**RESUMEN**

# Nuevos conocimientos sobre la influencia de la autólisis de las levaduras en la composición y calidad de los vinos espumosos

P. Pons-Mercadé[1], P. Giménez[1], G. Vilomara[3], M. Conde[3], A. Cantos[3], N. Rozès[1], S. Ferrer[2], J.M. Canals[1] y F. Zamora[1]

[1] *Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultatd'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, C/Marcel.li Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain*
[2] *ENOLAB, Departament de Microbiologia i Ecologia, InstitutBioTecMed, Universitat de València, c/ Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, València, Spain*
[3] *Juvé& Camps SA, C/Sant Venat, 1, 08770 Sant Sadurní d'Anoia, Barcelona, Spain*

Recibido 08 de mayo de 2024 / Aceptado 19 de mayo de 2024 / Publicado 1 de septiembre de 2024

**RESUMEN**

Los vinos espumosos elaborados según el método tradicional pasan por una segunda fermentación en botella. Este proceso implica un tiempo de crianza en contacto con las lías, que enriquece el vino en diversas sustancias, especialmente proteínas, manoproteínas y polisacáridos, gracias a la autólisis de las levaduras. Como resultado de esta autólisis de las levaduras, los vinos espumosos se benefician de una mejor integración del dióxido de carbono y de una clara mejora sensorial, especialmente en el caso de crianzas prolongadas. Este capítulo sintetiza los principales resultados que nuestro grupo de investigación ha obtenido sobre la influencia de la autólisis de las levaduras en la composición y calidad de los vinos espumosos durante los últimos años, haciendo especial hincapié en la capacidad de las lías para liberar proteínas y polisacáridos, así como en su capacidad de consumir oxígeno y proteger así los vinos espumosos de la oxidación.

## INTRODUCCIÓN

De conformidad con el Reglamento europeo CE 1493/99 [1], los vinos espumosos se diferencian de los vinos tranquilos por el nivel de presión interna de dióxido de carbono que debe ser superior a 3 bares. Los vinos espumosos se clasifican en función del origen del $CO_2$ en dos categorías principales: **vinos gasificados**, cuando el dióxido de carbono es de fuente exógena y **vinos espumosos naturales**, cuando procede de una fermentación endógena.

Los vinos gasificados se elaboran simplemente inyectando dióxido de carbono hasta alcanzar la presión interna deseada. Normalmente, estos vinos gasificados no tienen referencia geográfica, son muy baratos y tienen una calidad sensorial muy inferior a la de los vinos espumosos naturales. Por el contrario, los vinos espumosos naturales se obtienen mediante una fermentación natural manteniendo todo o gran parte del dióxido de carbono en el interior del recipiente en el que han sido fermentados.

Existen diferentes métodos de elaboración de los vinos espumosos naturales dependiendo del tipo de recipiente (botella o depósito), tiempo de contacto con las lías, procedimiento de eliminación de las lías o si han tenido una o dos fermentaciones alcohólicas. Además, algunos de estos vinos espumosos naturales están protegidos por denominaciones de origen controladas como Champagne, Cava, Francia Corta, Prosecco, Asti, Crémant de Borgougne, etc… En ese caso, cada denominación de origen determina el método de elaboración, las variedades autorizadas y el tiempo de crianza.

Los vinos espumosos considerados de primera calidad, como el Champagne, Francia Corta o el Cava, se elaboran principalmente según el método tradicional, también llamado en la AOC Champagne, "*méthode champenoise*". La principal característica del método tradicional es que tras una primera fermentación para obtener el vino base, se realiza una segunda fermentación, también llamada "*prise de mousse*", en el interior de una botella cerrada [2, 3]. Esta segunda fermentación en botella, y especialmente el tiempo de crianza en contacto con las lías, transforma completamente la composición del vino espumoso y representa por tanto el principal factor diferencial frente a otros vinos espumosos elaborados mediante otros métodos [4-6]. Durante el tiempo de contacto del vino con las lías ocurren varios procesos

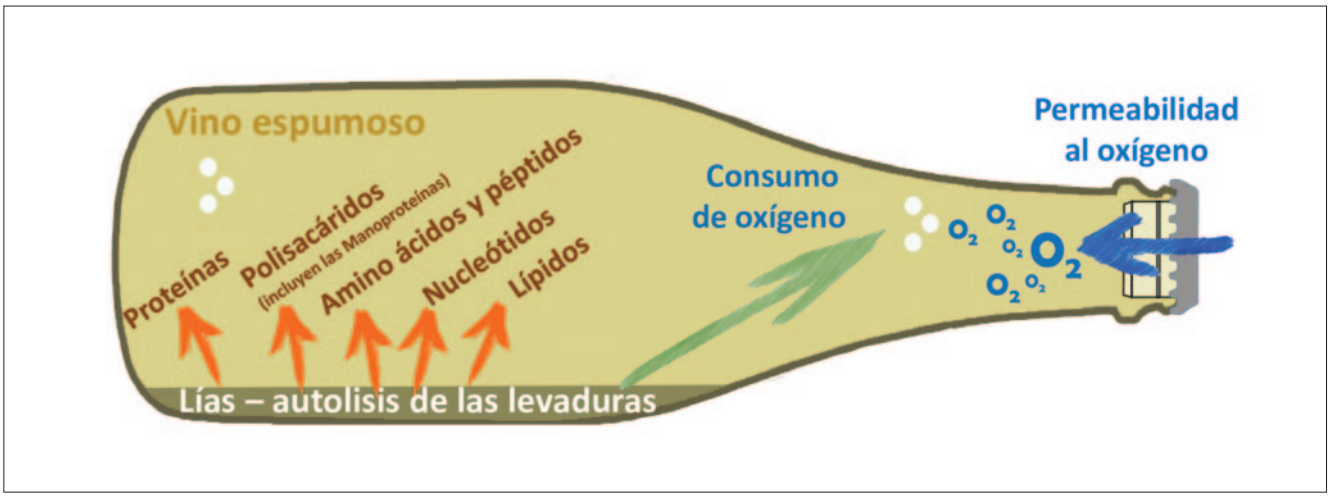



**Figura 1.** Influencia de las lías en la composición del vino espumoso.

(Figura 1) que explican por qué los vinos espumosos elaborados por método tradicional generalmente tienen mayor calidad y complejidad, y son mucho mejor considerados por la crítica y los consumidores.

Brevemente, una vez completada la segunda fermentación, comienza el proceso de la autolisis [7]. La autólisis consiste en el proceso de degradación de las estructuras de las células de levadura [8]. La autólisis implica la participación de enzimas hidrolíticas que, al degradar las estructuras celulares, provocan la liberación de muchas sustancias como aminoácidos, péptidos, lípidos, proteínas, nucleótidos, proteínas, manoproteínas y polisacáridos [9-15]. La liberación de estas substancias favorece la integración de dióxido de carbono, lo que mejora la percepción de efervescencia en el paladar y aumenta la estabilidad de la espuma [6, 16]. Las manoproteínas y los polisacáridos también desempeñan un papel sensorial positivo al mejorar la untuosidad [17], mientras que algunos péptidos y proteínas pueden contribuir al dulzor del vino [18]. También se sabe que algunos aminoácidos, péptidos y nucleótidos participan en el sabor umami [19] y son potenciadores del sabor. Finalmente, se ha descrito que los aminoácidos y lípidos son precursores del aroma [20] y que contribuyen por tanto a la complejidad aromática de los vinos espumosos.

También se ha descrito que las lías ejercen actividad antioxidante [21], y recientemente se ha demostrado su capacidad para consumir oxígeno [22]. El mecanismo por el cual las lías consumen oxígeno no está claro, pero podría estar relacionado con la oxidación de ciertos lípidos de membrana [23] o con su contenido en glutatión [24]. Independientemente del mecanismo, está claro que la presencia de las lías ralentiza la evolución oxidativa del vino al consumir el oxígeno que permea el tapón corona. Esta capacidad de las lías para consumir oxígenoes probablemente la razón principal por la que los vinos espumosos suelen envejecer durante más tiempo que los vinos blancos tranquilos.

