

## Influencia de la inoculación secuencial con *Torulaspora delbrueckii* / *Saccharomyces cerevisiae* y del empleo de levaduras inactivas sobre las propiedades espumantes del vino base

Elena González- Royo<sup>1</sup>, Mireia Esteruelas<sup>1</sup>, Carlos Suarez<sup>2</sup>, José María Heras<sup>2</sup>, Joan Miquel Canals<sup>1</sup>,  
Fernando Zamora<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain. e-mail :

[fernando.zamora@urv.cat](mailto:fernando.zamora@urv.cat)

<sup>2</sup> Lallemand Península Ibérica. C/ Zurbano, 71. Oficina 6. 28010. Madrid

### Resumen

El objetivo del presente trabajo fue, determinar si la inoculación secuencial con *Torulaspora delbrueckii* / *Saccharomyces cerevisiae* a mostos de la variedad Macabeo así como la suplementación con levaduras inactivas durante la fermentación alcohólica permitía mejorar las características espumantes del vino base.

Los resultados muestran que los vinos obtenidos mediante inoculación secuencial con *Torulaspora delbrueckii* / *Saccharomyces cerevisiae* y los obtenidos mediante suplementación con levaduras inactivas presentaban incrementos significativos en la altura máxima de la espuma (Hm; Mosalux) (50 Y 30% respectivamente). También se observaron modificaciones en la composición coloidal (proteínas y polisacáridos) de los vinos elaborados mediante inoculación secuencial y suplementación con levaduras inactivas respecto de sus controles.

**Palabras claves:** Vino Base, Espuma, *Torulaspora delbrueckii*, levaduras secas inactivas

### Introducción

El comportamiento de la espuma es la primera característica que se observa por el consumidor cuando un vino espumoso se vierte en la copa.[1] Aspectos como el sabor y el aroma de los vinos destinados a la elaboración de grandes vinos espumosos tienen un papel muy importante, pero es la capacidad para formar efervescencia y la persistencia de la espuma, el principal factor que condiciona la calidad de estos vinos. Por esta razón, los elaboradores de vinos espumosos están especialmente interesados en el diseño y/o optimización de procesos de elaboración que permitan obtener vinos base con una mayor capacidad espumante.

Varios estudios han confirmado que las propiedades de la espuma están relacionadas con la composición química del vino: etanol, proteínas, polisacáridos, polifenoles y ácidos orgánicos [1,2,3,4]. Se ha observado que las proteínas ejercen un papel muy importante debido a sus propiedades estructurales que permiten actuar como agentes tensoactivos mejorando la formación de espuma y contribuyendo a la resistencia y elasticidad de la película de burbujas [4]. También los polisacáridos pueden contribuir a las propiedades de formación de espuma de los vinos espumosos [5]. Estudios realizados han mostrado que las glicoproteínas son las principales macromoléculas responsables de la estabilidad de la espuma [6]. En este sentido, las manoproteínas de las levaduras liberadas durante la fermentación y la autólisis se han relacionado también con la mejora de las propiedades espumantes de los vinos espumosos [7]. Muy recientemente, experimentos de reconstitución realizados mediante la adición de diferentes fracciones moleculares asiladas del vino a una solución modelo indicó que existe un efecto sinérgico de los compuestos de alto y bajo peso molecular del vino [8] sobre las propiedades espumantes y que es la fracción que comprende las manoproteínas de levadura [9] la principal responsable.

Recientemente se ha propuesto la inoculación de levaduras no *Saccharomyces* seguida de la inoculación de *Saccharomyces* para reproducir de manera controlada los fenómenos de la fermentación

espontánea. Según ciertos autores esta inoculación secuenciada puede ejercer un efecto muy positivo sobre la calidad de los vinos [12,13]. Por otra parte, cada vez es más común suplementar los mostos con levaduras secas inactivas para enriquecer el vino en polisacáridos [14]. El objetivo del presente trabajo fue el determinar si la inoculación secuencial con *Torulaspóra delbrueckii* / *Saccharomyces cerevisiae* a mostos de la variedad Macabeo así como la suplementación con levaduras inactivas durante la fermentación alcohólica permitía mejorar las características espumantes del vino base.

