

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola tècnica superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

---

# **Levaduras inmovilizadas. Efecto en el perfil aromático del cava**



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

Inmaculada Belloch Romero

Tutor: M<sup>a</sup> José García Esparza

Curso: 2015-2016

Convocatoria Julio 2016 (Valencia)

## Resumen

La elaboración del cava supone dos tipos de fermentaciones, principalmente llevadas a cabo por la levadura *S. cerevisiae*. Una vez finalizada la primera fermentación se obtiene el vino base, que se embotella añadiéndole las levaduras seleccionadas y el azúcar para que tenga lugar la segunda fermentación. Durante esta fermentación, parte de la levadura se lisa comunicando al vino nuevas características que afectan al sabor, a la suavidad y al cuerpo del cava. Es en esta etapa donde se forma CO<sub>2</sub> y el cava adquiere la espuma que lo caracteriza. Al final del período de crianza es necesario eliminar la levadura a fin de que el cava tenga un aspecto totalmente limpio, mediante la operación de removido y degüelle.

La utilización de levaduras inmovilizadas permite eliminar la operación de removido y facilita la sedimentación de las lías, además evita el uso de clarificantes en el tiraje.

El objetivo de este trabajo es evaluar cómo afecta el uso de levaduras inmovilizadas en chips de roble y en celulosa sobre el perfil aromático del cava. Para el análisis de los compuestos volátiles se utiliza la técnica de Cromatografía de gases. Se dispone de un total de 9 muestras distintas, todas por triplicado. Se parte de dos levaduras, una comercial y otra ecológica y de dos soportes, chips de roble y celulosa.

Los resultados muestran que el tipo de soporte de inmovilización, así como la levadura utilizada para la toma de espuma, afectan al perfil aromático del cava. En ambas levaduras, comercial DV y ecológica 55A, el tipo de soporte de inmovilización que más favorece al perfil aromático son los chips. En el caso de la levadura comercial DV, los chips producen más cantidad de ésteres y menos de alcoholes y ácidos, viéndose favorecidos los aromas frutales. En la levadura ecológica 55A, los ésteres se encuentran en mayor cantidad cuando se utiliza la celulosa como soporte, pero también aparecieron los alcoholes, cediendo protagonismo a los aromas desagradables, así pues al utilizar chips se mejora el perfil aromático y además se produce más lactonas y más aldehídos.

Por último, en la toma de espuma con las levaduras libre, los cavas fermentados con la levadura ecológica 55A presentaron una mayor cantidad de ésteres, beneficiando al aroma del cava.

Palabras clave: cava, levaduras, aromas

## Abstract

Cava production involves two types of fermentation, mainly carried out by *S. cerevisiae* yeast.

After the first fermentation is finished a base wine is obtained. It is bottled and selected yeasts and sugar are added so that the second fermentation can take place. During this fermentation the yeast is lysed providing the wine with new features that affect flavor, smoothness and body of the cava. It is at this stage where CO<sub>2</sub> is formed and the cava acquires the fizziness that is characteristic of cava. At the end of ageing period it is necessary to remove the yeast in order for the cava to look completely clean, by riddling and disgorging operation.

The use of immobilized yeast allows us to skip the operation and facilitates sedimentation removed lees also spares us the use of clarifying agents in the circulation.

The aim of this study is to evaluate how the use of immobilized yeast in oak chips and cellulose affects the aromatic profile of cava. For the analysis of volatile compounds gas chromatography is used. 9 different samples were analysed, 3 times each. Two types yeasts were used, a commercial one and an ecological one and two mediums were used, oak chips and cellulose.

Results show that both type of immobilization support and yeast used for making foam affect to the cava's flavor profile. On both yeast samples, organic 55 A and commercial DV, the type of immobilizing support that was most favorable for the aromatic profile were the chips. For commercial yeast DV, chips contributed to increased esters production as well as a decrease of alcohol and acids, promoting the fruit flavors.

In organic yeast 55A, esters are found in greater quantity when is used cellulose as a support, but alcohols were also found appeared alcohols, causing unpleasant aromas. When using chips, aromatic profile is improved as well as more lactones and aldehydes are produced.

Finally, when making foam using free yeasts, cava fermented with organic yeast 55A had a higher amount of esters, benefiting the aroma of cava.

Key words: cava, yeast, aromas

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	1-5
<b>2. Objetivos</b> .....	6
<b>3. Material y métodos</b>	
3.1 Microorganismos.....	7
3.2 Inmovilización de las levaduras.....	7
3.2.1 Soportes de inmovilización.....	7
3.2.2 Inmovilización de levaduras mediante liofilización.....	7
3.2.3 Evaluación de la concentración de células viables inmovilizadas.....	7
3.3 Segunda fermentación en cava con células libres e inmovilizadas.....	7
3.3.1 Evaluación del comportamiento de la levadura inmovilizada durante la segunda fermentación.....	8
3.4 Compuestos volátiles.....	8-9
<b>4. Tratamiento estadístico</b> .....	10
<b>5. Resultados y discusión</b>	
5.1 Influencia del tipo de levadura y del soporte de inmovilización sobre el perfil aromático del cava.....	11-16
5.2 Estudio comparativo de las levaduras ensayadas en fermentación libre.....	16-17
5.3 Valor olfativo activo (OAV) de los distintos componentes volátiles presentes en los cavas estudiados.....	18-21
5.4 Análisis de los componentes principales (PCA).....	21-23
<b>6. Conclusiones</b> .....	24
<b>7. Bibliografía</b> .....	25-28

## 1. INTRODUCCIÓN

El cava es un vino espumoso natural de calidad obtenido a partir de la segunda fermentación de un vino, y al que se le han añadido azúcares y levaduras. La “Región del Cava” está formada por un total de 159 municipios de las provincias de Barcelona (63), Tarragona (52), Lleida (12), Girona (5), La Rioja (18), Álava (3), Zaragoza (2), Navarra (2), Valencia (1) y Badajoz (1), que en su conjunto configuran la zona de producción delimitada del Cava y, por tanto, son los únicos con plena capacidad legal para producir este tipo de vino espumoso y comercializarlo bajo este nombre.

En la elaboración del cava, la vendimia se puede realizar a mano o a máquina. Si se vendimia a máquina, es muy importante controlar la temperatura, por lo que cada vez más se realiza de noche. Una vez descargada la uva, la pasta entra en el interior de la prensa en la cual se realizarán diferentes presiones a fin de obtener la primera fracción del mosto flor.

El mosto flor es el mosto de mayor calidad, este se enfría y se introduce en los tanques de acero inoxidable para realizar la clarificación o desfangado que consiste en separar las partículas sólidas que hayan podido pasar al mosto flor. Una vez la fracción del mosto está limpia, se adicionan levaduras seleccionadas para iniciar la fermentación. Durante este proceso, las levaduras transforman el azúcar natural de la uva en alcohol y anhídrido carbónico obteniendo los vinos base cava monovarietales. Según el Reglamento del Cava, de 1 kg de uva, solo se pueden obtener hasta 0,67 litros de vino base Cava.

Posteriormente se realiza la clarificación, que consiste en eliminar el aspecto turbio que provoca la presencia de partículas en suspensión procedentes de la fermentación para conseguir un vino completamente limpio y libre de impurezas. Para su mejor conservación y mantener sus cualidades a lo largo del tiempo, el vino se estabiliza en frío antes de la segunda fermentación.

A continuación se realiza el tiraje, operación que consiste en el llenado de las botellas con vino base y el denominado “licor de tiraje”, compuesto de levaduras y azúcar. Estas provocarán la segunda fermentación dentro de la misma botella. Las botellas pueden ser tapadas con un obturador y chapa o bien con un tapón de corcho y grapa (especialmente para los cavas de larga crianza). Estas botellas se depositan en la cava (en oscuridad) donde se colocan en posición de “rima” (en horizontal).

Al finalizar la segunda fermentación, la levadura muere y se deposita en el fondo de la botella, iniciando el proceso de crianza, que es el tiempo de contacto de las levaduras con el Cava. Este tiempo es de un mínimo de 9 meses, sin existir un límite máximo. A partir de los 15 meses de crianza, se produce un fenómeno, es el denominado proceso de “autólisis” y supone que las células de levadura que conforman las lías empiezan a ceder componentes al cava, aportando los denominados “aromas terciarios”, tales como aromas a frutos secos, tostados, bollería, toffee, caramelo... Este proceso aporta mayor complejidad al cava y es característico de los cavas de mayor crianza, como los Cavas Reserva y Gran Reserva.

Finalizada la crianza del cava se realiza el removido, que consiste en desplazar los sedimentos (restos de levaduras) causados por la segunda fermentación, hasta el cuello de la botella. El removido puede realizarse de forma manual (pupitres) o mecánica (giropalets).

Una vez realizado el degüelle, se añade el licor de expedición. El licor de expedición puede estar formado de azúcares, vinos base y en función del cavista, de distintos destilados vínicos (vinos añejados en barricas, etc.) que aportan al cava un bouquet particular. Una vez

introducido el licor de expedición, se tapa la botella con el corcho definitivo, se añade el bozal, se viste con cápsula, etiquetas y el sello de control para su expedición final.

El perfil volátil de los vinos es muy complejo ya que está compuesto por una gran cantidad de moléculas. Es importante seguir unos criterios de selección de levaduras adecuados, así como conocer las diferencias de producción de volátiles entre cepas de levaduras distintas para así poder obtener el vino deseado. Los principales componentes que forman las levaduras son aldehídos, alcoholes superiores, ácidos grasos y sus ésteres, y compuestos fenólicos de molécula sencilla. (Dizy, 1983).

La variedad de uva, las levaduras responsables de llevar a cabo la primera y segunda fermentación y el tiempo de envejecimiento son algunos de los factores que más influyen en el perfil aromático del cava (Bosch-Fusté et al., 2007).

La principal característica de las levaduras seleccionadas para la primera fermentación es que tienen que ser capaces de convertir el azúcar presente en el mosto en etanol en la mayor brevedad posible. Sin embargo, el objetivo de las levaduras que se añaden en el licor de tiraje es conseguir una uniformidad en el producto final, así como unas características de sabor, aroma y cuerpo determinadas. La presencia de ésteres le dará notas frutales al vino, sobre todo los ácidos grasos de cadena corta. Sin embargo, si los alcoholes superiores o los fenoles volátiles se encuentran en altas concentraciones pueden llegar a provocar olores desagradables (Suárez-Lepe, 2002). Algunos de los criterios a seguir para la selección de levaduras en relación al perfil volátil de los vinos son producciones bajas de alcoholes isoamílicos, acetato de etilo y metanol.

Los aromas presentes en el vino han sido clasificados por numerosos autores a lo largo del tiempo en varios grupos, atendiendo a su origen (Guadalupe, 2008):

-Aromas procedentes de la uva: influirá la variedad de la uva utilizada. (Hernández-Orte et al., 2002)

-Aromas secundarios de la uva: son los aromas que se desarrollan durante la transformación de la uva en mosto.

-Aromas fermentativos: los que tienen lugar durante la fermentación. El principal compuesto que procede de la fermentación maloláctica es el diacetal, que le confiere al vino un aroma a mantequilla (Nielsen y Richelieu, 1999). Otros compuestos que proceden de la fermentación son los ésteres. Se forman a partir de la actividad metabólica de azúcares, lípidos y acetyl-CoA. Los ácidos orgánicos también forman parte de este grupo, se distinguen los ácidos grasos de cadena corta (C2-C6), que provienen directamente de la fermentación, y los de cadena larga (C8-C14) que resultan de la síntesis de los lípidos de la levadura. Todos ellos le dan un aroma desagradable al vino, como a rancio, leche agria y vinagre. Por último, otros compuestos producto de la fermentación son los alcoholes superiores, que se forman a partir del metabolismo de los lípidos. Se diferencian dos tipos: los alifáticos (propanol, alcohol isoamílico e isobutanol) y aromáticos como el 2-feniletanol, éste, se encuentra en la uva en pequeñas cantidades, y es durante la fermentación cuando aumenta su concentración en el cava formándose a partir de la 2-fenilalanina. (Lasanta, 2009).

-Aromas de maduración: son los aromas que adquiere el vino durante la etapa de crianza, bien en la bodega o en la botella.