En síntesis, la autólisis de las levaduras modifica completamente la composición del vino espumoso y por tanto también su calidad sensorial. Por todo ello, las principales denominaciones de origen de vinos espumosos han establecido tiempos mínimos de envejecimiento para garantizar que la autólisis ejerza un efecto sobre su composición y calidad.

Para la DO Cava, el tiempo mínimo de crianza es de 9 meses para los vinos calificados como “Guarda”, aunque sus vinos espumosos *premium* suelen tener una crianza más larga. De hecho, la DO Cava contiene otras dos categorías de vinos espumosos con tiempos de crianza prolongados. Se trata de “Guarda Superior - Reserva” y “Guarda Superior - Gran Reserva”, cuyos tiempos mínimos de crianza son de 15 y 30 meses, respectivamente. La DO Cava también considera la categoría de “Guarda Superior – Paraje Calificado” para vinos espumosos muy especiales procedentes de viñedos singulares. En este caso el tiempo mínimo de crianza es de 36 meses, si bien algunas bodegas de prestigio mantienen crianzas aún mayores.

No hay duda, por tanto, de que la autólisis favorece la calidad de los vinos espumosos, al menos durante los primeros años. Sin embargo, paralelamente se producen otros fenómenos –como la oxidación aromática y del color o la aparición de un exceso de sabor a lías– que pueden perjudicar las cualidades sensoriales de estos vinos [22]. Por tanto, podemos preguntarnos hasta qué momento de envejecimiento se favorece la calidad del producto.

El objetivo de este artículo es sintetizar los principales resultados que nuestro grupo de investigación ha obtenido sobre la influencia de la autólisis de las leva-

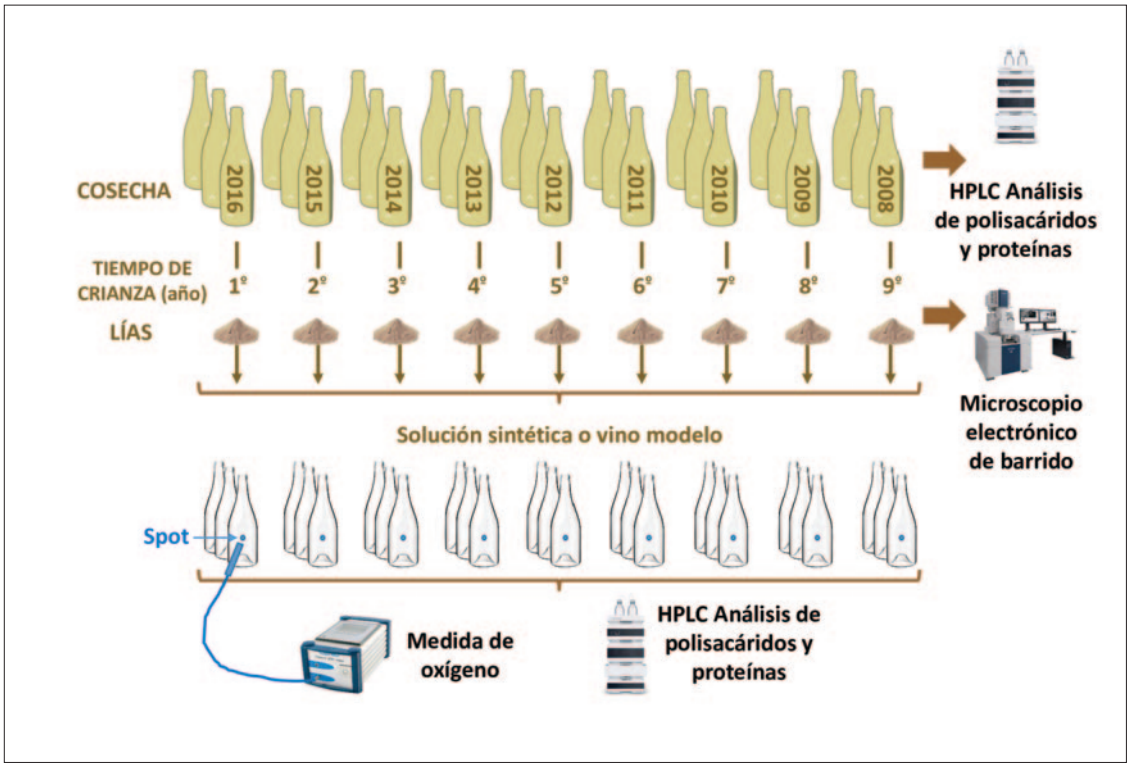



**Figura 2.** Diseño experimental.

duras en la composición y calidad de los vinos espumosos. Este estudio se ha llevado a cabo estudiando nueve añadas consecutivas y se desarrolló en la Tesis Doctoral de Pere Pons titulada "Autólisis de levaduras en la elaboración de vinos espumosos; Influencia del tiempo de crianza en la liberación de polisacáridos y proteínas y en el consumo de oxígeno por las lías" [25] que formó parte de los proyectos GLOBALVITI (Solución global para mejorar la producción de vino frente al cambio climático basada en robótica, tecnología informática y estrategias biotecnológicas y gestión del viñedo) y CAVAWINNER (Estudio y Mejora Tecnológica de los Procesos Tradicionales para la Elaboración del Cava) financiado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial de España (programa CDTI – CIEN). Hasta donde sabemos, este es el tiempo más largo jamás estudiado en relación con los vinos espumosos de la DO Cava.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La Figura 2 ilustra el diseño experimental. Brevemente, este estudio se llevó a cabo utilizando vinos espumosos de nueve añadas consecutivas (2008-2016) de las cavas Juve & Camps. Todos estos vinos espumosos fueron elaborados con uvas de los mismos viñedos y elaborados la forma más similar posible. El espumoso más joven (2016) fue degollado tres meses después del "tiraje" y los espumosos de las demás añadas también lo fueron tres meses después de haber cumplido respectivamente de 1 a 8 años de crianza. En todos los casos las lías fueron recuperadas, lavadas, resuspendidas en una solución de vino modelo (Etanol 12% v/v, 4 g/L de ácido tartárico, 3 mg/L de Fe+3 y 0,3 mg/l de Cu+2, pH ajustado a pH = 3,50 con hidróxido sódico) y embotelladas para su posterior análisis. A estos frascos se les insertó una pastilla para medir el oxígeno disuelto mediante luminiscencia (Nomasense TM O2 Trace OxygenAnalyzer). También se utilizaron alícuotas de las lías de las nueve cosechas consecutivas para la observación ultraestructural mediante microscopía electrónica de barrido [15]. En consecuencia, este estudio se realizó con vinos espumosos y sus lías del primero al noveno año de crianza.