## Material y Métodos

**Vinificación:** Un mosto de la variedad Macabeo previamente filtrado por un filtro rotativo de vacío se repartió en 15 tanques de acero inoxidable de 100 litros de capacidad. Nueve tanques se inocularon con 25 g/hl la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. Tres de los tanques fueron considerados como control, otros tres se les añadió 50 g/hl de las levaduras secas inactivas Optiwhite y los tres restantes se suplementaron con 50 g/hl de Optimum-White. Otros tres tanques se inocularon con 25 g/hl de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* QA23. Finalmente los tres tanques restantes se inocularon con 25 g/hl de *Torulaspóra delbrueckii* y tres días más tarde con 25 g/hl de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* QA23. Tanto las levaduras secas activas como las inactivas fueron proporcionadas por Lallemad-Inc. (Montreal, Canada). Las fermentaciones se desarrollaron a 16 °C, y una vez finalizadas los vinos se sulfitaron (4 g/hl) y se trasegaron a tanques herméticos donde se realizó la estabilización tartárica.

**Análíticas:** Las proteínas se analizaron por HPLC de acuerdo con la metodología descrita por Canals et al., 1998 [15]. Los polisacáridos se analizaron por HPLC de acuerdo el protocolo de Avestaran et al., 2004 [16]. Las propiedades espumantes, altura máxima (Hm) y altura estable (Hs) de la espuma se determinaron mediante el empleo de un equipo Mosalux empleando la metodología descrita por Maujean et al., 1990 [17].

**Estadística:** Todos los resultados se presentan como la media aritmética  $\pm$  la desviación estándar de tres replicas. La existencia de diferencias significativas entre grupos experimentales se determinó mediante el test ANOVA.

## Resultados y conclusiones.

Las figuras 1 y 2 muestran las propiedades espumantes de los diferentes vinos base.

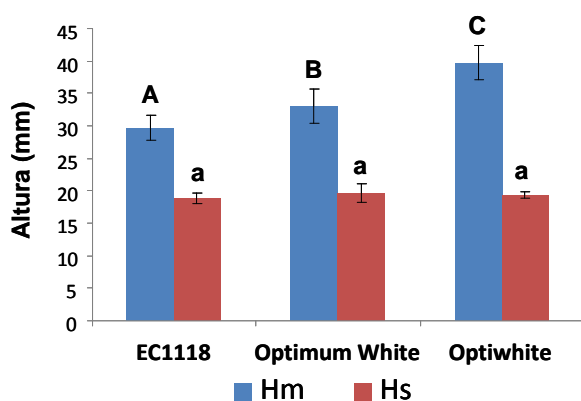


Figura 1. Influencia de las levaduras inactivas sobre los parámetros de la espuma

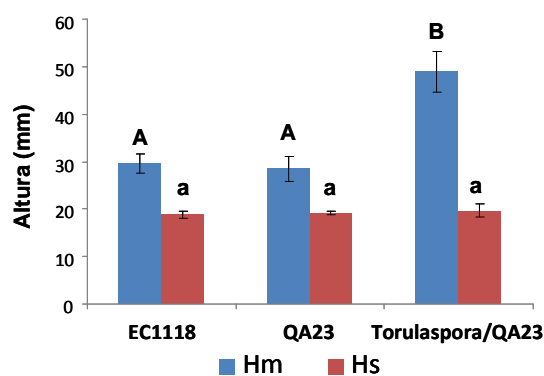


Figura 2. Influencia de la inoculación secuenciada sobre los parámetros de la espuma

En ellas se puede ver claramente que el empleo de ambas levaduras inactivas, así como la inoculación secuencial de *Torulaspóra delbrueckii*/QA23 comportó un incremento significativo de la altura máxima de la espuma (Hm). Por el contrario, no se observaron diferencias en la altura estable para ningún tratamiento.