Como ya se ha comentado, es durante el envejecimiento del cava cuando se produce la autólisis de las levaduras. Es un proceso lento asociado a la muerte celular, donde los

enzimas hidrolíticas liberan al medio péptidos, nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos, etc. que pasan a formar parte de la composición del cava. Los factores que favorecen la autólisis son las temperaturas elevadas, pH, contenido en etanol y la cepa de levadura. (Alexandre *et al.*, 2006).

Origin	Compound type	Proven or potential impact on sparkling wine	References
Cell content	Nucleoside	Flavouring agent	Leroy et al. (1990) Charpentier et al. (2005) Courtis et al. (1998)
	Nucleotide		
	Amino acid	Aroma precursors	
	Peptide		
	Protein	Foam quality	
Protein	Sweet and bitter taste		
Cell wall	Protein	Sweet and bitter taste	Polo et al. (1992)
	Protein	Foam quality	
	Lipids	Foam quality	Gallart et al. (2002)
Cell wall	Glucan	Foam quality	Andres-Lacueva et al. (1997) Moreno-Arribas et al. (2000)
	Mannoprotein	Increase in mouthfeel	

**Figura 1. El origen de los componentes liberados durante la autólisis de las levaduras y su impacto en el cava. Fuente: Alexandre et al., 2006**

En la Figura 1, se muestra la influencia de los compuestos liberados durante la autólisis en las características organolépticas del cava. Como puede observarse, los componentes más comunes que se liberan al medio durante la autólisis de las levaduras son compuestos nitrogenados (aminoácidos), polisacáridos (glucanos y manoproteínas de la pared celular se degradan en glucosa y manosa), ácidos grasos (formados a partir de la degradación de lípidos, pueden influir en la formación de ésteres, aldehídos y otros componentes volátiles), vitaminas, y otros compuestos volátiles (ésteres, terpenos, alcoholes superiores, entre otros) (Dharmadhikari, 1995). Estos compuestos provocan cambios significativos en la calidad sensorial del cava (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2001).

La pared celular de *Saccharomyces* está compuesta de manoproteínas (polisacáridos de alto peso molecular conjugados con proteínas) formando una red junto con fibras de glucanos y quitina (Pretorius, 2000). En su ruptura, durante el proceso de autólisis que tiene lugar después de la muerte celular, está involucrada la acción de las  $\beta$ -glucanasas que hidrolizan el enlace  $\beta$ -O-glucosídico de las cadenas de  $\beta$ -glucano, dando lugar a la liberación de glucosa y oligosacáridos (Dubourdiou et al., 1981). Como consecuencia de la ruptura de la pared celular varios compuestos citoplasmáticos y parietales se liberan en el vino espumoso, que pueden modificar sus propiedades organolépticas y espumantes con efectos positivos sobre las características del producto (Alexandre et al., 2006; Pozo-Bayón *et al.*, 2009).

Así pues, las levaduras utilizadas en la segunda fermentación del cava, influyen notablemente en la calidad del producto final, en su sabor, color y aroma. Dependiendo del uso de la cepa de levadura, variará la velocidad de la fermentación, la naturaleza y cantidad de los productos secundarios que se forman durante la fermentación alcohólica, así como los compuestos cedidos por la pared celular de las levaduras (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

En los últimos años, en el ámbito científico ha ido en aumento el interés por el estudio de la inmovilización de células y levaduras, debido a la gran cantidad de ventajas, tanto técnicas como económicas, que conlleva en cuanto a la fermentación.

Karel et al., (1985) definieron este término como “el confinamiento físico o localización de

las células intactas a cierta región del espacio con la preservación de alguna actividad catalítica”

Según Fajardo-Ochoa et al., (2011) el término inmovilización de células y enzimas se refiere a células y enzimas físicamente confinadas o localizadas en una cierta región definida en el espacio reteniendo sus propiedades y actividades catalíticas. Asimismo, dependiendo del tipo de inmovilización tanto las células como las enzimas pueden ser inmovilizadas de forma permanente o temporal para ser utilizadas repetida y continuamente en diversos procesos químicos.

Suárez-Lepe e Iñigo-Leal (2004) definen las levaduras inmovilizadas como “biocatalizadores localizados físicamente en un espacio definido, de tal manera que se pueden emplear de forma repetitiva y continua, conservándose su capacidad metabólica”.

Algunas de las ventajas que supone el uso de levaduras inmovilizadas son una realización viable de procesos continuos, un aumento del rendimiento de la fermentación y una estabilidad celular (Margaritis and Merchant, 1984; Stewart and Russel, 1986).

En el proceso de elaboración del cava, una de las grandes ventajas de esta técnica es la de suprimir la etapa de removido durante la elaboración, puesto que la clarificación es más rápida y las levaduras sedimentan antes. Esto supone un gran ahorro económico, así como un menor tiempo de elaboración y menos espacio de almacenamiento en bodega. Además, mejora la fermentación bajo las condiciones de alta presión, baja temperatura, y contenido en etanol. Sin embargo, una posible desventaja de la inmovilización de las levaduras es la fuga de las células del soporte, quedando en suspensión en el cava y anulando todas las ventajas anteriores (Tataridis et al., 2005).

Estudios realizados inmovilizando levaduras en perlas de alginato, mostraron algunas fugas de levaduras debido a un crecimiento celular en el interior de las perlas, ocasionado por la baja concentración de levaduras en su interior, liberando CO<sub>2</sub> en grandes cantidades que provocaron erupciones en la superficie de la perla (Godia *et al.*, 1991). Otro factor que puede provocar la ruptura de las perlas es la temperatura. Una posible solución a esta fuga de células es la propuesta por Park and Chang (2000) en la que se inmovilizan las células en perlas de alginato de 2mm con  $2 \cdot 10^9$  células/mL de gel.

Los soportes de inmovilización deben seleccionarse teniendo en cuenta ciertas características que deben cumplir, como ser de uso alimentario, económicos, y que sean capaces de soportar las condiciones de temperatura, pH, presión y contenido en etanol a las que van a ser expuestos (Bakoyianis et al., 1996; Bardi y Koutinas, 1994; Fumi et al., 1987; Shimobayashi y Tominaga, 1986).

Existen varios métodos de inmovilización de levaduras (Figura 2), que pueden dividirse en cuatro modelos (Pilkington et al., 1998):

a) Inmovilización en la superficie de un soporte sólido: las células se adhieren a la superficie del sólido gracias a las fuerzas electrostáticas o a la unión covalente entre la membrana celular y el soporte. (Kourkoutas et al., 2004). Algunos ejemplos de soportes sólidos utilizados son los materiales celulósicos como DEAE-celulosa (dietilaminoetil-celulosa), madera y serrín, materiales inorgánicos, como por ejemplo montmorillonita (mineral del grupo de los silicatos), porcelana y vidrio poroso. (Norton y D’Amore, 1994; Navarro y Durand, 1977)

b) “Atrapamiento” dentro de una matriz porosa: este atrapamiento se puede realizar

de dos maneras: una es que las células van penetrando poco a poco en la matriz porosa hasta que ésta está obstruida por la presencia de las células, o que un cultivo celular forme el material poroso. Ejemplos de este tipo son el atrapamiento de células en geles de polisacáridos como alginatos, k-carragenina, agar, quitosano o matrices poliméricas como gelatina, colágeno y alcohol polivinílico (Norton y D'Amore, 1994). El crecimiento celular en la matriz porosa dependerá de la difusividad impuesta por la porosidad del material.

c) Floculación de células: agregación de células para formar grandes unidades. Los hongos, mohos y células vegetales son los que mayor habilidad presentan para agregarse.

d) Células contenidas detrás de una barrera: este método se puede llevar a cabo de tres formas distintas: mediante el uso de un filtro de membrana microporosa, mediante el atrapamiento de células en microcápsulas o por la inmovilización celular en una superficie de interacción entre dos líquidos inmiscibles. Un ejemplo del primer método es el conocido como "Millispark", donde las levaduras van contenidas en el interior de un cartucho.

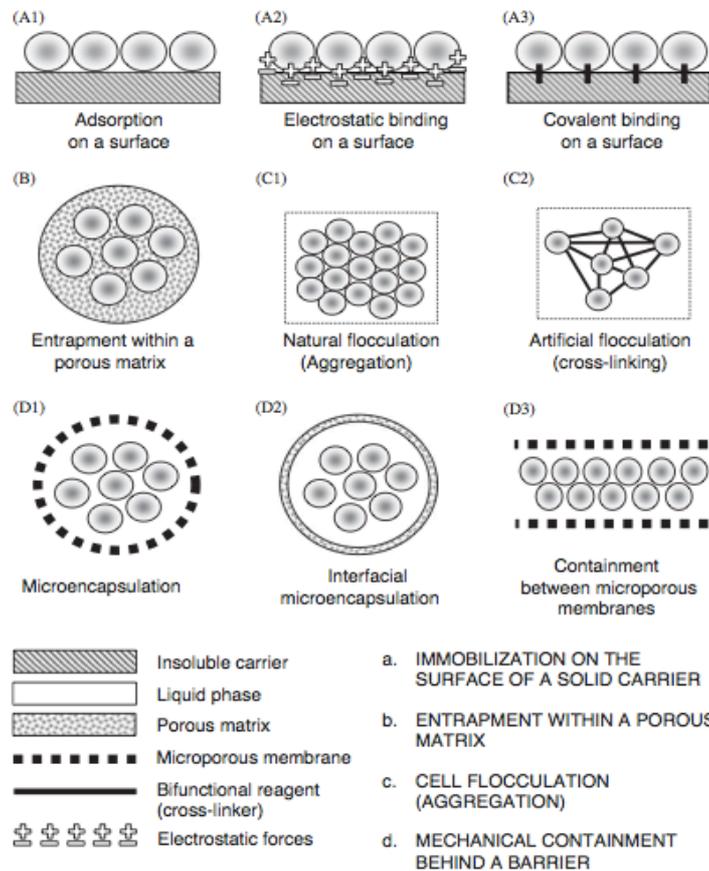


Figura 2. Tipos de inmovilización de levaduras. (A) Inmovilización de las levaduras en un soporte sólido: A1: Adsorción en la superficie. A2: Unión por las fuerzas electrostáticas. A3: Unión por enlaces covalentes. (B) Atrapamiento dentro de una matriz porosa. (C) Floculación de células: C1: Floculación natural. C2: Floculación artificial (entrecruzamiento). (D) Células contenidas detrás de una barrera: D1: Microencapsulación. D2: Microencapsulación interfacial. D3: Contenidas entre membranas microporosas. Fuente: Kourkoutas et al., 2004

## 2. OBJETIVOS

El proceso de removido de las botellas, mediante giropalés y/o pupitres, es efectivo, aunque también exige tiempo, espacio físico importante en la bodega e inversión económica. La fase de removido dura entre cuatro y cinco días si se usan giropalés, y hasta una semana si se emplea el tradicional sistema de pupitres. La utilización industrial de levaduras inmovilizadas para la segunda fermentación por el método tradicional puede reducir y simplificar la etapa de removido y el proceso de degüelle.

El empleo de levaduras inmovilizadas reduce los requerimientos de espacio en cava al menos a la mitad y disminuye el coste de la etapa de removido en un 80%. El método de inmovilización es un sistema totalmente orgánico y natural. La unión de las levaduras con el medio que actúa de soporte es un proceso no forzado, por lo que la actividad catalítica de las levaduras no sufre ningún tipo de alteración. Estudios previos demuestran que el tiempo de fermentación no resulta afectado: no existen diferencias significativas entre utilizar levaduras libres o inmovilizadas.

Además, el hecho de no tener que utilizar bentonita para facilitar el aclareo hace que la calidad de la espuma no se vea afectada, sin duda otra de las ventajas de este método que promete, entre otras cosas, prescindir del material que se necesita para la fase de removido y que ocupa demasiado espacio en las cavas, anular casi toda la fase de aclareo, reducir parcialmente el tiempo de elaboración del cava y acelerar la dinámica comercial del producto, si así se desea. Esto puede ser útil en el caso de cavas jóvenes.

El objetivo del presente trabajo es estudiar cómo afecta la utilización de levaduras inmovilizadas en la segunda fermentación del cava sobre su composición aromática. Para ello se ha utilizado una levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae* DV) y otra ecológica (*Saccharomyces cerevisiae* Enolab 55a). Como soporte de inmovilización se utilizó chips de roble de la Península Ibérica (*Quercus pirenaica*) sin tostar (Spirit NATURE, Agrovin S.A.) y Celulosa (Radicel 200, Agrovin, S.A.).