Los vinos espumosos se utilizaron para análisis de color [26], polisacáridos [27] y proteínas [28], para medir las propiedades espumantes [29] y para análisis sensorial. Paralelamente, se midió periódicamente la concentración de oxígeno en las botellas en las que se había trasvasado las lías [22]. Exactamente un año después, las lías

**Industrias Pesanse, S.A.**
Av. IV Centenario, 54
45800 Quintanar de la Orden (Toledo)
Tel.: 925 180 731 - 925 180 000
E-mail: industrias@pesanse.es
www.pesanse.es

# Fabricación de maquinaria para el procesado de uva

*Entornos de trabajo limpios y seguros*
*Procesos automáticos*
*Extracción de mostos de máxima calidad*
*Maquinaria robusta y de grandes dimensiones*
*Servicio de mantenimiento y reparación en proximidad*

* TOLVAS DE RECEPCIÓN
* DESPALILLADORAS
* BOMBAS DE VENDIMIA
* TRANSPORTADORES
* BASCULANTES
* PRENSAS NEUMÁTICAS
* TECNOLOGÍA FLASH DETENTE
* CONTENEDORES DE ORUJO
* INGENIERÍA Y SERVICIOS

**FABRICACIÓN DE MAQUINARIA VINÍCOLA**

| Tiempo de crianza (años) | Claridad (L*) | Componente verde-roja ( a*) | Componente azul-amarilla (b*) | Espumabilidad-Hm (mm) | Estabilidad de la espuma-Hs (mm) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1º | 98.0 ± 0.2 C | -0.88 ± 0.06 CD | 6.88 ± 0.12 A | 87 ± 1 C | 71 ± 3 C |
| 2º | 98.1 ± 0.1 C | -1.02 ± 0.04 BCD | 7.69 ± 0.08 B | 170 ± 1 E | 93 ± 3 E |
| 3º | 97.9 ± 0.1 C | -1.11 ± 0.02 AB | 8.78 ± 0.07 C | 110 ± 5 D | 81 ± 1 D |
| 4º | 97.7 ± 0.2 BC | -1.11 ± 0.07 AB | 8.66 ± 0.21 C | 80 ± 4 BC | 72 ± 2 C |
| 5º | 97.4 ± 0.0 B | -1.09 ± 0.08 AB | 9.87 ± 0.13 E | 76 ± 4 BC | 68 ± 1 BC |
| 6º | 97.6 ± 0.1 BC | -1.25 ± 0.08 A | 9.59 ± 0.07 DE | 61 ± 1 A | 53 ± 3 A |
| 7º | 96.8 ± 0.5 A | -1.05 ± 0.03 ABC | 9.39 ± 0.02 DE | 73 ± 1 ABC | 58 ± 2 A |
| 8º | 97.6 ± 0.1 BC | -1.00 ± 0.10 BCD | 10.77 ± 0.19 F | 71 ± 4 AB | 54 ± 1 A |
| 9º | 97.4 ± 0.2 B | -0.92 ± 0.10 BCD | 10.99 ± 0.34 F | 74 ± 1 ABC | 59 ± 1 AB |

Los resultados se expresan como la media aritmética ± la desviación estándar de tres replicas. Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$).

**Tabla 1.** Coordenadas CIEL*a*b* y propiedades espumantes de los vinos espumosos de 9 añadas consecutivas.

fueron centrifugadas y el sobrenadante fue utilizada para análisis de los polisacáridos y proteínas liberados durante el trascurso de un año [27-28].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

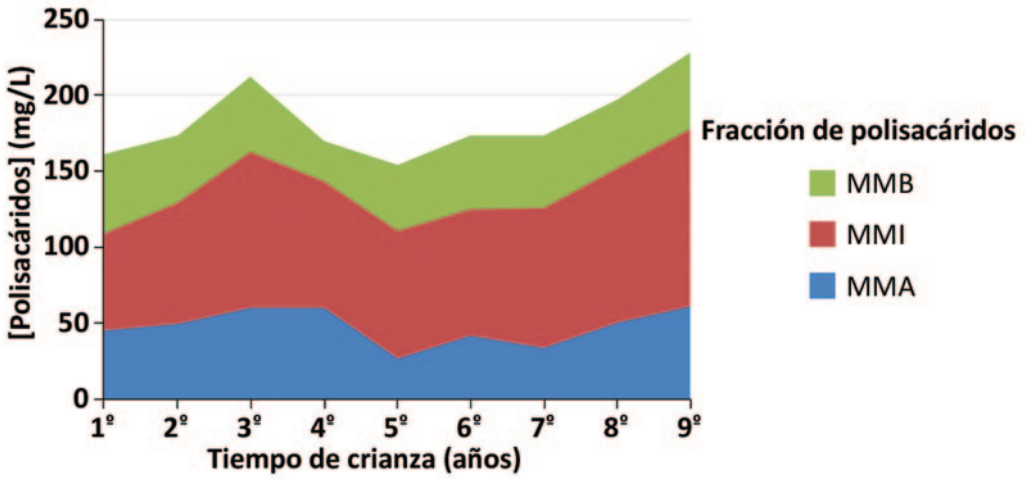
En la **Tabla 1** se muestran las coordenadas CIEL*a*b* de los vinos espumosos. Como se esperaba, la componente azul-amarilla (b*) se incrementó claramente a medida que aumentaba el tiempo de envejecimiento. Estos datos confirman un hecho bien conocido por los enólogos: la intensidad del color amarillo aumenta progresivamente con el tiempo. La **Tabla 1** también muestra las propiedades espumantes de estos vinos espumosos. Tanto la altura máxima de la espuma (Espumabilidad – HM) como la altura estable de la espuma (Estabilidad de la espuma – HS) mostraron una tendencia similar, aumentaron entre el primer y segundo año de envejecimiento y disminuyeron progresivamente después.

La **Figura 3** muestra la concentración de polisacáridos de los vinos espumosos de las nueve añadas consecutivas. En general, no se detectó una tendencia clara ni en la concentración total de polisacáridos ni en ninguna de sus diversas fracciones de diferente masa molecular. Esta falta de tendencia parece contradecir lo que se debería esperar de la autólisis de la levadura, ya que teóricamente debería aumentar su concentración con el tiempo. Sin embargo, otros autores tampoco encontraron una tendencia clara en la evolución de la fracción de polisacáridos durante la crianza de vinos espumosos sobre lías [13, 30-31].

Una posible explicación para esta falta de tendencia puede ser que los polisacáridos fuesen liberados y eliminados simultáneamente del medio. La autólisis de levadura puede ser una fuente de polisacáridos y manoproteínas [32]. Sin embargo, los polisacáridos también pueden desaparecer por precipitación [13], absorción por los agentes de removido [33] y por degradación enzimática [30]. Además, la variabilidad entre añadas puede superponerse, lo que hace muy difícil detectar cualquier tendencia.

La **Figura 4** muestra la concentración proteica de los vinos espumosos de las distintas añadas. Al igual que ocurrió con los polisacáridos, no se observó una tendencia clara a lo largo del tiempo de envejecimiento, ni en la concentración de proteína total ni en ninguna de sus fracciones de diferente masa molecular. Una vez más, estos resultados parecen contradecir lo que se espera de la autólisis de la levadura. Sin embargo, otros autores también han informado de un comportamiento errático similar [34-36].

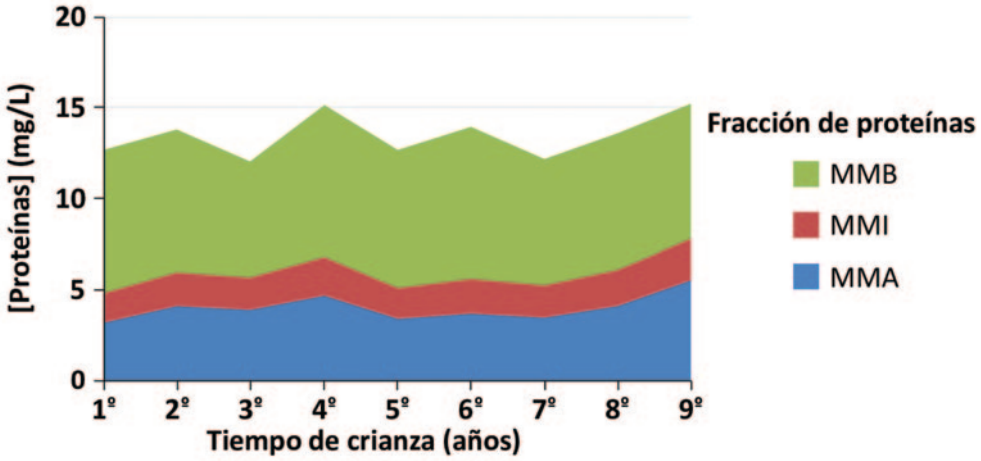
De manera similar a lo que sucedía con los polisacáridos, esta falta de tendencia puede estar relacionada con un equilibrio entre las proteínas liberadas por la autólisis de la levadura y las que desaparecen por la absorción por la bentonita y por la degradación enzimática [9, 34-35, 37]. Además, la variabilidad en la concentración original de




MMB: Fracción de masa molecular baja (40-7,5 kDa); MMI: Fracción de molecular intermedia (180-40 kDa); MMA: Fracción de masa molecular alta (> 180 kDa)

Adaptado de Pons-Mercadé et al., 2021 [15]

**Figura 3.** Evolución del contenido de polisacáridos de los vinos espumosos a lo largo del tiempo de crianza.




MMB: Fracción de masa molecular baja (50-25 kDa); MMI: fracción de masa molecular intermedia (75-50 kDa); MMA: fracción de masa molecular alta (> 75 kDa)

Adaptado de Pons-Mercadé et al., 2021 [15]

**Figura 4.** Evolución del contenido en proteínas de los vinos espumosos a lo largo del tiempo de crianza.

proteínas de cada cosecha puede dificultar la extracción de conclusiones.

