentración de proantocianidinas tanto de la solución modelo como del vino tinto, así como de su grado de polimerización. Este podría ser por tanto el principal mecanismo por el cual la suplementación con levaduras

IV. DISCUSIÓN GENERAL

seca inactivas permite suavizar la aspereza del vino, dado que la astringencia de las proantocianidinas es mayor cuanto mayor es su grado de polimerización.

Por consiguiente, los resultados presentados en esta memoria permiten confirmar la hipótesis planteada, ya que se ha verificado que algunas de las herramientas que nos proporciona actualmente la biotecnología nos permiten compensar en parte los efectos de una madurez inadecuada de la uva, tanto en la producción de vinos espumosos como en la producción de vino tinto.

V. CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. El análisis de estadístico demuestra que las proteínas de masa molecular intermedia y baja presentan una correlación positiva sobre la espumabilidad (Hm) tanto en los vinos base como en los correspondientes cavas. Por el contrario el etanol, el ácido glucónico y los polisacáridos de alta masa molecular presentan una correlación negativa. No se observó ninguna correlación de ninguno de los parámetros estudiados con la estabilidad de la espuma (Hs).
2. En general, los vinos y cavas procedentes de una primera vendimia más verde presentaron mejores características espumantes que los procedentes de una segunda vendimia más madura. Frente al dilema que comporta el cambio climático se puede concluir que en el caso de las uvas destinadas a la elaboración de vinos espumosos resulta más útil vendimiar la uva cuando la acidez lo aconseja y corregir el grado alcohólico probable, que vendimiar más tarde, cuando el contenido en azúcares es el adecuado, y acidificar para corregir la acidez.
3. La fermentación del vino base mediante inoculación secuenciada de *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* dio lugar a vinos con una mejor espumabilidad (Hm) y persistencia de la espuma (Hs). Este incremento de los parámetros de la espuma está muy probablemente relacionado con la mayor concentración de la fracción de proteínas de baja masa molecular que se observa en los vinos obtenidos mediante dicha inoculación secuenciada.
4. El vino obtenido mediante inoculación secuenciada de *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* presentaba una menor acidez volátil, una mayor concentración de glicerol y fue distinguido y preferido de forma significativa en un test triangular de su control. Todo ello unido a su efecto positivo sobre las propiedades espumantes permite afirmar que la inoculación secuenciada de *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* es una herramienta muy interesante para la elaboración de vinos base.

5. La fermentación del vino base mediante inoculación secuenciada de *Metschnikowia pulcherrima* y *Saccharomyces cerevisiae* originó vinos con una mayor persistencia de la espuma (Hs) si bien su espumabilidad era similar a la del control. El vino obtenido mediante esta inoculación secuenciada fue también distinguido de su control de forma muy significativa mediante el test triangular si bien en este caso no se observó una preferencia clara. Los catadores indicaron una mayor presencia de notas florales y ahumadas en este vino. Las notas ahumadas son probablemente debidas a la mayor concentración de dimetoxifenol detectada en los vinos de inoculación secuenciada con *Metschnikowia pulcherrima* y *Saccharomyces cerevisiae*.
6. La inoculación de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* HPS da lugar a vinos tintos con un incremento en la concentración total de polisacáridos del 32 % lo que confirma la gran capacidad de esta cepa para enriquecer el vino en estas moléculas. La cepa HPS también originó vinos tintos con una intensidad colorante, un índice de polifenoles totales y una concentración de proantocianidinas significativamente superior.
7. La maceración de tres levaduras secas inactivas en medio sintético similar al vino comportó una liberación muy rápida de polisacáridos que en todos los casos alcanzó el máximo antes de los 15 días de contacto. Optired® y Booster Rouge® liberaron una mayor proporción de polisacáridos de alta masa molecular mientras que Noblesse® liberó una mayor proporción de polisacáridos de baja masa molecular.
8. La suplementación con tres levaduras secas inactivas durante la fermentación/maceración de uva tinta originó en todos los casos vinos con una mayor concentración de polisacáridos. Concretamente Optired® incrementó el 14,3%, Booster Rouge® el 19,8% y Noblesse® el 11,0 %. Estos resultados confirman la utilidad de estas levaduras secas activas para enriquecer el vino en polisacáridos.

9. La suplementación de una solución sintética de proantocianidinas de semilla de uva con las tres levaduras secas inactivas provocó una disminución significativa del índice de polifenoles totales, de la concentración de proantocianidinas así como de su grado medio de polimerización. Resultados similares se obtuvieron en un vino tinto. Por consiguiente, se puede concluir que la suplementación con levaduras secas inactivas comporta una precipitación y/o absorción preferencial de proantocianidinas de alto grado de polimerización, las cuales son precisamente las más astringentes.

10. Por consiguiente, la suplementación con levaduras secas inactivas de vinos tintos comporta dos fenómenos simultáneos. Por una parte liberan polisacáridos y por otra eliminan preferencialmente del medio proantocianidinas de alto grado de polimerización. Ambos fenómenos pueden explicar el mecanismo por el cual el empleo de las levaduras secas inactivas puede mejorar ciertos atributos sensoriales relacionados con la textura y la astringencia del vino tinto, especialmente cuando la uva no está del todo madura.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

APLICACIÓN DE NUEVAS HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA COMPENSAR LOS EFECTOS NEGATIVOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO SOBRE VINOS ESPAÑOLES

Elena González Royo

Dipòsit Legal: T 983-2015