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Microorganismos**

Para el estudio se han utilizado las cepas *Saccharomyces cerevisiae* Enolab 55A (una levadura de origen ecológico) y *Saccharomyces cerevisiae* DV de origen comercial para la segunda fermentación del cava.

#### **3.2 Inmovilización de las levaduras**

##### **3.2.1 Soportes de inmovilización**

Como soporte de inmovilización se utilizó chips de roble de la Península Ibérica (*Quercus prenaica*) sin tostar (Spirit NATURE, Agrovin S.A.) y Celulosa (Radical 200, Agrovin, S.A)

##### **3.2.2 Inmovilización de levadura mediante liofilización**

Se cultivó las levaduras enológicas en medio de cultivo GPY líquido hasta alcanzar una concentración de  $2 \times 10^9$  UFC/mL. Se centrifugó el cultivo a 8000 rpm durante 15 min (Heraeus Multifuge 1 S-R) y se eliminó el sobrenadante. Se realizó la incubación en agitación de una mezcla compuesta por el 7% de biomasa celular, 15% chips de roble/celulosa y 78% de crioprotector durante 30 min para promover la adherencia de las levaduras al soporte. A continuación se realizó una mezcla de almidón en agua al 8% y se calienta a 90°C hasta conseguir una consistencia de gel, cuando la temperatura bajó hasta 45°C se añadió a la mezcla el inmovilizado. Seguidamente se congeló el inmovilizado y se liofilizó. El cultivo iniciador liofilizado se conservó a 4°C en oscuridad y al abrigo del aire. La inmovilización de la levadura se comprobó mediante microscopía electrónica (JSM-6300 scanning electron microscope).

##### **3.2.3 Evaluación de la concentración de células viables inmovilizadas**

En primer lugar se realizó un recuento de células viables por gramo de biomasa obtenida (UFC/g) (tras su cultivo en GPY y centrifugación) mediante siembra de diluciones seriadas en placas de GPYA. Teniendo en cuenta el peso total húmedo obtenido al incluir el soporte de inmovilización y almidón se calculó el número de células por gramo de inmovilizado. Tras la liofilización o secado se calculó el porcentaje de células viables y células muertas mediante el kit LIVE/DEAD BacLight bacterial Viability Kit (Invitrogen). Se observaron las muestras a 100X con aceite de inmersión en un microscopio de fluorescencia (Leica).

#### **3.3 Segunda fermentación en cava con células libres e inmovilizadas**

Se repartió el vino base (Macabeo y Chardonnay, ASv= 11%) en botellas de cava transparentes, al que se le añadió licor de tiraje (12 g/L de glucosa y 12 g/L de fructosa). Las botellas se inocularon con las levaduras inmovilizadas en chips de roble/celulosa (1 g/L que correspondía aproximadamente a  $2 \times 10^6$  UFC/mL) o con un cultivo de células libres ( $2 \times 10^6$  UFC/mL) y se realizó una crianza de 9 meses en botella. Los experimentos se realizaron por triplicado. El consumo de azúcares y la formación de etanol durante la fermentación se analizó mediante un equipo de HPLC (Agilent serie 1200), AMINEX HPX-87H (BIORAD). La fase móvil consistió en una solución de 0.75 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85%. La formación de compuestos aromáticos se realizó mediante un equipo cromatografía de gases.

### 3.3.1 Evaluación del comportamiento de la levadura inmovilizada durante la segunda fermentación del cava

Con el fin de comprobar la efectividad del proceso y del producto desarrollado, se inoculó el cultivo de levadura inmovilizada en chips de roble/celulosa en el vino base y se comparó con la inoculación de células libres. La fermentación se desarrolló consumiéndose los azúcares en aproximadamente 60 días y aumentando el grado alcohólico en 1.5%.

Durante los 9 meses de crianza en la botella, las levaduras inmovilizadas se depositaron sin ayuda de adyuvantes como la bentonita. En el removido todos los restos de levadura inmovilizadas se situaron en el cuello de la botella lo que permitió un correcto degüelle. Tras el degüelle, el cava ya listo para ser consumido, presentó un aspecto transparente y sin restos del cultivo iniciador inmovilizado. Se analizaron un total de 9 muestras de cava distintas, todas por triplicado. Para la segunda fermentación en botella se añadieron tres tipos de levaduras: DV Comercial, 55 A ecológica y DV Bodega (Control levadura comercial inoculada por la bodega).

En la Tabla 1 aparecen los 9 cavas elaborados con las diferentes levaduras y sistemas de inmovilización. Todos los cavas se elaboraron por triplicado.

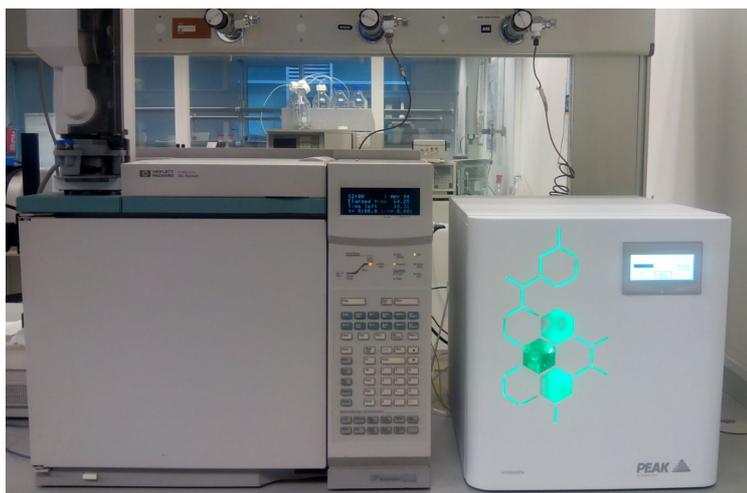
LEVADURA	INMOVILIZACION
DV comercial	Libre
DV comercial	Chips
DV comercial	Celulosa
55 A ecológica	Libre
55 A ecológica	Chips
55 A ecológica	Celulosa
Bodega	Libre
Bodega	Chips
Bodega	Celulosa

Tabla 1. Muestras de Cava elaboradas con las distintas levaduras y el soporte de inmovilización utilizado.

### 3.4 Compuestos volátiles

Para la determinación de los compuestos volátiles en los cava elaborados se utilizó un Cromatógrafo de gases HP-6890 dotado de detector de ionización de llama, equipado con una columna capilar HP-INNOWax (Crosslinked Polyethylene Glycol) de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y como gas portador H<sub>2</sub>.

Las condiciones de trabajo fueron: temperatura del inyector y detector de 300°C, la relación Split de 1:75, que es la cantidad de muestra que se va a introducir en la columna. El flujo de hidrógeno de 40 mL/min, y el flujo de aire de 450 mL/min, presión de nitrógeno en cabeza de inyector de 15 p.s.i.



**Figura 3. Cromatógrafo de gases con generador de hidrógeno**

La metodología utilizada para la extracción de los componentes volátiles del cava fue la propuesta por Ortega et al., (2001) con las modificaciones especificadas por Hernández-Orte et al., (2014).

Para la preparación de las muestras se llevó a cabo el siguiente método:

- 4.05 gramos de sulfato de amonio
- 2.7 mL de vino (cava)
- 6.3 mL de agua miliQ
- 0.25 mL diclorometano
- 20  $\mu$ L del patrón interno (2-butanol, 4-metil-2-pentanol y 2-octanol en 100 mL de etanol)
- Se prepararon las muestras en tubos de plástico de 15 mL con tapón de rosca y se agitaron con un agitador horizontal con un baño con agua a 15 °C durante 120 minutos a 75 rpm.

Tras la agitación, se centrifugaron las muestras. La centrifugación, según Ortega et al. (2001), se realizaba a 2500 rpm durante 10 minutos, pero, tras varios ensayos en el laboratorio y atendiendo a las características de la centrifuga se modificaron dichos parámetros: se aumentaron las rpm a 4000 y el tiempo a 15 minutos. De esta forma, se observó que la separación de las fases en las muestras mejoraba considerablemente y se facilitaba así la separación del disolvente (diclorometano).

Una vez finalizada la centrifugación de los tubos y separadas eficazmente las dos fases, se extrajo el diclorometano del fondo del tubo con una jeringuilla de vidrio de 1 mL y se introdujo en un vial.

De cada muestra se realizaron dos extracciones y de cada una de ellas se realizaron dos determinaciones cromatográficas.

#### **4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en el cromatógrafo de gases se realizó con el programa STATGRAPHICS Plus 5.1. Para ello, se hizo un análisis de la varianza (ANOVA) para ver si había diferencias significativas entre los diferentes soportes de inmovilización utilizados para los dos tipos de levaduras.

Para precisar entre qué factores existen diferencias significativas (levaduras o soportes de inmovilización) se establecieron intervalos LSD ("Least Significant Difference") con niveles de significancia del 95% ( $p < 0,05$ ).

Al comparar los resultados se indican con una misma letra los valores que no son significativamente diferentes y, con una letra distinta en caso contrario.

El análisis de Componentes Principales (PCA) también fue realizado mediante el programa Statgraphics 5.1.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Influencia del tipo de levadura y del soporte de inmovilización sobre el perfil aromático del cava.

El metabolismo de las levaduras produce habitualmente alcoholes superiores, aldehídos, ácidos grasos y ésteres, compuestos azufrados, e incluso compuestos fenólicos de molécula sencilla (Dizy, 1983), y algunas cepas son capaces de formar terpenos (Schreier, 1984). Su fisiología está lógicamente condicionada por los agentes fisicoquímicos durante la fermentación (Soumalainen *et al.*, 1979), dependiendo también de sus características genéticas (Soles *et al.*, 1982; Ciolfi y Di Stefano, 1983). Estos compuestos aparecen principalmente como productos secundarios durante la fermentación gliceropirúvica, particularmente los alcoholes, ésteres y ácidos volátiles, lo que confiere a las levaduras un papel importante en el aroma del vino. Los alcoholes y los ésteres son los más importantes cuantitativamente. Su impacto en el aroma no es el mismo. Los alcoholes son compuestos que individualmente no presentan olor marcado, pero cuando están diluidos refuerzan el aroma. Los ésteres contribuyen fuertemente al aroma frutal de vinos jóvenes, principalmente los ésteres de ácidos grasos de cadena corta.

Los resultados del análisis ANOVA de los compuestos aromáticos con los distintos factores: tipo de levadura (Comercial DV y Ecológica 55A) y soporte de inmovilización (chips y celulosa) se muestran en las Tablas 2 y 3. Como la interacción entre los dos factores es significativa para la mayoría de compuestos estudiados, se ha analizado el efecto de la inmovilización para cada levadura por separado.

Se han determinado 32 compuestos volátiles en los cavas cuya segunda fermentación se ha realizado por el sistema tradicional en el cual las levaduras están libres, y con levaduras inmovilizadas en dos soportes, chips de madera y celulosa, para determinar si la inmovilización y el tipo de soporte influye en la concentración de volátiles en el cava.

Como se aprecia en las Tablas 2 y 3, la inmovilización de las levaduras para la toma de espuma del cava afecta significativamente a la concentración de 20 de los compuestos volátiles analizados cuando se utiliza la levadura comercial DV, mientras que en el caso de la levadura Ecológica 55A son 27 los compuestos que se ven afectados significativamente.

Cabe destacar que al inmovilizar las levaduras con los chips y la celulosa, algunos compuestos volátiles están en concentraciones tan bajas que no son detectados con la metodología utilizada, mientras que están presentes en las muestras fermentadas con la levadura libre. Es el caso del benzaldehído y el hexanoato de etilo cuando se utiliza la levadura comercial DV (Tabla 2). Ambos compuestos son descriptores aromáticos agradables (almendra y frutal), por lo tanto, en este caso, al inmovilizar la levadura comercial puede verse afectada la calidad organoléptica del cava.

En los cavas fermentados con la levadura ecológica (Tabla3) ocurre lo mismo con cis-3-hexenol. Este, es citado por muchos autores como un componente negativo del aroma (Swiegers *et al.*, 2005), por lo que si al inmovilizar la levadura ecológica disminuye su concentración, se mejoraría el perfil aromático del cava.