Al no observarse tendencia alguna, ni en los polisacáridos ni en las proteínas, se decidió estudiar la liberación de estas macromoléculas por las lías mediante un enfoque diferente consistente en analizar las soluciones sintéticas que habían estado en contacto con las lías durante un año. La **Figura 5** muestra los resultados obtenidos. Los polisacáridos liberados en esta solución de vino modelo por las lías (**Figura 5A**) aumentaron entre el primer (aproximadamente 4 mg/L) y el segundo (aproximadamente 6 mg/L) año de crianza, mientras que disminuyeron progresivamente en las añadas posteriores, alcanzando un valor mínimo en el noveno año de envejecimiento (aproximadamente 0,90 mg/L). La concentración de manosa obtenida de la hidrólisis de estos polisacáridos (**Figura 5B**) fue muy similar a la concentración total de polisacáridos, lo que confirmaría que se trataba principalmente de manoproteínas.

La concentración de proteínas totales liberadas de las lías de diferentes tiempos de crianza en la solución sintética (**Figura 5C**) mostró un patrón similar al observado en los polisacáridos, alcanzando un valor máximo en el tercer año (aproximadamente 0,32 mg/L) y un valor mínimo en el noveno año de envejecimiento (aproximadamente 0,17 mg/L).

Con el propósito de reproducir el efecto acumulativo de liberación de polisacáridos y proteínas a lo largo del tiempo de crianza de las lías, se sumaron las concentraciones de ambas macromoléculas liberadas desde el primero al noveno año (**Figuras 5D** y **5E**). Este sencillo enfoque muestra un claro aumento en las concentraciones acumuladas de ambas macromoléculas a lo largo del tiempo de envejecimiento. La acumulación total de polisacáridos al final del período de nueve años fue de 26,6 mg/L, mientras que la de proteínas fue de 2,4 mg/L. Estos valores deben tomarse con cautela ya que representan tan sólo una aproximación. Sin embargo, estos datos indican que la liberación de polisacáridos y proteínas de las lías durante el proceso de crianza fue muy inferior a las concentraciones habituales presentes en estos vinos espumosos.

Se realizó otra aproximación con el objetivo de ilustrar la distribución de polisacáridos y proteínas según su origen (de autólisis de lías o del vino base) a lo largo del tiempo de crianza. La **Figura 6** muestra el porcentaje de polisacáridos (A) y proteínas (B) procedentes de autolisis de lías o de los vinos base respecto a la concentración total en los vinos espumosos. Esta figura muestra claramente que el porcentaje de polisacáridos y proteínas procedentes de la autólisis de las lías era extremadamente bajo en los vinos espumosos jóvenes. Eso significa que, durante el primer año de crianza, el vino espumoso tenía sólo un 2% de proteínas y un 3% de polisacáridos procedentes de lías. Estos porcentajes aumentaron con el tiempo de envejecimiento y alcanzaron valores máximos en el sép-

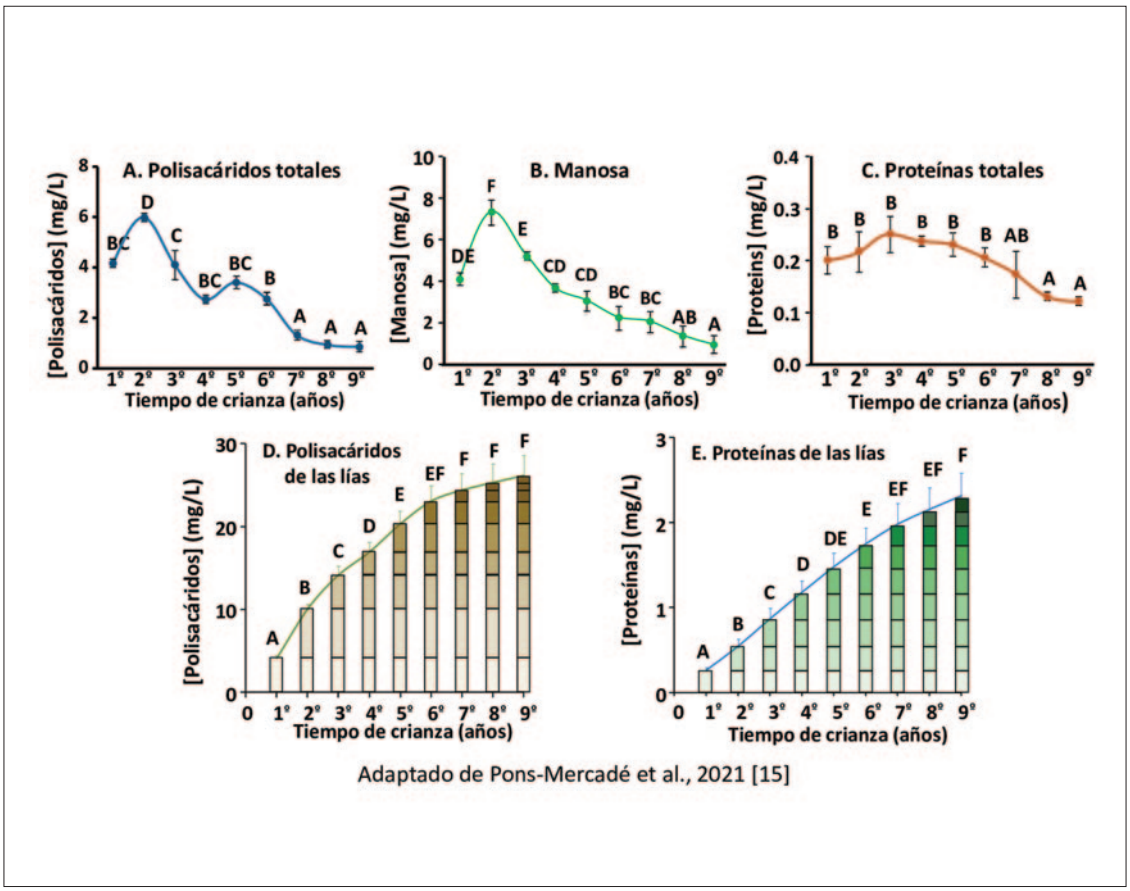



**Figura 5.** Evolución del contenido en polisacáridos y proteínas de los vinos espumosos a lo largo del tiempo de crianza.