Las tablas 1 y 2 muestran la concentración en las diferentes fracciones de proteínas de los diferentes vinos obtenidos.

Tabla 1. Influencia de las levaduras inactivas sobre la fracción proteica

[Proteínas] (mg/L)	Control	OptiWhite	Optimum White
F1 (>80KDa)	1,3 ± 0,4 a	5,3 ± 0,5 b	6,3 ± 0,5 b
F2(80-60KDa)	4,1 ± 0,1 a	6,1 ± 0,5 b	7,6 ± 0,4 c
F3(<60KDa)	38,3 ± 3,8 a	53,2 ± 5,9 b	66,6 ± 2,6 c
Total	43,7 ± 3,5 a	64,6 ± 6,9 b	80,5 ± 2,7 c

Tabla 2. Influencia de la inoculación secuenciada sobre la fracción proteica

[Proteínas] (mg/L)	EC1118	QA23	Torulaspora/QA23
F1 (>80KDa)	1,3 ± 0,4 a	1,4 ± 0,1 a	4,1 ± 0,3 b
F2(80-60KDa)	4,1 ± 0,1 a	5,1 ± 0,3 b	5,9 ± 0,4 b
F3(<60KDa)	38,3 ± 3,8 a	49,3 ± 1,1 b	52,7 ± 3,9 b
Total	43,7 ± 3,5 a	55,8 ± 0,9 b	62,8 ± 4,6 b

Los resultados indican que la adición de OptiWhite y sobretodo de Optimun White incrementan de forma significativa la concentración total de proteína así como la de todas las fracciones de diferente masa molecular. Asimismo, se puede ver que la inoculación de QA23 aumentó significativamente las fracciones de 60-80 kDa y la de menos de 60 kDa. Finalmente la inoculación secuencial de *Torulaspora delbrueckii*/QA23 comportó aumentos aún mayores en dichas fracciones y un aumento muy significativo de la fracción de alta masa molecular (> 80 kDa).

Las tablas 3 y 4 muestran la concentración en las diferentes fracciones de polisacáridos de los diferentes vinos obtenidos.

Tabla 3. Influencia de las levaduras inactivas sobre los polisacáridos

[Polisacáridos] (mg/L)	Control	OptiWhite	Optimum White
F1( 164-1700 kDa)	36 ± 1 a	42 ± 2 b	35 ± 1 a
F2( 38- 164 kDa)	53 ± 0 a	56 ± 6 a	39 ± 0 a
F3 (6-38kDa)	33 ± 4 a	68 ± 7 c	45 ± 1 b
F4 (3-6 kDa)	14 ± 5 a	31 ± 3 b	26 ± 2 b
F5 (1-3 kDa)	20 ± 7 a	40 ± 4 b	42 ± 5 b
Total	129 ± 17 a	197 ± 17 b	186 ± 5 b

Tabla 4. Influencia de la inoculación secuenciada sobre los polisacáridos

[Polisacáridos] (mg/L)	EC1118	QA23	Torulaspora/QA23
F1( 164-1700 kDa)	36 ± 1 a	24 ± 6 b	36 ± 1 a
F2( 38- 164 kDa)	53 ± 0 a	42 ± 5 b	52 ± 1 a
F3 (6-38kDa)	33 ± 4 a	53 ± 4 b	75 ± 1 c
F4 (3-6 kDa)	14 ± 5 a	34 ± 7 b	29 ± 4 b
F5 (1-3 kDa)	20 ± 7 a	28 ± 1 a	31 ± 4 a
Total	129 ± 17 a	167 ± 1 b	192 ± 5 c

De forma similar a lo que ocurría con las proteínas, el empleo de ambas levaduras inactivas comportó incrementos significativos de la concentración total de polisacáridos, siendo este incremento significativos en la mayor parte de fracciones de diversa masa molecular. Por su parte, el empleo de QA23 originó algunas diferencias significativas respecto de la inoculación control (EC1118). Específicamente las fracciones de mayor masa molecular (F1 y F2) eran menores mientras que las de masa molecular intermedia (F3 y F4) se incrementaban. En los vinos obtenidos mediante inoculación secuencial se observó un aumento mayor de la concentración de polisacáridos totales que era especialmente alto en el caso de la fracción 4.