Por el contrario, existen algunos compuestos que en la levadura libre no se detectan y cuando ésta se inmoviliza sí. Es el caso del ácido isobutírico y el cis-3-hexenol en los cavas fermentados con la levadura comercial DV, y el hexanoato de etilo con la levadura ecológica. Los dos primeros, son responsables de aromas desagradables en el cava,

mientras que el último, el hexanoato de etilo, le confiere un aroma frutal, a manzana y plátano.

Otro aspecto importante es la diferencia que hay al utilizar chips o celulosa. Con la levadura comercial, el isovalerato de etilo no se detecta al utilizar celulosa para inmovilizar, en cambio, este compuesto está presente en la inmovilización con chips, aportando notas frutales.

El hexanoato de etilo se encuentra en los cavas fermentados con la levadura ecológica inmovilizada con chips no con celulosa, y lo mismo ocurre con el ácido isobutírico y la inmovilización con celulosa. El acetato de isobutilo y el 2,3-butanodiol no se detectan con la levadura inmovilizada con chips pero sí con celulosa.

Los resultados muestran que la inmovilización y el tipo de soporte afecta al perfil aromático de los cavas y este efecto es diferente dependiendo de la levadura utilizada en la segunda fermentación. Para analizar mejor el efecto de la inmovilización, se ha realizado un estudio atendiendo a las diferentes familias de compuestos aromáticos (Figuras 4, 5, 6 y 7).

Como muestran las Figuras 4 y 5, los cavas fermentados con la levadura comercial DV, cuando están inmovilizadas producen más ésteres, ácidos y alcoholes. Es conveniente que las levaduras produzcan una mayor cantidad de ésteres y acetatos ya que confieren al vino un sabor y aroma afrutado, y, una menor cantidad de alcoholes superiores porque contribuyen negativamente al aroma. (Pérez-Coello et al., 1999; Ubeda Iranzo et al., 2000; Mingorance-Cazorla et al., 2003).

En la Figura 4, se observa que en el grupo de los aldehídos, es la levadura con chips la que menos cantidad produce. Respecto a las lactonas, son los chips los que producen mayor cantidad, y la celulosa la que menos. Las lactonas están asociadas a aromas dulces en los vinos, a caramelo y a melocotón.

Tabla 2. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos aromáticos del cava fermentado con la levadura Comercial DV en función del soporte de inmovilización (mg/L).

LEVADURA	Comercial DV		
	LIBRE	CHIPS	CELULOSA
<b>INMOVILIZACIÓN</b>			
Diacetal	0,0978 ± 0,058b	0,0130 ± 0,002a	0,0685 ± 0,090ab
Acetaldehido	0,1847 ± 0,078a	0,1894 ± 0,084a	0,2357 ± 0,092a
5 metilfurfural	0,1848 ± 0,087a	0,2106 ± 0,044a	0,2250 ± 0,036a
Benzaldehido	0,0357 ± 0,0056b	nd	nd
<b>TOTAL ALDEHÍDOS</b>	0,5030	0,4130	0,5292
Butirato etilo	0,0736 ± 0,016a	0,0663 ± 0,022a	0,0820 ± 0,018a
Hexanoato etilo	0,1002 ± 0,0063b	nd	nd
Octanoato etilo	0,3357 ± 0,014a	0,4365 ± 0,0242a	0,4220 ± 0,045a
Decanoato de etilo	0,4965 ± 0,063a	0,5478 ± 0,022a	0,6128 ± 0,225a
Isovalerato etilo	0,0566 ± 0,0003a	0,0586 ± 0,091a	nd
Acetato metilo	0,0510 ± 0,012a	0,0421 ± 0,007a	0,0615 ± 0,028a
Acetato isobutilo	0,0287 ± 0,007a	0,0322 ± 0,009a	0,0226 ± 0,015a
Acetato hexilo	0,2588 ± 0,0653a	0,2665 ± 0,0276a	0,2247 ± 0,030a
Succinato de dietilo	0,9535 ± 0,181a	1,2380 ± 0,173a	2,2030 ± 1,124b
Lactato etilo	34,2242 ± 8,0167a	38,0797 ± 2,6611a	35,2336 ± 5,766a
Dietil glutarato	0,0307 ± 0,017a	0,0284 ± 0,004a	0,0589 ± 0,025b
Acetato etilo	0,1348 ± 0,045b	0,1006 ± 0,015ab	0,0838 ± 0,032a
2 feniletil acetato	0,2089 ± 0,089b	0,1061 ± 0,023a	0,1553 ± 0,051ab
<b>TOTAL ÉSTERES</b>	36,9532	41,0028	39,1602
Ác. Hexanoico	2,1794 ± 0,493a	2,1953 ± 0,169a	3,0602 ± 1,030b
Ác. Octanoico	3,9408 ± 0,944a	3,9057 ± 0,316a	6,5348 ± 3,444b
Ác. Isobutirico	nd	0,1219 ± 0,009c	0,0144 ± 0,001b
Ác. butirico	0,1554 ± 0,027a	0,1687 ± 0,052a	0,1551 ± 0,026a
Ác. Isopentanoico	0,1847 ± 0,033b	0,1565 ± 0,011a	0,1372 ± 0,015a
Ác. 2 etil hexanoico	0,0972 ± 0,010c	0,0768 ± 0,004b	0,0073 ± 0,001a
Ác. Decanoico	0,6131 ± 0,130a	0,6037 ± 0,061a	1,0953 ± 0,603b
<b>TOTAL ÁCIDOS</b>	7,1706	7,2286	11,0043
Alcohol isoamilico	40,2089 ± 6,5450a	42,0229 ± 3,255ab	52,2231 ± 14,061b
1 propanol	nd	nd	nd
2,3 butanodiol	0,0442 ± 0,014a	0,0335 ± 0,009a	0,0690 ± 0,008b
Benzilalcohol	0,0180 ± 0,010a	0,0348 ± 0,016ab	0,0628 ± 0,039b
2 fenil etanol	7,5081 ± 1,625a	7,5217 ± 0,552a	11,0059 ± 4,289b
cis 3 hexenol	nd	0,0045 ± 0,0004b	0,0846 ± 0,004c
1 butanol	0,0475 ± 0,0043a	0,2067 ± 0,243a	0,0490 ± 0,003a
<b>TOTAL ALCOHOLES</b>	47,8267	49,8241	63,4944
γ-butirolactona	0,8142 ± 0,078b	0,9405 ± 0,092c	0,6992 ± 0,091a
<b>TOTAL LACTONAS</b>	0,8142	0,9405	0,6992

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%.

Tabla 3. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos aromáticos del cava fermentado con la levadura Ecológica 55A en función del soporte de inmovilización (mg/L).

LEVADURA	Ecológica 55A		
INMOVILIZACIÓN	LIBRE	CHIPS	CELULOSA
Diacetal	0,1514 ± 0,046b	0,0580 ± 0,028a	0,0705 ± 0,040a
Acetaldehido	0,2996 ± 0,044c	0,2074 ± 0,051b	0,1335 ± 0,061a
5 metilfurfural	0,1495 ± 0,006b	0,1618 ± 0,021b	0,0943 ± 0,019a
Benzaldehido	0,0041 ± 0,0002a	0,0040 ± 0,0002a	0,0148 ± 0,0002b
<b>TOTAL ALDEHÍDOS</b>	<b>0,6046</b>	<b>0,4312</b>	<b>0,3131</b>
Butirato etilo	0,0491 ± 0,006a	0,0664 ± 0,019ab	0,0787 ± 0,021b
Hexanoato etilo	nd	0,3092 ± 0,021b	nd
Octanoato etilo	0,6324 ± 0,036c	0,4735 ± 0,061a	0,5468 ± 0,033b
Decanoato de etilo	0,5699 ± 0,100a	0,5405 ± 0,111a	0,5262 ± 0,067a
Isovalerato etilo	nd	nd	nd
Acetato metilo	0,0989 ± 0,092a	0,0476 ± 0,013a	0,1439 ± 0,250a
Acetato isobutilo	0,0344 ± 0,005b	nd	0,0177 ± 0,027ab
Acetato hexilo	0,3012 ± 0,038b	0,2622 ± 0,038a	0,2986 ± 0,010ab
Succinato de dietilo	0,5568 ± 0,099a	0,5510 ± 0,045a	0,8349 ± 0,244b
Lactato etilo	29,5875 ± 6,435a	37,6412 ± 9,706ab	42,9424 ± 1,737b
Dietil glutarato	0,0588 ± 0,005b	0,0308 ± 0,007a	0,0963 ± 0,029c
Acetato etilo	0,1090 ± 0,033a	0,0953 ± 0,012a	0,1125 ± 0,055a
2 feniletil acetato	1,0910 ± 0,228b	1,1335 ± 0,158b	0,4770 ± 0,055a
<b>TOTAL ÉSTERES</b>	<b>33,089</b>	<b>41,1512</b>	<b>46,075</b>
Ác. Hexanoico	1,8016 ± 0,132a	2,3849 ± 0,571b	2,2409 ± 0,438ab
Ác. Octanoico	3,1964 ± 0,373a	4,6628 ± 1,106b	4,1553 ± 0,835ab
Ác. Isobutirico	0,0156 ± 0,003b	0,0442 ± 0,019c	nd
Ác. butirico	0,1497 ± 0,015a	0,1774 ± 0,016b	0,1772 ± 0,017b
Ác. Isopentanoico	0,1228 ± 0,011a	0,1417 ± 0,015b	0,1349 ± 0,012ab
Ác. 2 etil hexanoico	0,0400 ± 0,014b	0,0129 ± 0,002a	0,0090 ± 0,001a
Ác. Decanoico	0,5371 ± 0,062a	0,6187 ± 0,033ab	0,7147 ± 0,187b
<b>TOTAL ÁCIDOS</b>	<b>5,8632</b>	<b>8,0426</b>	<b>7,432</b>
Alcohol isoamilico	40,3430 ± 2,195a	42,2757 ± 2,818a	42,7774 ± 2,644a
1 propanol	8,7391 ± 0,526a	11,3909 ± 2,550b	22,3364 ± 2,070c
2,3 butanodiol	0,3471 ± 0,105b	nd	0,0502 ± 0,024ab
Benzilalcohol	0,0461 ± 0,010b	0,0230 ± 0,004a	0,0902 ± 0,008c
2 fenil etanol	5,7965 ± 0,533a	6,8798 ± 0,352b	7,1117 ± 1,263b
cis 3 hexenol	0,0058 ± 0,003b	nd	nd
1 butanol	0,5930 ± 0,125b	0,5490 ± 0,067b	0,0591 ± 0,004a
<b>TOTAL ALCOHOLES</b>	<b>55,8706</b>	<b>61,1184</b>	<b>72,425</b>
γ-butirolactona	1,4621 ± 0,199b	1,2362 ± 0,349b	0,4214 ± 0,328a
<b>TOTAL LACTONAS</b>	<b>1,4621</b>	<b>1,2362</b>	<b>0,4214</b>

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%.

Teniendo en cuenta los criterios para obtener un buen perfil aromático en el cava, se podría concluir que para el cava fermentado con levadura comercial DV, si hubiera que descartar uno de los dos métodos de inmovilización sería el de la celulosa, puesto que en lo que a aromas se refiere produce mayor cantidad de alcoholes y ácidos y menor de ésteres y lactonas, adquiriendo protagonismo los aromas menos apreciados (Ferreira y col, 2004, Jarauta, 2004).

Otro aspecto a destacar es que la inmovilización de la levadura Comercial DV no afecta significativamente al total de esteres en el cava, aunque su concentración aumenta en estos cavas.