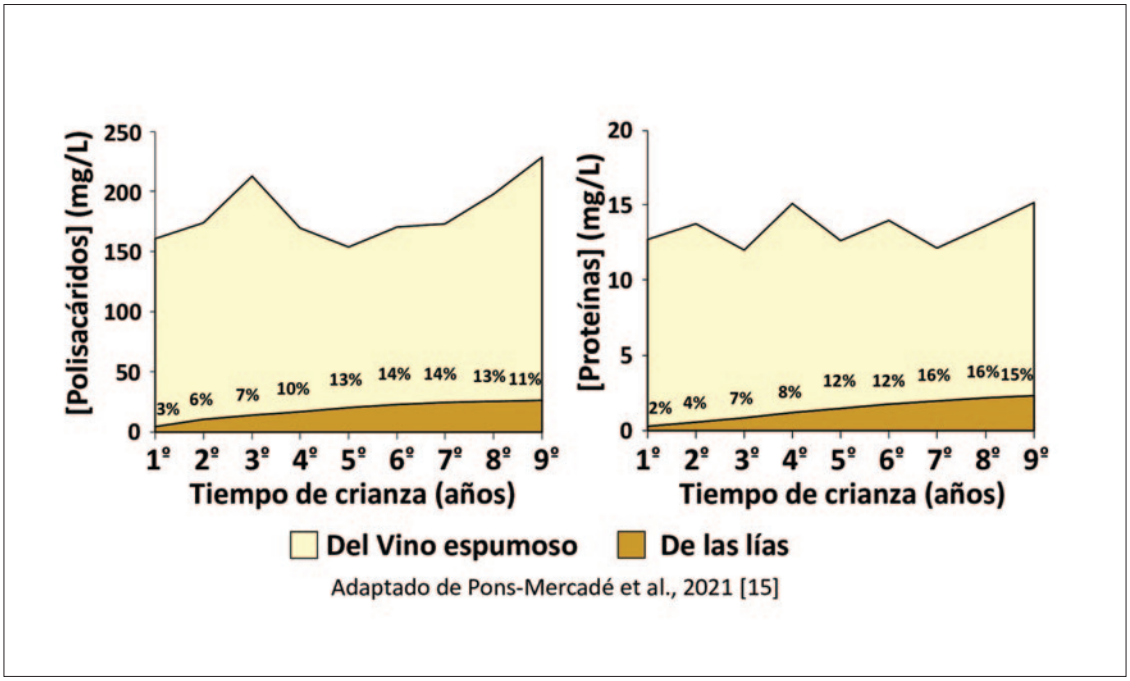



**Figura 6.** Distribución de proteínas y polisacáridos del vino espumoso según su origen.

timo año de envejecimiento (14% para polisacáridos y 16% para proteínas).

Es necesario señalar que sólo el 88% de los espumosos de la DO Cava tienen una crianza de entre 9 y 15 meses y que el 78% de los Champagnes tienen una crianza de entre 12 y 36 meses (datos de los Consejos Reguladores). En consecuencia, la mayoría de los vinos espumosos elaborados por el método tradicional tienen porcentajes de polisacáridos y proteínas procedentes de la autólisis de lías inferiores al 7%. Este valor debería ser incluso inferior en los espumosos más jóvenes, y especialmente aquellos no elaborados por el método tradicional.

Como se explicó anteriormente, las botellas en las que se resuspendían las lías extraídas de los vinos espumosos en una solución de vino modelo, llevaban insertadas una pastilla para medir el oxígeno disuelto mediante luminiscencia. El contenido de estas botellas se saturó con oxígeno y su concentración se controló periódicamente durante un año. La **Figura 7** muestra la cinética del consumo de oxígeno de las lías de vinos espumosos desde el primer al noveno año de crianza [22]. El consumo de oxígeno de la solución de vino modelo Control-A (sin adición de lías) y el consumo de oxígeno en el Control-B (soluciones sin lías y sin oxígeno) fueron muy bajos y pueden considerarse insignificantes (datos no mostrados). Por el contrario, el consumo de oxígeno de todas las muestras que contienen lías aumentó con el tiempo, lo que demuestra definitivamente que las lías realmente tienen la capacidad de consumir oxígeno.

Además, este gráfico muestra claramente que las lías de los tres primeros años, especialmente las del segundo año, consumen mucho más oxígeno que las lías de años posteriores. Por tanto, parece claro que la capacidad de las lías de los vinos espumosos para consumir oxígeno aumenta entre el primer y segundo año y posteriormente tiende a disminuir a lo largo del periodo de crianza. El modelo cinético propuesto por Pascual et al. (2017) [38] se aplicó a estos datos con el fin de determinar con mayor precisión la capacidad de consumo total de oxígeno de las lías de estos vinos espumosos. La **Figura 8** uestra que las lías del segundo año son capaces de consumir casi el doble de oxígeno que las del primer o tercer año. Posteriormente, el consumo anual de oxígeno disminuye drásticamente en las lías más viejas.

El mayor consumo de oxígeno de las lías de segundo año podría estar relacionado con ladinámica descrita del proceso de autólisis que, según algunos autores, comienza ligeramente a los 4 meses y es más intenso durante el segundo año [7, 32, 39-40].También cabe señalar que la capacidad máxima de consumo de oxígeno de las lías del segundo año coincide con la máxima liberación de polisacáridos y proteínas y con los niveles máximos de los parámetros de formación de espuma [15]. Todos estos datos parecen indicar que la autólisis realmente alcanza su punto máximo durante el segundo año de envejecimiento.

En cualquier caso, parece que el consumo de oxígeno por las lías disminuye drásticamente tras tres años de crianza mientras que la entrada de oxígeno al interior del vino espumoso a través del tapón corona parece ser constante [41]. Mientras la capacidad de consumo de oxígeno de las lías sea mayor que la permeabilidadal oxígeno, el vino espumoso estará protegido contra la oxidación. Sin embargo, podemos preguntarnos ¿qué pasaría cuando las lías dejen de consumir suficiente oxígeno? Cuando esto sucede, el oxígeno será consumido por otros componentes del vino, especialmente por los compuestos fenólicos, lo que provocará un pardeamiento y la aparición de peróxido de hidrógeno que oxidará otros compuestos del vino en ausencia de dióxido de azufre libre, especialmente los compuestos aromáticos. Evidentemente la oxidación será mayor o menor dependiendo de la composición del vino espumoso, que depende en gran medida de la añada y del proceso de elaboración.

La **Figura 9** intenta ilustrar este complejo equilibrio mostrando el consumo de oxígeno acumulado por las lías en comparación con el consumo de oxígeno a través del tapón corona considerando el valor mínimo de permeabilidad al oxígeno reportado por Valade et al. (2007) [41]. La comparación de las dos curvas es sólo una aproximación teórica, pero aun así aporta información muy interesante.

Según este enfoque, la permeabilidad al oxígeno a través del tapón corona permanece por debajo del oxígeno acumulado consumido por las lías durante los tres primeros años de envejecimiento y lo supera aproximadamente a los tres años y medio. Más exactamente, el punto de intercepción está a los 3 años y 7 meses. Estos datos indican que, pasado este tiempo de crianza, el oxígeno consumido por las lías no sería suficiente para compensar su entrada, lo que probablemente provocará la oxidación del vino. Se debe tener en cuenta que este cálculo se realizó considerando el valor mínimo de permeabilidad descrito para los tapones corona y que cualquier aumento en esta permeabilidad implicaría por lo tanto un punto de intersección más temprano en el tiempo. Por ejemplo, con una permeabilidad un 20% mayor, la intersección se produciría justo después de dos años de envejecimiento. Como se mencionó anteriormente, este es solo una aproximación teórica basado en nuestros