Se puede por tanto concluir que tanto la suplementación con levaduras inactivas, como la inoculación secuencial con *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*, pueden ser útiles en la

elaboración de vinos base para Cava ya que permiten mejorar la composición coloidal y sobretodo mejorar significativamente su espumabilidad.

## Bibliografía

- [1] Brissonnet, F. & Maujean, A. 1991. Identification of some foam-active compounds in champagne base wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 97–102.
- [2] Andrés-Lacueva, C.; Gallart, M.; Lopez-Tamames, E. & Lamuela-Raventos, R.M. 1996. Influence of variety and aging on foaming properties of sparkling wine (Cava) 1. *Agric. Food Chem.* 44, 3826–3829.
- [3] Lopez-Barajas, M.; Viu Marco, A.; Lopez-Tamames, E. & Buxaderas, S. 1997. Foaming in grape juices of white varieties. *Agric. Food Chem.* 45, 2526–2529.
- [4] Malvy, J.; Robillard, B. & Duteurtre, B. 1994. Influence of proteins on the foam behavior of champagne wines. *Science des Aliments*, 14, 87–98.
- [5] V. Moreno-Arribas, V.; Pueyo, E.; Nieto, F.J.; Martín-Alvarez, P.J. & Polo, M.C. 2000. Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chemistry*, 70, 309–317
- [6] Senée, B.; Robillard, M. & Vignes-Adler. 1999. Films and foams of champagne wines. *Food Hydrocolloids*, 13, 15–26.
- [7] Nuñez, Y.P.; Carrascosa, A.V.; Gonzalez, R.; Polo, M.C. & Martínez-Rodríguez, A.J. 2005. Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7232–7237
- [8] Coelho, E.; Reis, A.; Domingues, M.R.M.; Rocha, S.M. & Coimbra, M.A. 2011. Synergistic effect of high and low molecular weight molecules in the foamability and foam stability of sparkling wines. *J. Agric. Food Chem.* 59, 3168–3179
- [9] Coelho, E.; Rocha, S.M. & Coimbra, M.A. 2011. Foamability and foam stability of molecular reconstituted model sparkling wines. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 8770–8778
- [10] 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.
- [11] Del Barrio-Galán, R., S. Pérez-Magariño, M. Ortega-Heras, P. Williams, and T. Doco. 2011. 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.
- [12] Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdieu D. 2008 Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol.* 122, 312–20.
- [13] Ciani, M.; Maccarelli, F.; Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. 1997. *World. J. Microv. Biot* 14, 199–203.
- [14] González, E., Urtasun, A., Gil, M., Kontoudakis, K., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M., Zamora, F. (2013) Effect of yeast strain and supplementation with inactive yeast during alcoholic fermentation on wine polysaccharides. *Am. J. Enol. Vitic.*, 64, 268–273.
- [15] Canals, J.M.; Arola, L.; Zamora, F. (1998) Protein Fraction Analysis of Whine by FPLC. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49, 383–388.
- [16] Ayestaran, B.; Guadalupe, Z. & Leon, D. 2004. *Anal. Chim. Acta*, 513, 29. 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.
- [17] Maujean, A.; Poinssaut, P.; Dantan, H.; Brissonnet, F. & 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 effervescents», *Bull de l'OIV* 711-712: 405–426.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen al proyecto CENIT Demeter y a la empresa Lallemand Inc por su financiación.