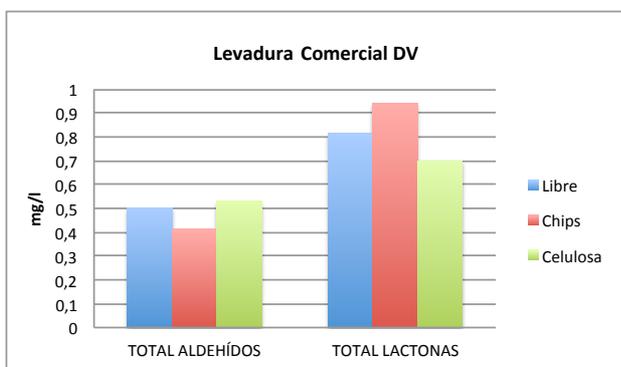


Figura 4. Cantidades de los grupos aldehídos y lactonas en el cava inoculado con la levadura comercial DV

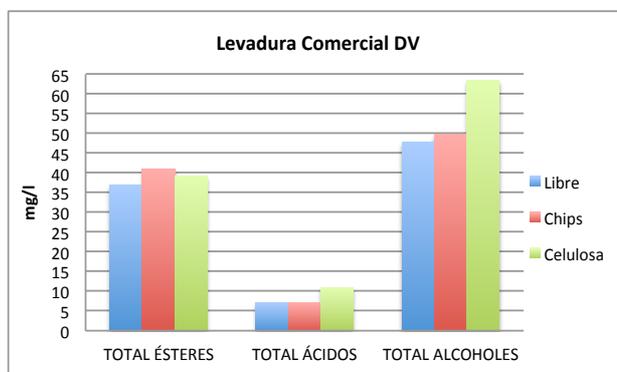


Figura 5. Cantidades de los grupos ésteres, ácidos y alcoholes en el cava inoculado con la levadura comercial DV

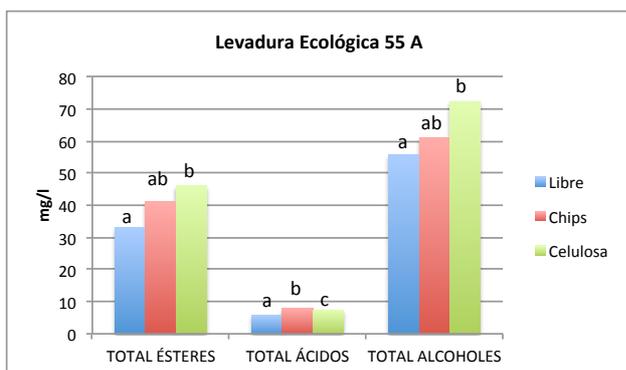


Figura 6. Efecto de la inmovilización sobre la concentración de esteres y lactonas con la levadura ecológica 55. Letras distintas indican diferencias significativas al 95%.

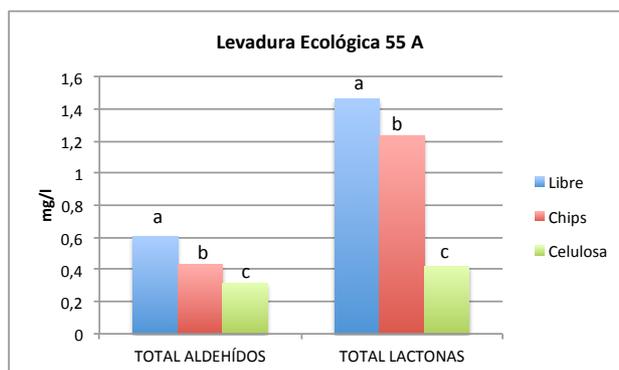


Figura 7. Efecto de la inmovilización sobre la concentración de esteres ácidos y alcoholes con la levadura ecológica 55 A. Letras distintas indican diferencias significativas al 95%.

Cuando la fermentación la realiza la levadura 55A (Figura 6 y 7) en los cavas en los que se utilizó la levadura inmovilizada, aumenta significativamente el contenido en ésteres, ácidos y alcoholes. Por el contrario, disminuyen aldehídos y lactonas.

Se puede concluir que con la levadura ecológica 55 A, si se tuviera que seleccionar uno de los dos tipos de inmovilización atendiendo a los resultados obtenidos, sería el de chips, ya que, aunque los ésteres se producen en mayor cantidad con la celulosa, también lo hacen los alcoholes que dan aromas desagradables al cava. Además, es con los chips con los que se produce más lactonas y más aldehídos.

## **5.2. Estudio comparativo de las levaduras ensayadas en fermentación libre.**

En las figuras 8, 9, 10, 11 y 12 se muestran las concentraciones de los compuestos volátiles estudiados en los cavas en función de la levadura utilizada, siempre en estado libre. En las gráficas se muestra la desviación estándar de las repeticiones.

En el grupo de los aldehídos, se observa que se produce más cantidad de acetaldehído con la levadura ecológica 55A, siendo ésta significativamente distinta a las otras dos levaduras. El acetaldehído es un compuesto aromático que se identifica fácilmente por su olor a manzanas maduras. Es considerado un defecto si se encuentra en elevadas cantidades, considerándose cantidades normales de 10 a 20 mg/L (Charest, 2015). La presencia de acetaldehído en el cava una vez ha finalizado la fermentación, se debe a la oxidación del etanol presente. Puesto que las cantidades del acetaldehído en el cava están dentro del rango normal, no tiene por qué suponer un defecto para el aroma.

Por otro lado, el 5-metilfurfural, con un aroma almendrado, aumenta significativamente con la levadura comercial DV inoculada en la bodega. La concentración de benzaldehído es diferente significativamente en las tres levaduras, produciéndose en mayor cantidad en la DV comercial.

En cuanto a los ésteres, grupo que le confiere al cava aromas frutales, el acetato de hexilo, octanoato de etilo, acetato de metilo, acetato de isobutilo, dietil glutarato, decanoato de etilo, y el 2-feniletil acetato se encuentran en mayor concentración en los cavas fermentados con la levadura ecológica 55A. Este aumento solo es significativo en algunos compuestos como muestran las figuras 8 a 10.

Al analizar el grupo de los ácidos, grupo que se caracteriza por un olor desagradable, se observa un aumento significativo de los ácidos isopentanoico, hexanoico y octanoico con la levadura DV comercial.

Para finalizar, en el grupo de los alcoholes aumenta significativamente 2-3 butanol, benzilalcohol, cis-3-hexenol, 1-butanol y 1-propanol con la levadura ecológica 55A. Este grupo se caracteriza por conferir aromas positivos a bajas concentraciones (<300 mg/l) y negativos en altas (>400 mg/l). Puesto que las cantidades que se han detectado son relativamente bajas, no hay indicios de que le puedan aportar al cava olores desagradables. Por último, el grupo de las lactonas también se localiza en mayor proporción en los cavas inoculados con la levadura 55A, dando notas a dulce y caramelo.

En resumen, al comparar las tres levaduras, coincide que la levadura ecológica 55A produce aromas más favorables y en mayor cantidad que la levadura DV. Por otro lado, al comparar las levaduras DV, la comercial y la inoculada en la bodega, se observa que la levadura comercial produce mayor cantidad de compuestos aromáticos, aunque en la mayoría de los compuestos estudiados no se han encontrado diferencias significativas.

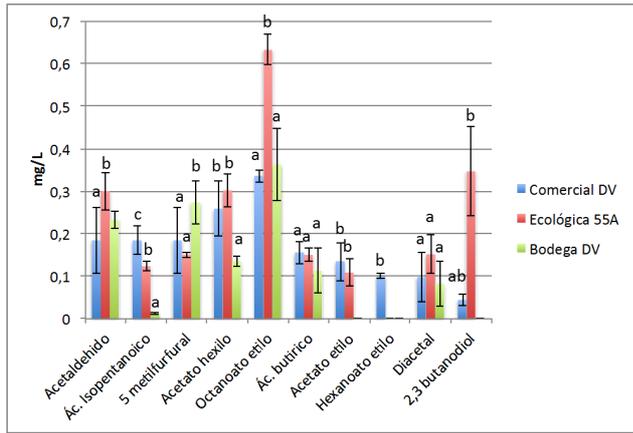


Figura 8. Concentración (mg/L) de acetaldehído, ácido isopentanoico, 5-metilfurfural, acetato de hexilo, octanoato de etilo, ácido butírico, acetato de etilo, hexanoato de etilo, diacetal, y 2,3-butanodiol para las levaduras libres. Letras distintas indican diferencias significativas al 95%.

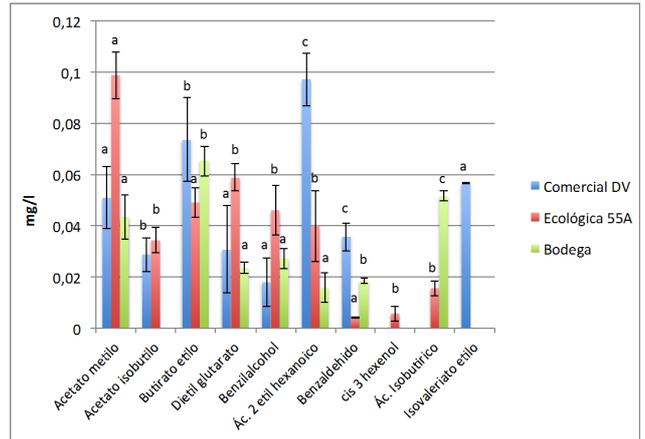


Figura 9. Cantidades (mg/l) de acetato de metilo, acetato de isobutilo, butirato de etilo, dietil glutarato, benzilalcohol, ácido 2-etilhexanoico, benzaldehído, cis-3-hexenol, ácido isobutírico e isovalerato de etilo para las levaduras libres. Letras distintas indican diferencias significativas al 95%.

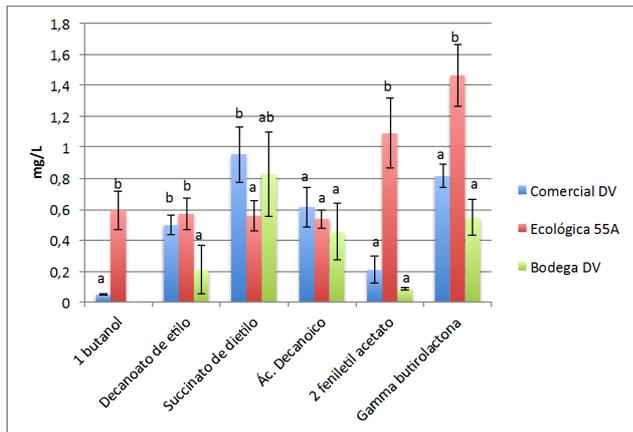


Figura 10. Cantidades (mg/l) de 1-butanol, decanoato de etilo, succinato de dietilo, ácido decanoico, 2-feniletil acetato y  $\gamma$ -butirolactona para las levaduras libres. Letras distintas indican diferencias significativas al 95%.

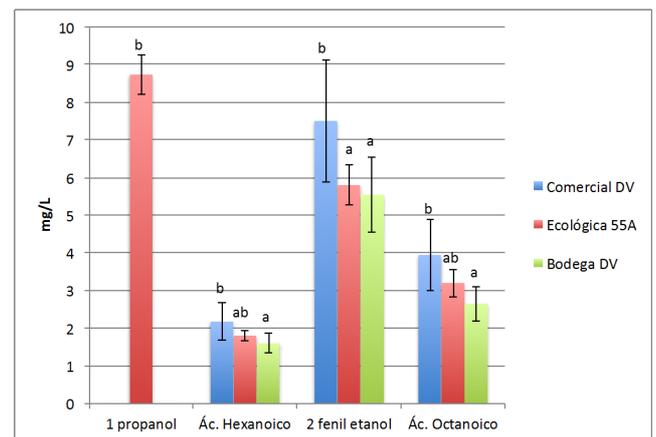


Figura 11. Cantidades (mg/l) de 1-propanol, ácido hexanoico, 2-fenil etanol y ácido octanoico para las levaduras libres. Letras distintas indican diferencias significativas al 95%.

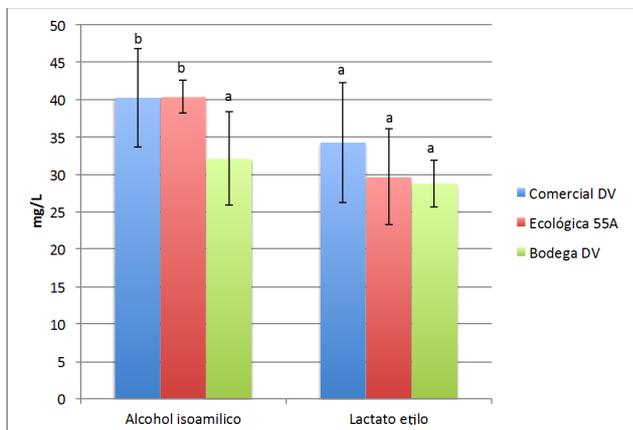


Figura 12. Cantidades (mg/l) de alcohol isoamílico y lactato de etilo para las levaduras libres. Letras distintas indican diferencias significativas al 95%.