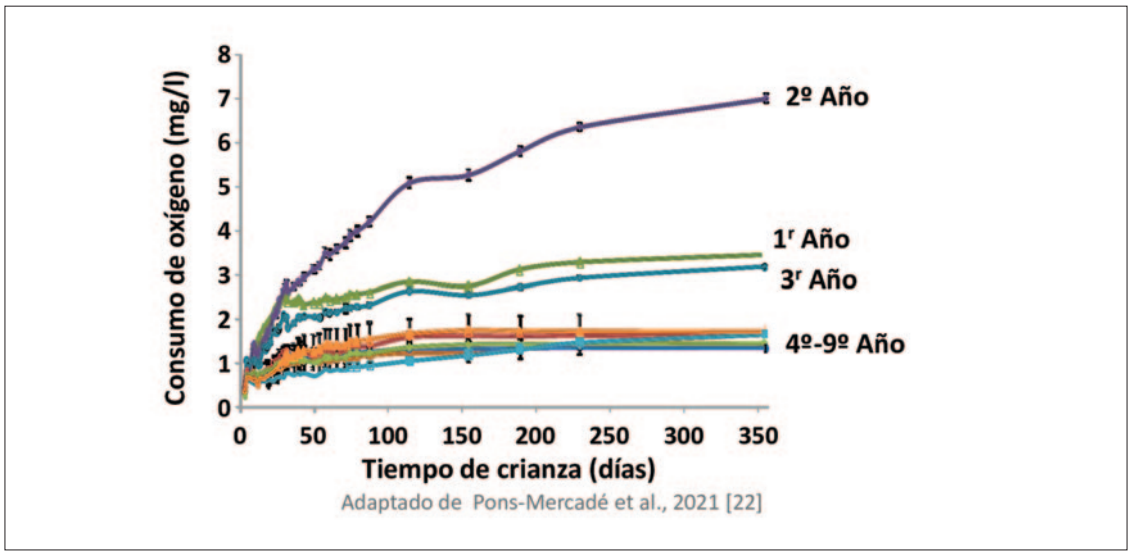



**Figura 7.** Consumo de oxígeno por lías extraídas de vinos espumosos de diferentes tiempos de crianza.

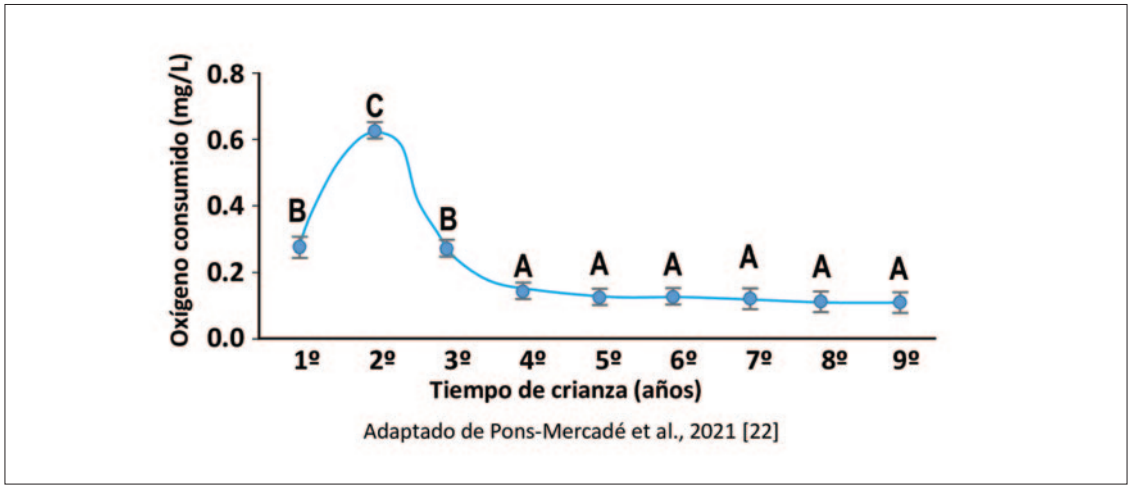



**Figura 8.** Oxígeno total consumido en un año por las lías extraídas de vinos espumosos de diferentes tiempos de crianza.

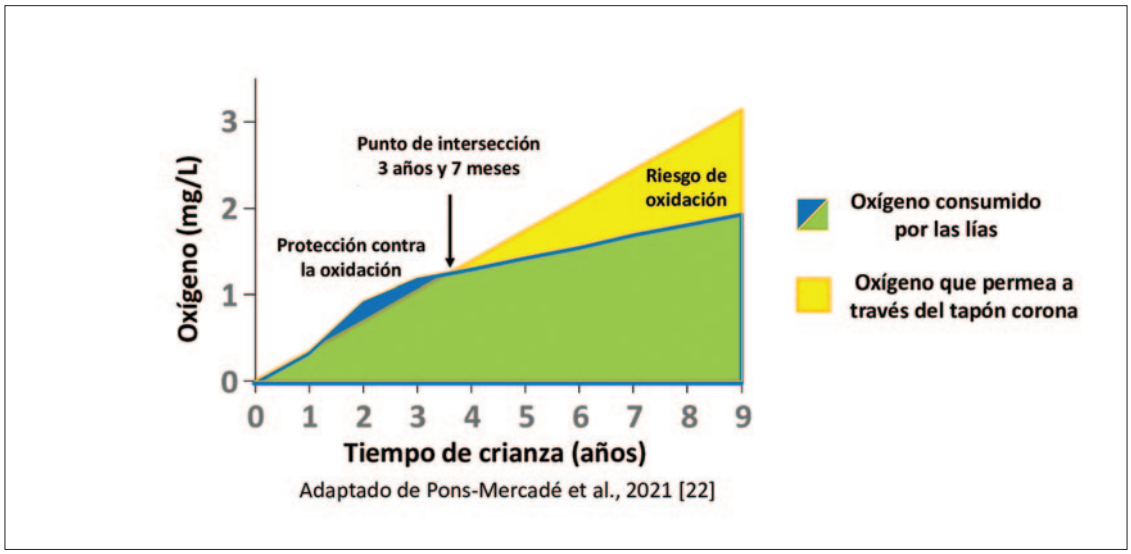



**Figura 9.** Acumulación de oxígeno consumido por las lías en comparación con la permeabilidad al oxígeno del tapón corona.

resultados, pero es muy útil para ilustrar lo que sucede durante el envejecimiento del vino espumoso.

Todos estos vinos espumosos fueron catados por un panel entrenado y los principales resultados se sintetizan en la **Figura 10**. Se pidió al panel que clasificara a ciegas los vinos espumosos según su edad. El panel apreció con éxito el orden cronológico de estos espumosos ya que estableció cuatro grupos estadísticamente significativos en función de la percepción sensorial de su tiempo de crianza: Grupo A, que el panel consideró el más joven (primer año de crianza); Grupo B (segundo y tercer año de crianza); Grupo C (cuarto a sexto años de envejecimiento) y Grupo D (séptimo a noveno años de envejecimiento).

Todos los catadores consideraron las cinco añadas más jóvenes de vinos espumosos como "aceptables" para el consumo bajo su criterio sensorial cualitativo. Sin embargo, algunos de ellos consideraron que pasado este tiempo de crianza los espumosos eran "inaceptables". Estos datos indican que, después de cinco años, los vinos espumosos comenzaron a verse afectados por un envejecimiento excesivo. Cabe destacar que estos datos sensoriales coinciden muy bien con las consideraciones anteriores sobre el equilibrio entre el consumo de oxígeno por las lías y la permeabilidad al oxígeno a través del tapón corona. Según estos resultados, el consumo de oxígeno por las lías empezó a no ser suficiente para compensar el aporte de oxígeno a través del tapón corona después de tres años y siete meses de crianza. Pasado este tiempo, el vino espumoso no tiene suficientes defensas contra la oxidación. En estas condiciones, su calidad sensorial puede empezar a deteriorarse, aunque los efectos de esta oxidación también dependerán de su composición química y de las condiciones de almacenamiento. En el presente estudio, el deterioro sensorial parece comenzar después del quinto año de envejecimiento.

Finalmente, se tomaron algunas fotografías de las levaduras utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) [15] para visualizar el proceso de autolisis de las levaduras en los vinos espumosos con una crianza de hasta nueve años (**Figura 11**). Estas imágenes muestran cómo las estructuras de las células de levadura se degradan, pliegan y desinflan progresivamente. En la primera imagen, que muestra la levadura del cultivo iniciador utilizado para la segunda fermentación de la última añada (2016), la célula de la levadura parece muy sana ya que es alargada, ovoide y turgente sin ninguna arruga ni pliegue. Incluso se pueden identificar varias cicatrices de gemación. La segunda imagen muestra lo que sucede después de la segunda fermentación (tres meses después): la célula de levadura ha perdido algo de turgencia y comienza a mostrar arrugas y pliegues. Dos años más tarde, en el tercer año de envejecimiento, la célula de levadura está aún más degradada y arrugada y comienza a desinflarse. Al quinto año de envejecimiento, la célula de levadura está completamente aplanada en los bordes y conserva sólo un poco de turgencia en el centro, que está lleno de arrugas y pliegues. En el séptimo año de envejecimiento, la célula de levadura está aún más degradada y desinflada y el centro de la célula se ha desmoronado, arrugado y aplanado. Finalmente, en el noveno año, la célula de levadura colapsa por completo y algunas de sus estructuras están rotas.

## CONCLUSIONES

Se puede concluir que las lías de los vinos espumosos elaborados según el método tradicional tienen una capacidad real de liberar proteínas y polisacáridos. Sin embargo, la proporción de polisacáridos y proteínas procedentes de la autólisis de las lías es muy baja en los vinos espumosos jóvenes, aproximadamente sólo un 2-3% en el primer año de crianza y alrededor de un 7% en el tercero. Esto sugiere que el impacto real de los polisacáridos y proteínas de la autólisis de las lías en los vinos espumosos degollados antes de finalizar su primer año de crianza debería ser muy bajo. Los productores de vino deben tener presente esta conclusión, ya que la mayoría de los vinos espumosos elaborados con el método tradicional tienen una crianza inferior a un año y los elaborados mediante otros métodos tienen una crianza aún menor. En consecuencia, sólo los vinos espumosos envejecidos durante más tiempo se beneficiarían de una mayor presencia de polisacáridos y proteínas procedentes de la autólisis de las levaduras.

También se puede afirmar que las lías consumen oxígeno y por tanto protegen al vino espumoso contra la oxidación. Sin embargo, la capacidad de las lías para consumir oxígeno disminuye drásticamente a partir de los tres años de crianza, alcanzando valores inferiores a los de la permeabilidad teórica al oxígeno del tapón corona tras unos tres años y medio de crianza. Los productores de vinos espumosos también deben tenerlo en cuenta, ya que pasado este tiempo la capacidad de protección de las lías puede no ser suficiente. De hecho, algunos cata-

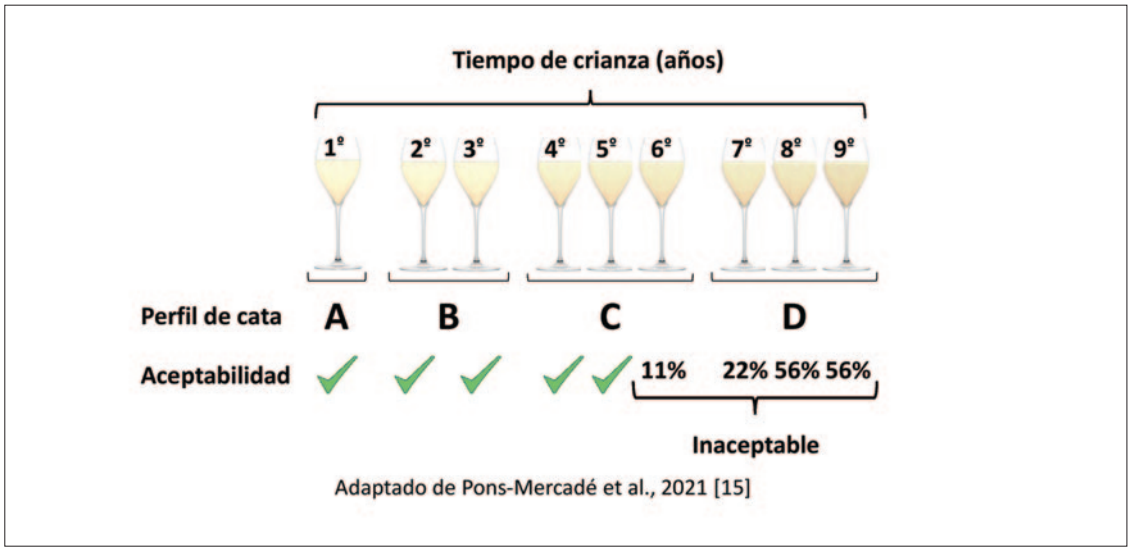



**Figura 10.** Análisis sensorial de los vinos espumosos de las nueve añadas consecutivas.

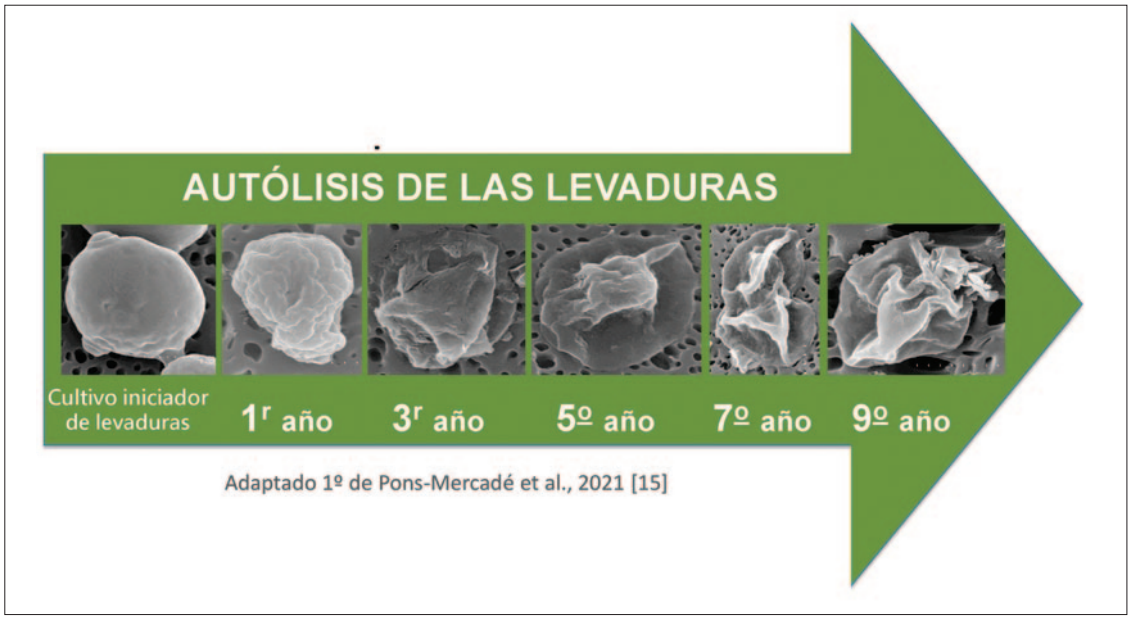



**Figura 11.** Seguimiento de la autólisis de la levadura a lo largo del tiempo mediante microscopía electrónica de barrido.

dores consideraron que la calidad de los espumosos se vio afectada negativamente después de cinco años de crianza debido al exceso de oxidación. Estos datos explican lo que los enólogos elaboradores de vinos espumosos saben empíricamente. Sólo algunos vinos espumosos de alta calidad elaborados con el método tradicional pueden envejecer más de tres años sin verse afectados por la oxidación, y en este caso los vinos espumosos alcanzan un extraordinario nivel de complejidad que sólo una larga crianza puede proporcionar.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España, a través de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT - proyecto RTI2018-095658- B-C33) y el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI – programa CIEN, proyectos GLOBALVITI y CAVAWINNER).

**BIBLIOGRAFÍA**

European Regulation CE 1493/99 [Internet]. 1999. Available from: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:31999R1493 [Accessed: 2021-10-7]

[2] Journal Officiel de la Republique Française (2010) Decret no. 2010-1441 du 22 novembre 2010 relatif a l'appellation d'origine controlee Champagne. NOR: AGRT0929479D., p. No. 0273 25 novembre 2010; *Décret* no. 2010-1441.

[3] BOE (2007) ORDEN APA/415/2007, de 23 de febrero, por la que se modifica el Reglamento de la Denominacion «Cava» y de su Consejo Regulador., p. 50, pp. 8487–8491.

[4] Maujean A. Histoire de bulles. *Revue Française d'Oenologie*. 1989;120, 11–17.