### **5.3. Valor olfativo activo (OAV) de los distintos componentes volátiles presentes en los cavas estudiados**

El valor olfativo activo (olfactory active value, OAV) es un parámetro que relaciona la concentración de una determinada molécula volátil con su umbral de percepción, por lo que permite evaluar el impacto de distintos constituyentes del vino en la fase olfativa de la cata. En las Tablas 4 y 5 se indican los valores de OAV superior a la unidad para los distintos componentes volátiles estudiados según la levadura utilizada en la segunda fermentación del cava. Como puede observarse, sólo nueve constituyentes presentaron valores de OAV superiores a la unidad, y no en todos los cavas estudiados.

En la Tabla 4 (Levadura comercial DV), se observa que los compuestos con un mayor OAV son los que corresponden a aromas de fermentación del grupo de los ésteres, principalmente octanoato de etilo, isovalerato de etilo, hexanoato de etilo, butirato de etilo, todos ellos con aromas frutales, llegando a valores de 218 en el caso del octanoato de etilo. En segundo lugar, se encuentran los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico, con notas grasas y ásperas, con un OAV que varía entre 5 y 7. Por último, del grupo de los alcoholes, es el alcohol isoamílico el único que tiene impacto sensorial.

Atendiendo al soporte de inmovilización, hay que señalar que los cavas fermentados con la levadura DV Comercial libre, presentan más compuestos con impacto sensorial que cuando se inmoviliza, es el caso del hexanoato de etilo (aroma frutal, anís).

Si se comparan los dos sistemas de inmovilización, el isovalerato de etilo sólo tiene impacto sensorial cuando la levadura se inmoviliza con chips. Esto explicaría un aroma más frutal en las botellas inoculadas con levaduras inmovilizadas con chips.

En cuanto a los ácidos, solamente los ácidos hexanoico y octanoico tienen OAV mayor a 1.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en la tabla 4, si se tuviera que seleccionar un tipo de inmovilización, volverían a ser los chips, ya que tienen más ésteres con mayor OAV, dándole notas afrutadas al cava. Además, los alcoholes y ácidos que son los responsables de olores desagradables tienen menor OAV en los chips que en la celulosa.

Tabla 4. Olor descriptor y cálculo del OAV para cada componente en cava fermentado por la levadura Comercial DV. Bibliografía olor descriptor: <sup>1</sup>Jiang et al., 2010. <sup>2</sup>Francis, 2013. <sup>3</sup>Gambetta et al., 2014. <sup>4</sup>Sánchez-Palomo et al., 2012. Bibliografía umbral: <sup>5</sup>Guth, 1997. <sup>6</sup>Aznar et al., 2003. <sup>7</sup>Zea et al., 2001. <sup>8</sup>Belitz et al., 2009.

LEVADURA DV COMERCIAL									
Grupo	Compuesto	Olor descriptor	Odor Threshold Values (µg/L)	LIBRE (µg/L)	OAV libre	CHIPS (µg/L)	OAV chips	CELULOSA (µg/L)	OAV celulosa
Aldehídos	Diacetal	Mantequilla <sup>3</sup>	100 <sup>2</sup>	97,8	0,9780	13	0,1300	68,5	0,6850
	Acetaldehído	Manzana madura <sup>4</sup>	500 <sup>5</sup>	184,7	0,3694	189,4	0,3788	235,7	0,4714
	5-metilfurfural	Picante <sup>3</sup>	20000 <sup>6</sup>	184,8	0,0092	210,6	0,0105	225	0,0113
	Benzaldehido	Almendra <sup>1</sup>	350 <sup>8</sup>	35,7	0,1020	nd	nd	nd	nd
Ésteres	Butirato de etilo	Manzana <sup>2</sup>	20 <sup>5</sup>	73,6	3,6800	66,3	3,3150	82	4,1000
	Hexanoato de etilo	Frutal, anís <sup>1</sup>	14 <sup>3</sup>	100,2	7,1571	nd	nd	nd	nd
	Octanoato de etilo	Piña, pera, floral <sup>1</sup>	2 <sup>5</sup>	335,7	167,8500	436,5	218,2500	422	211,0000
	Decanoato de etilo	Frutal <sup>1</sup>	200 <sup>3</sup>	496,5	2,4825	547,8	2,7390	612,8	3,0640
	Isovalerato de etilo	Frutal <sup>2</sup>	3 <sup>2</sup>	56,6	18,8667	58,6	19,5333	nd	nd
	Acetato de metilo	Frutal <sup>2</sup>	470000 <sup>7</sup>	51	0,0001	42,1	0,0001	61,5	0,0001
	Acetato de isobutilo	Disolvente <sup>1</sup>	1600 <sup>6</sup>	28,7	0,0179	32,2	0,0201	22,6	0,0141
	Acetato de hexilo	Frutal, pera <sup>1</sup>	670 <sup>3</sup>	258,8	0,3863	266,5	0,3978	224,7	0,3354
	Succinato de dietilo	Frutal <sup>1</sup>	1200000 <sup>7</sup>	953,5	0,0008	1238	0,0010	2203	0,0018
	Lactato de etilo	Agrio <sup>1</sup>	155000 <sup>3</sup>	34224,2	0,2208	38079,7	0,2457	35233,6	0,2273
	Dietil glutarato	Frutal <sup>1</sup>	No encontrado	30,7	-	28,4	-	58,9	-
	Acetato de etilo	Frutal, dulce <sup>1</sup>	12300 <sup>3</sup>	134,8	0,0110	100,6	0,0082	83,8	0,0068
	2-feniletil acetato	Agradable, floral <sup>1</sup>	250 <sup>3</sup>	208,9	0,8356	106,1	0,4244	155,3	0,6212
	Ácidos	Ácido hexanoico	Queso, graso, rancio <sup>1</sup>	420 <sup>3</sup>	2179,4	5,1890	2195,3	5,2269	3060,2
Ácido octanoico		Rancio, queso, áspero, ácido	500 <sup>3</sup>	3940,8	7,8816	3905,7	7,8114	6534,8	13,0696
Ácido isobutírico		Graso <sup>1</sup>	200000 <sup>5</sup>	nd	nd	121,9	0,0006	14,4	0,0001
Ácido butírico		Rancio, queso <sup>2</sup>	10000 <sup>5</sup>	155,4	0,0155	168,7	0,0169	155,1	0,0155
Ácido isopentanoico		Rancio <sup>1</sup>	No encontrado	184,7	-	156,5	-	137,2	-
Ácido 2-etilhexanoico		Herbáceo <sup>1</sup>	No encontrado	97,2	-	76,8	-	7,3	-
Ácido decanoico		Graso, desagradable <sup>1</sup>	1000 <sup>3</sup>	613,1	0,6131	603,7	0,6037	1095,3	1,0953
Alcoholes	Alcohol isoamílico	Queso <sup>1</sup>	30000 <sup>2</sup>	40208,9	1,3403	42022,9	1,4008	52223,1	1,7408
	1-propanol	Fresco, alcohol <sup>1</sup>	830 <sup>4</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2,3-butanodiol	Mantequilla <sup>1</sup>	150 000 <sup>4</sup>	44,2	0,0003	33,5	0,0002	69	0,0005
	Bencilalcohol	Cítrico, frutal <sup>1</sup>	200000 <sup>6</sup>	18	0,0001	34,8	0,0002	62,8	0,0003
	2-feniletanol	Floral, polen <sup>1</sup>	14000 <sup>3</sup>	7508,1	0,5363	7521,7	0,5373	11005,9	0,7861
	Cis-3-hexenol	Verde, hierba cortada <sup>1</sup>	400 <sup>5</sup>	nd	nd	4,5	0,0113	84,6	0,2115
	1-butanol	Medicinal, alcohol <sup>1</sup>	150000 <sup>3</sup>	47,5	0,0003	206,7	0,0014	49	0,0003
Lactonas	γ-butirolactona	Dulce, tostado, caramelo <sup>4</sup>	50000 <sup>6</sup>	814,2	0,0163	940,5	0,0188	699,2	0,0140

Tabla 5. Olor descriptor y cálculo del OAV para cada componente en cava inoculado por la levadura Ecológica 55A. Bibliografía olor descriptor: <sup>1</sup>Jiang et al., 2010. <sup>2</sup>Francis, 2013. <sup>3</sup>Gambetta et al., 2014. <sup>4</sup>Sánchez-Palomo et al., 2012. Bibliografía umbral: <sup>5</sup>Guth, 1997. <sup>6</sup>Aznar et al., 2003. <sup>7</sup>Zea et al., 2001. <sup>8</sup>Belitz et al., 2009.

LEVADURA 55 A ECOLÓGICA									
Grupo	Compuesto	Olor descriptor	Odor Threshold Values (µg/L)	LIBRE (µg/L)	OAV libre	CHIPS (µg/L)	OAV chips	CELULOSA (µg/L)	OAV celulosa
Aldehídos	Diacetal	Mantequilla <sup>3</sup>	100 <sup>2</sup>	151,4	1,5140	58	0,5800	70,5	0,7050
	Acetaldehído	Manzana madura <sup>4</sup>	500 <sup>5</sup>	299,6	0,5992	207,4	0,4148	133,5	0,2670
	5-metilfurfural	Picante <sup>3</sup>	20000 <sup>6</sup>	149,5	0,0075	161,8	0,0081	94,3	0,0047
	Benzaldehído	Almendra <sup>1</sup>	350 <sup>8</sup>	4,1	0,0117	4	0,0114	14,8	0,0423
Ésteres	Butirato de etilo	Manzana <sup>2</sup>	20 <sup>5</sup>	49,1	2,4550	66,4	3,3200	78,7	3,9350
	Hexanoato de etilo	Frutal, anís <sup>1</sup>	14 <sup>3</sup>	nd	nd	309,2	22,0857	nd	nd
	Octanoato de etilo	Piña, pera, floral <sup>1</sup>	2 <sup>5</sup>	632,4	316,2000	473,5	236,7500	546,8	273,4000
	Decanoato de etilo	Frutal <sup>1</sup>	200 <sup>3</sup>	569,9	2,8495	540,5	2,7025	526,2	2,6310
	Isovaleriano de etilo	Frutal <sup>2</sup>	3 <sup>2</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Acetato de metilo	Frutal <sup>2</sup>	470000 <sup>7</sup>	98,9	0,0002	47,6	0,0001	143,9	0,0003
	Acetato de isobutilo	Disolvente <sup>1</sup>	1600 <sup>6</sup>	34,4	0,0215	nd	nd	17,7	0,0111
	Acetato de hexilo	Frutal, pera <sup>1</sup>	670 <sup>3</sup>	301,2	0,4496	262,2	0,3913	298,6	0,4457
	Succinato de dietilo	Frutal <sup>1</sup>	1200000 <sup>7</sup>	556,8	0,0005	551	0,0005	834,9	0,0007
	Lactato de etilo	Agrio <sup>1</sup>	155000 <sup>3</sup>	29587,5	0,1909	37641,2	0,2428	42942,4	0,2770
	Dietil glutarato	Frutal <sup>1</sup>	No encontrado	58,8	-	30,8	-	96,3	-
	Acetato de etilo 2-feniletil acetato	Frutal, dulce <sup>1</sup> Agradable, floral <sup>1</sup>	12300 <sup>3</sup> 250 <sup>3</sup>	109 1091	0,0089 4,3640	95,3 1133,5	0,0077 4,5340	112,5 477	0,0091 1,9080
	Ácidos	Ácido hexanoico	Queso, graso, rancio <sup>1</sup>	420 <sup>3</sup>	1801,6	4,2895	2384,9	5,6783	2240,9
Ácido octanoico		Rancio, queso, áspero, ácido	500 <sup>3</sup>	3196,4	6,3928	4662,8	9,3256	4155,3	8,3106
Ácido isobutírico		Graso <sup>1</sup>	200000 <sup>5</sup>	15,6	0,0001	44,2	0,0002	nd	nd
Ácido butírico		Rancio, queso <sup>2</sup>	10000 <sup>5</sup>	149,7	0,0150	177,4	0,0177	177,2	0,0177
Ácido isopentanoico		Rancio <sup>1</sup>	No encontrado	122,8	-	141,7	-	134,9	-
Ácido 2-etilhexanoico		Herbáceo <sup>1</sup>	No encontrado	40	-	12,9	-	9	-
Ácido decanoico		Graso, desagradable <sup>1</sup>	1000 <sup>3</sup>	537,1	0,5371	618,7	0,6187	714,7	0,7147
Alcoholes	Alcohol isoamílico	Queso <sup>1</sup>	30000 <sup>2</sup>	40343	1,3448	42275,7	1,4092	42777,4	1,4259
	1-propanol	Fresco, alcohol <sup>1</sup>	830 <sup>4</sup>	8739,1	10,5290	11390,9	13,7240	22336,4	26,9113
	2,3-butanodiol	Mantequilla <sup>1</sup>	150 000 <sup>4</sup>	347,1	0,0023	nd	nd	50,2	0,0003
	Bencilalcohol	Cítrico, frutal <sup>1</sup>	200000 <sup>6</sup>	46,1	0,0002	23	0,0001	90,2	0,0005
	2-feniletanol	Floral, polen <sup>1</sup>	14000 <sup>3</sup>	5796,5	0,4140	6879,8	0,4914	7111,7	0,5080
	Cis-3-hexenol	Verde, hierba cortada <sup>1</sup>	400 <sup>5</sup>	5,8	0,0145	nd	nd	nd	nd
	1-butanol	Medicinal, alcohol <sup>1</sup>	150000 <sup>3</sup>	593	0,0040	549	0,0037	59,1	0,0004
Lactonas	γ-butirolactona	Dulce, tostado, caramelo <sup>4</sup>	50000 <sup>6</sup>	1462,1	0,0292	1236,2	0,0247	421,4	0,0084