[5] Vanrell G, Cabanillas P, Albet S, Canals JM, Arola L, Zamora F. Étude des composes influençant la mousse des cavas. *Revue Française d'Oenologie.* 2002;196, 30- 36.

[6] Kemp B, Condé B, Jégou S, Howell K, Vasserot Y, Marchal R. Chemical compounds and mechanisms involved in the formation and stabilization of foam in sparkling wines. Critical Reviews in *Food Science and Nutrition*. 2019; 59 (13), 2072-2094.
DOI: 10.1080 / 10408398.2018.1437535

[7] Alexandre H, Guilloux-Benatier M. Yeast autolysis in sparkling wine – a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2006;12, 119-127. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x

[8] Cebollero E, Gonzalez R. Induction of autophagy by second-fermentation yeasts during elaboration of sparkling wines. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72, 4121–4127. DOI: 10.1128/AEM.02920-05

[9] Moreno-Arribas MV, Pueyo E, Polo, MC. Peptides in musts and wines. Changes during the manufacture of cavas (sparkling wines). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1996;44 (12), 3783–3788. DOI:10. 1021/jf960307a

[10] Pueyo E, Martínez-Rodríguez A, Polo MC, Santa-María G, Bartolomé B. Release of lipids during yeast autolysis in a model wine System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48(1), 116−122. DOI: 10.1021/jf990036e

[11] Martinez-Rodriguez AJ, Carrascosa AV, Martin-Alvarez JP, Moreno-Arribas MV, Polo MC. Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002;29(6), 314−322. DOI: 10.1038/sj.jim.7000323

[12] Charpentier C, Aussenac J, Charpentier M, Prome JC, Duteurtre B, Feuillat M. Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: Kinetics and potential impact on flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53 (8), 3000-3007. DOI: 10.1021/jf040334y

[13] Martínez-Lapuente L, Guadalupe Z, Ayestaran B, Ortega-Heras M, Perez-Magariño S. Changes in polysaccharide composition during sparkling wine making and aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013; 61(50), 12362–12373. DOI: 10.1021/jf403059p

[14] Martínez-Lapuente L, Guadalupe Z, Ayestarán B, Pérez-Magariño S. Role of major wine constituents in the foam properties of white and rosé sparkling wines. *Food Chemistry*, 2015; 174, 330-338. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.080

[15] Pons-Mercadé P, Giménez P, Vilomara G, Conde M, Cantos A, Rozès N, Ferrer S, Canals JM, Zamora F. (2021). Monitoring yeast autolysis in sparkling wines of nine consecutive vintages produced by the traditional method. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2021. In Press.

[16] Martínez-Rodríguez A, Carrascosa AV, Barcenilla JM, Pozo-Bayón MA, Polo MC. Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. *Food Microbiology*. 2021; 18(2), 183-191.
DOI: 10.1006/fmic.2000.0390

[17] Gawel R, Smith PA, Cicerale S, Keast R. The mouthfeel of white wine. Critical Reviews in *Food Science and Nutrition*. 2018; 58(17), 2939-2956. DOI: 10.1080/10408398.2017.1346584

[18] Marchal A, Marullo P, Moine V, Dubourdieu D. Influence of yeast macromolecules on sweetness in dry wines: role of the *Saccharomyces cerevisiae* protein Hsp12. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59, 2004–2010. DOI: 10.1021/jf103710x

[19] Vilela A, Ines A, Cosme F. Is wine savory? Umami taste in wine. SDRP *Journal of Food Science and Technology*. 2016; 1(3), 100−105. DOI: 10.25177/JFST.1.3.3

[20] Styger G, Prior B, Bauer FF. Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2011: 38, 145–1159. DOI: 10.1007/s10295-011-1018-4

[21] Gallardo-Chacón JJ, Vichi S, Urpí P, López-Tamames E, Buxaderas S. Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine sur lie aging. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 143(1-2), 48–53. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.027

[22] Pons-Mercadé P, Giménez P, Gombau J, Vilomara G, Conde M, Cantos A, Rozès N, Canals JM, Zamora F. Oxygen consumption rate of lees during sparkling wine

(Cava) aging, influence of the aging time. *Food Chemistry.* 2021; 342, 128138. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128238

[23] Fornairon-Bonnefond C, Salmon JM. Impact of oxygen consumption by yeast lees on the autolysis phenomenon during simulation of wine aging on lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(9), 2584–2590. DOI: 10.1021/jf0259819

[24] Kritzinger EC, Bauer FF, du Toit WJ. Role of glutathione in winemaking: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013; 61(2), 269–277. DOI: 10.1021/jf303665z

[25] Pons-Mercadé P. Yeasts autolysis on the manufacture of sparkling wines; Influence of aging time on the release of polysaccharides and proteins and the consumption of oxygen by the lees [thesis]. Tarragona: Universitat Rovira i Virgili; 2021

[26] Ayala F, Echávarri JF, Negueruela AI. A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rosé wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1997; 48, 357-363.

[27] Ayestarán B, Guadalupe Z, León D. Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. In Analytica Chimica Acta. 2004; 513, 29–39. DOI: 10.1016/j.aca.2003.12.012

[28] Canals JM, Arola L, Zamora F. Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1998; 49, 383-388.

[29] Maujean A., Poinsaut P., Dantan H., Brissonnet F. and Cossiez E. (1990) 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 efervescents. Bull de l'OIV. 711-712, 405-426.

[30] Martínez-Lapuente L, Apolinar-Valiente R, Guadalupe Z, Ayestarán B, Pérez-Magariño S, Williams P, Doco T. Influence of grapematurity on complex carbohydrate composition of redsparklingwines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016; 64, 24, 5020–5030. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b00207

[31] Moreno-Arribas V, Pueyo E, Nieto FJ, Martín-Álvarez PJ, Polo MC. Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chemistry*. 2000; 70(3), 309-317. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00088-1

[32] Kemp B, Alexandre H, Robillard B, Marchal R. Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015; 63(1), 19−38. DOI: 10.1021/jf504268u

[33] Catarino S, Madeira M, Monteiro F, Rocha F, Curvelo-Garcia AS, Desousa AB. (2008) Effect of bentonite characteristics on the elemental composition of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56, 158–165. DOI: 10.1021/jf0720180

[34] Martinez-Rodriguez AJ, Polo MC. Effect of the addition of bentonite to the tirage solution on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chemistry*. 2003; 81(3), 383-388.31. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00455-7

[35] Nuñez YP, Carrascosa AV, González R, Polo MC, Martínez-Rodríguez AJ. (2005) Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53, 18, 7232–7237. DOI: 10.1021/jf050191v

[36] Esteruelas M, González-Royo E, Kontoudakis N, Orte A, Cantos A, Canals JM, Zamora F. Influence of grape maturity on the foaming properties of base wines and sparkling wines (Cava). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015; 95(10), 2071-2080. DOI: 10.1002/jsfa.6922

[37] Vanrell G, Canals R, Esteruelas M, Fort, F., Canals, J.M. and Zamora, F. Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chemistry*. 2007; 104, 148−155. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.11.014

[38] Pascual O, Vignault A, Gombau J, Navarro M, Gómez-Alonso S, García-Romero E, Canals JM, Hermosín-Gutíerrez I, Teissedre PL, Zamora F. (2017) Oxygen consumption rates by different oenological tannins in a model wine solution. *Food Chemistry*. 2017; 234, 26-32. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.04.148

[39] Fornairon-Bonnefond C, Camarasa C, Moutounet M, Salmon JM. (2002). New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: A bibliographic review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. 2002; 36(2), 49–69. DOI: 10.20870/oeno-one.2001.35.2.990

[40] Todd B, Fleet GH, Henschke PA. Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: Potential application in sparkling wine production. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2000; 51(1), 65–72.

[41] Valade M, Tribaut-Sohier I, Bunner D, Laurent M, Moncomble D, Tusseau D. (2007). Les apports d'oxygene en vinification et leurs impacts sur les vins: Le cas particulier du Champagne. 2emepartie. *Revue Française d'O-Enologie*. 2007; 222, 17–28.