Cuando la fermentación se realiza con la levadura ecológica (Tabla 5) hay que destacar la presencia del diacetal con impacto sensorial, cuando la levadura se encuentra libre. Como se ha comentado anteriormente, es el principal compuesto que resulta de la fermentación maloláctica, confiriéndole al vino aromas a mantequilla. (Nielsen y Richelieu, 1999). Es un componente aromático complejo, son varios los autores que lo definen como un componente negativo del aroma cuando se encuentra en concentraciones elevadas. (Clarke and Bakker, 2004). Su concentración varía con el tiempo y con el contenido de dióxido de azufre del vino (Nielsen and Richelieu, 1999)

Por otro lado, al observar el grupo de los ésteres, los compuestos que tienen mayor OAV se corresponden con el octanoato de etilo, hexanoato de etilo, decanoato y butirato de etilo. A diferencia de la levadura DV, el octanoato de etilo tiene un mayor impacto sensorial cuando la levadura se encuentra libre, y no cuando está inmovilizada con chips. Además, aparece un nuevo éster con OAV mayor que 1, el 2-feniletil acetato, éster derivado del ácido acético, característico de cavas jóvenes. Su OAV es mayor cuando la levadura está libre e inmovilizada con chips, mientras que con la celulosa disminuye.

Los ácidos con impacto sensorial son los mismos que con la levadura DV comercial.

Por último, en el caso de los alcoholes solo el alcohol isoamílico y el 1-propanol tienen impacto sensorial. Este último no aparecía en la levadura comercial DV. Éstos, en cantidades moderadas (<400 mg/l) pueden conferir aromas agradables al cava contribuyendo en la complejidad del aroma. (Ribereau-Gayon, 1976)

Si hubiera que seleccionar de nuevo uno de los dos tipos de inmovilización, volverían a ser los chips ya que los alcoholes con impacto sensoriales igual, y dispone de más ésteres que influyen en el aroma global del cava.

#### **5.4. Análisis de componentes principales (PCA)**

Se ha realizado un análisis de PCA con la finalidad de evaluar el efecto que, sobre la fracción volátil total del cava, tiene la técnica de inmovilización, y la levadura.

Este análisis es uno de los métodos pioneros del análisis multivariante. Consiste en una técnica de reducción de la información disponible sobre el conjunto de individuos (en este caso los cavas objeto de estudio) en los cuales se han tomado diversas observaciones. El método condensa la matriz de correlaciones entre las variables en unos "componentes principales" de la variabilidad total. Es decir, permite transformar un conjunto de variables intercorrelacionadas con otro conjunto de variables no correlacionadas, denominadas componentes principales, que son combinación lineal de las variables originales.

El primer componente principal que se extrae en el análisis es el que resume lo mejor posible la información contenida en la matriz de datos original. Es decir, es el que mejor contribuye a explicar la varianza total. El segundo componente es el que resume lo mejor posible la varianza restante, siendo independiente del primero. La secuencia puede continuar extrayendo factores hasta explicar la varianza total.

La figura 12 muestra la disposición de los distintos compuestos aromáticos en el plano, en función de los dos primeros ejes principales (Componente 1 y Componente 2). Los compuestos aromáticos se sitúan aleatoriamente a lo largo de los ejes principales, tanto en su parte positiva como en su parte negativa.

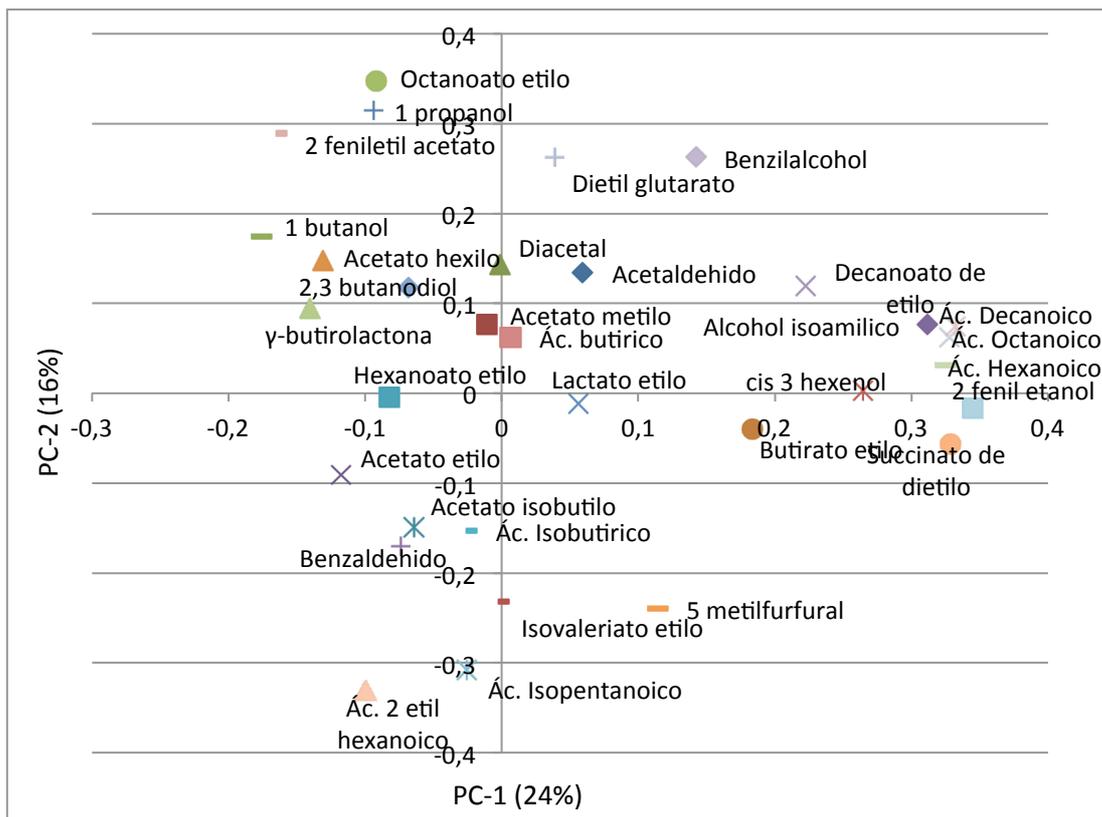


Figura 12. Análisis de los componentes principales. Representación de *loadings* en el plano formado por los componentes principales PC1 y PC2

En la figura 12 se ve la proyección de los datos de las dos levaduras, representándose la primera componente frente a la segunda.

La distribución presenta diferencias según la levadura utilizada (DV Comercial y Ecológica 55A). En la figura 12 se observa cómo PC2 influye decisivamente en la separación de las levaduras, localizándose en la parte superior la levadura ecológica y en la mitad inferior la comercial DV.

En la figura 12, en la que se representan los pesos de los componentes volátiles analizados, se aprecia que los componentes que se encuentran en los extremos del PC2 son los que más han influido en la diferenciación de ambas levaduras. En general, los ésteres y alcoholes se encuentran en mayor cantidad en los cavas en los cuales la segunda fermentación en botella se ha realizado con la levadura ecológica 55A: octanoato de etilo, dietil glutarato, acetato de hexilo, acetato de metilo, hexanoato de etilo, y, en cuanto a los alcoholes el 1-propanol, 1-butanol y el 2,3-butanodiol. Por otro lado, cuando el cava fermenta con la levadura comercial DV hay mayor contenido de ácidos como el ácido isobutírico y el ácido 2-etilhexanoico, y de algunos aldehídos como el benzaldehído y el 5-metilfurfural.

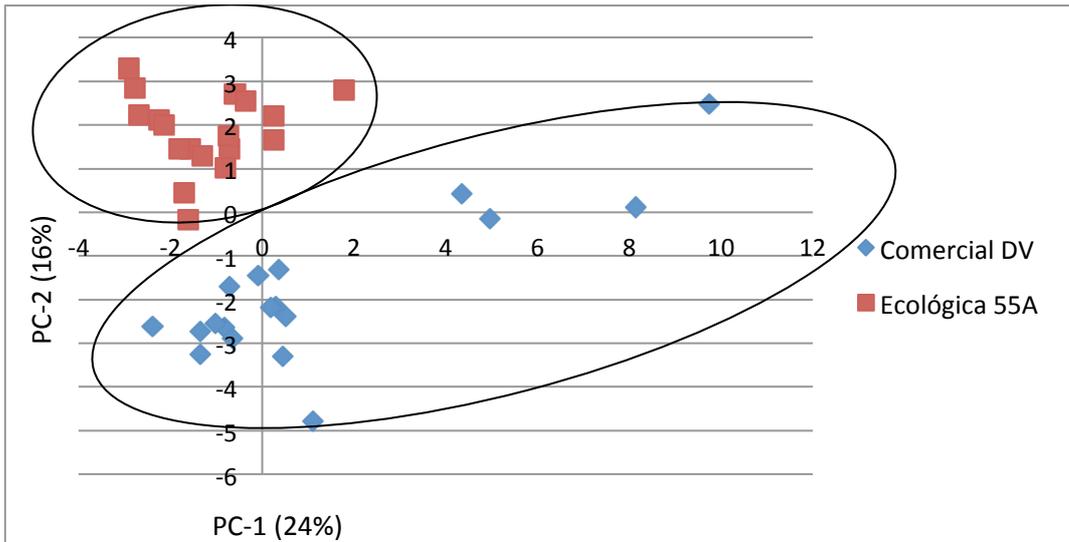


Figura 13: Análisis de los componentes principales. Representación de *scores* en el plano formado por los componentes principales PC1 y PC2 en función de la levadura.

En la figura 14 se ve la proyección de los datos de los tres sistemas de fermentación con las levaduras: células libres, inmovilizadas con chips e inmovilizadas con celulosa, representándose la primera componente frente a la segunda.

En este caso vuelve a ser la componente PC2 la que más ha influido en la separación del tipo de inmovilización. La dispersión en el plano se acopla a la diferenciación de ambas levaduras.

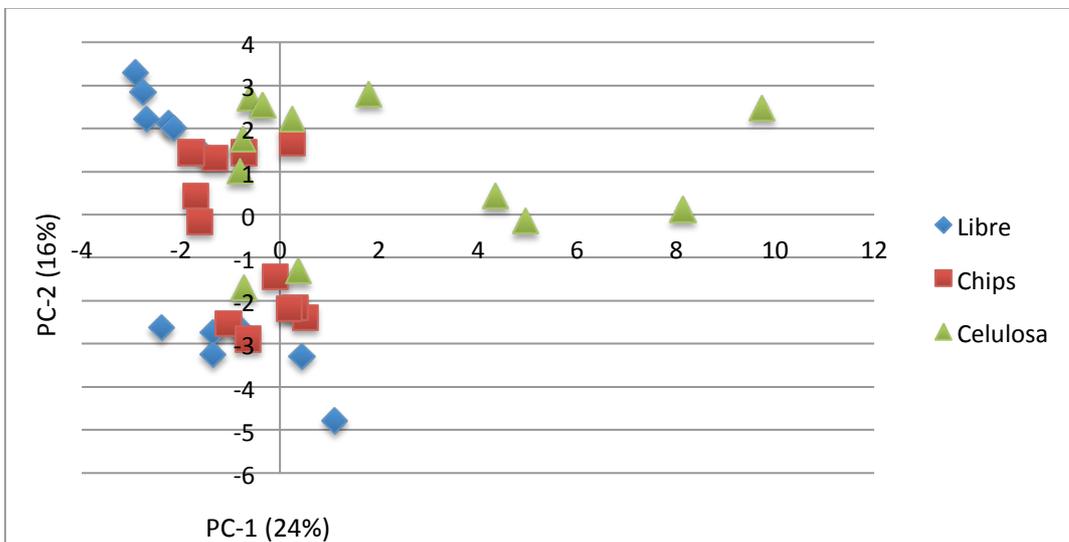


Figura 14: Análisis de los componentes principales. Representación de *scores* en el plano formado por los componentes principales PC1 y PC2 en función de la inmovilización y del soporte utilizado.

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados han puesto de manifiesto, que la inmovilización de las levaduras que realizan la segunda fermentación en el proceso de elaboración del cava, tiene un efecto significativo sobre su composición volátil. Este efecto es más patente cuando la toma de espuma la realiza la levadura ecológica 55ª.

La fermentación del vino base con la levadura comercial DV inmovilizada, da lugar a cavas con menor contenido en aldehídos y ésteres (excepto succinato de dietilo), y mayor de ácidos y alcoholes que cuando se encuentra libre.

La utilización de la levadura ecológica 55A inmovilizada afecta significativamente la composición aromática del cava, disminuyen aldehídos, y aumentan alcoholes, ácidos y algunos esterés.

De las tres levaduras estudiadas, en fermentación libre, la levadura ecológica 55A produce un aumento significativo de ésteres en los cavas, concretamente de acetato de hexilo, octanoato de etilo, acetato de metilo, acetato de isobutilo y dietil glutarato, característicos del aroma frutal. La levadura comercial DV produce un aumento significativo en los cavas de ácido isopentanoico, ácido hexanoico, y octanoico que aportan notas aromáticas.

Respecto al estudio del impacto sensorial de los compuestos analizados, los ácidos hexanoico y octanoico, así como el alcohol isoamilico, se presentan como constituyentes volátiles influyentes en el aroma de los cavas elaborados con las levaduras ensayadas, tanto libres como inmovilizadas.

A través del estudio del valor olfativo (OAV), se ha puesto de manifiesto que la familia de los ésteres es la dominante en el aroma de estos cavas, siendo el octanoato de etilo el compuesto que presenta unos valores más altos de OAV.

El Análisis de Componentes Principales, muestra que los cavas fermentados con la levadura ecológica 55A, tienen mayor concentración de acetato de hexilo, 2,3-butanodiol, hexanoato de etilo, 2-feniletacetato, y dietil glutarato, mientras que los cavas fermentados con la levadura Comercial DV se identifican con la mayor presencia de acetato de etilo, benzaldehído, ácido isobutirico y alcohol isoamilico. La inmovilización de la levadura con chips se relaciona con un aumento de ésteres en el cava.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Alexandre, H., Guillox-Benatier, M. Yeast autolysis in sparkling wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 119–127, 2006

Aznar, Margarita; López, Ricardo, Cacho, Juan, Ferreira, Vicente. 2003. Prediction of Aged Red Wine Aroma Properties from Aroma Chemical Composition. Partial Least Squares Regression Models. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (9), pp 2700–2707

Bakoyianis, V. y Koutinas, A. A. 1996. A catalytic multistage fixed-bed tower bioreactor in an industrial-scale pilot plant for alcohol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 49: 197–203.

Bardi, E. y Koutinas, A. A. 1994. Immobilization of yeast on delignified cellulosic material for room temperature and low temperature wine-making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 221–226.

Belitz, H.-D; Grosch, W; Schieberle, P. 2009. *Food Chemistry*. Springer-Verlag. Berlín

Bosch-Fusté, Joan., Riu-Aumatell, Montserrat., M.Guadanyol, Josep., López-Tamames, Elvira., Buxaderas, Susana., 2007. Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. *Food Chemistry* 105 : 428-435. Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Charest, Remy. 2015. “Conozca los componentes: una mirada al acetaldehído con Dominik Durner”. *Ciencia del vino*

Clarke, R.J., and Bakker, J. (2004). *Wine flavour chemistry*. (Oxford; UK: Blackwell Publishing)

Dharmadhikari, Murli. 1995. Yeast autolysis. *Vineyard & Vintage View*. Volumen 10 (6)

Di Stefano, R., Ciolfi, G. 1983. Production of acetaldehyde from different species during alcoholic fermentation.

Dizy, M., and L. F. Bisson. (2000). Proteolytic activity of yeast strains during grape juice fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 51:155-167

Dubourdieu, D., Villetaz, J. C., Desplanques, C., & Ribéreau Gayon, P. (1981). Dégradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. Application à l'amélioration de la clarification des vins issus de raisins pourris. *Connaissance de la vigne et du vin*, 15, 161-177.

Francis, Leigh. 2013. Fermentation-derived aroma compounds and grape-derived monoterpenes. The Australian Wine Research Institute.

Fumi, M., Trioli, G. y Colagrande, O. (1987). Preliminary assessment on the use of immobilized yeast cells in sodium alginate for sparkling wine processes. *Biotechnology Letters*. 9(5): 339–342.

Gabriel Guadalupe M, V. (2008) Comparación de la producción de compuestos aromaticos por cepas de levaduras vínicas comerciales.

- Godia F, Casas C, Sola C (1991): Application of immobilized yeast cells to sparkling wine fermentation. *Biotechnol. Prog.*, vol 7, No 5, p. 468-470
- Guth, H. Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45 (8), pp 3027–3032
- Hernández-Orte, P., Cacho, J. F., y Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2891-2899.
- Hernández-Orte, P., Franco, E., González, C., Martínez, J., Cabellos, M., Suberviola, J., Orriols, I., and Cacho, J. 2014. Criteria to discriminate between wines aged in oak barrels and macerated with oak fragments. *Food Research International* 57, 234-241.
- Jiang, Bao and Zhang, Zhenwen. 2010. Volatile Compounds of Young Wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischt and Chardonnay Varieties Grown in the Loess Plateau Region of China. *Molecules* 2010, 15, 9184-9196. Online [www.mdpi.com/journal/molecules](http://www.mdpi.com/journal/molecules)
- Karel, S.F., Libicki, S.B., Robertson, C.R., 1985. The immobilization of whole cells-engineering principles. *Chem. Eng. Sci.* 40, 1321–1354.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banar, I.M., Marchant, R., Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverage production. *Food Microbiology* 21, 377-397
- Lasanta M., Cristina. Estudio y aplicación de nuevos procesos para la mejora de la elaboración de vinos tintos en zonas de clima cálido. 2009. Universidad Cádiz. Facultad de Ciencias. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de Alimentos
- Margaritis, A., Merchant, F.J.A., 1984. Advances in ethanol production using immobilized cell systems. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2, 339–393.
- Martínez-Rodríguez, A.J., Carrascosa, A.V., Polo, M.C. 2001. Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 155–160.
- M. Gambetta, Joanna M; E. P. Bastian, Susan; Cozzolino, Daniel and W. Jeffery, David. 2014. Factors Influencing the Aroma Composition of Chardonnay Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 62 (28), pp 6512–6534
- Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jiménez, J.M., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J., 2003. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19, 297–304.
- Navarro, J.M., Durand, G. 1977. Modification of yeast metabolism by immobilization on to porous glass. *European J. Appl. Microbiol.* 4, 243–254.
- Nielsen, J.C., and Richelieu, M. 1999. Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 740-745.
- Norton, S., D'Amore, T. 1994. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 365–375.

Ortega, Catalina; López, Ricardo; Cacho, Juan; Ferreira, Vicente. 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. *Journal of Chromatography A*.923, 205-214

Park, J.K., Chang, H.N., 2000. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnol. Adv.* 18, 303–319.

Pérez-Coello, M.S., Briones Pérez, A.I., Ubeda Iranzo, J.F., Martín Álvarez, P.J., 1999. Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. *Food Microbiology* 16, 563–573.

Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A., Russell, I., 1998. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *J. Inst. Brew.* 104, 19–31.

Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.

Pozo-Bayón, M. Á., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., & Moreno-Arribas, M.V. (2009a). Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: From a traditional to an improved winemaking technology. *Trends in food science and technology*, 20, 289-299.

Fajardo-Ochoa, Raúl., Osuna-Castro, Juan Alberto., Villa Velázquez-Mendoza, Carlos., Escalante-Minakata, Pilar., Ibarra-Junquera, Vrani (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. Volumen 3 No. 6.*

Reglamento CE Nº 1493/1999. Consejo de 17 de mayo de 1999 por el que se establece la organización común del Mercado vitivinícola.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B. and Lonvaud A. 2000. Handbook of Enology. Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications. John Wiley & Sons, LTD, Chichester – New York – Weinheim – Brisbane – Singapore – Toronto.

Ribéreau-Gayon, J., E. Peynaud, P. Ribéreau-Gayon, and P. Sudraud. (1976). Science and Technology of Wine. (French). Dunod Editorial. París

Sánchez-Palomo, Eva; Gómez García-Carpintero, Eva; Gómez Gallego, Manuel Ángel and González Viñas, Miguel Ángel. 2012. The Aroma of Rojal Red Wines from La Mancha Region – Determination of Key Odorants, Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications, Dr. Bekir Salih (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/32801. Available from: <http://www.intechopen.com/books/gas-chromatography-in-plant-science-wine-technology-toxicology-and-some-specific-applications/the-aroma-of-rojal-red-wines-from-la-mancha-region-determination-of-key-odorants>

Schreier P.: «Formation of wine aroma», Proceeding of alko Symposium of flavour research of alcoholic beverages, L. Nykanen, P. Lehtonen (eds.), Helsinki, 1984.

Shimobayashi, Y. y Tominaga, K. 1986. Application of biotechnology in the food industry. I. Brewing of white wine by a bioreactor. *Hokaidoritsu Kogyo Shikenjo Hokoku.* 285: 199–204.

- Soles, R.M., Ough, C.S., Kunkee, R.E., 1982. Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 33, 94-98.
- Stewart, G.G., Russel, I., 1986. One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. *J. Inst. Brew.* 92, 537–558.
- Suárez Lepe, José Antonio; Ferreira, Vicente; Torrens, Jordi; Polo, M<sup>a</sup>Carmen; González San José, M<sup>a</sup>Luisa. *Análisis sensorial [vino]*. 2002. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica Universitat Rovira i Virgili
- Suárez-Lepe, J.A. e Iñigo-Leal, B. (2004). *Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación*. (ISBN. 84-8476-184-3), Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. Pgs: 668-672.
- Suomalainen, H., Lehtonen, M., 1979. The production of aroma compounds by yeast. *J. Inst. Brew.* 85, 149-156
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., and Pretorius, I.S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11: 139-173.
- Tataridis, P., Ntagas, P., Voulgaris, I. and Nerantzis, E.T. 2005. Production of sparkling wine with immobilized yeast fermentation.
- Ubeda Iranzo, J.F., Gonzalez Magaña, F., González Viñas, M.A., 2000. Evaluation of the formation of volatiles and sensory characteristics in the industrial production of white wines using different commercial strains of the genus *Saccharomyces*. *Food Control* 11, 143–147.
- Zea, Luis; Moyano, Lourdes; Moreno, Juan; Cortes, Begoña and Medina, Manuel. Discrimination of the aroma fraction of Sherry wines obtained by oxidative and biological ageing. *Food Chemistry* Volume 75, Issue 1, October 2001, Pages 79–84