

Del 7 al 10 de mayo de 2019

**CENTRO UNIVERSITARIO  
SANTA ANA  
ALMENDRALEJO**



**XLI JORNADAS  
DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA  
TIERRA DE BARROS**

I Congreso Agroalimentario de Extremadura

**XLI Jornadas  
de VITICULTURA Y ENOLOGÍA  
de la Tierra de Barros  
I Congreso Agroalimentario de Extremadura**

**Edita:**

Centro Universitario Santa Ana  
C/ IX Marqués de la Encomienda, nº 2  
Almendralejo  
Tel. 924 661 689  
<http://www.univsantana.com>

**Ilustración de portada:**

© Vito Cano.  
Detalle del mural del mercado de abastos "Las mercedes"  
Almendarlejo (Badajoz)

**Diseño original:**

Tecnigraf S.A.

**Maquetación:** Virginia Pedrero

ISBN: 84-7930-109-0

D.L.:

Imprime: Impresal

# Efecto del formato de levadura y la temperatura en compuestos del aroma de cavas sometidos a dos tiempos de crianza

MARTÍNEZ-GARCÍA, R.<sup>A</sup>

GARCÍA-MARTÍNEZ, M.T.<sup>B</sup>

PEINADO RAFAEL A.<sup>A</sup>

PUIG-PUJOL, A.<sup>C</sup>

MAURICIO, J.C.<sup>B</sup>

MORENO, J.<sup>A\*</sup>

a Departamento de Química Agrícola, Ed. Marie Curie (C3), Campus Agroalimentario de Excelencia Internacional CeIA3, Universidad de Córdoba, Ctra. N-IV-A, km 396, 14014 Córdoba, España.

b Departamento de Microbiología, Ed. Severo Ochoa (C6), Campus Agroalimentario de Excelencia Internacional CeIA3, Universidad de Córdoba, Ctra. N-IV-A, km 396, 14014 Córdoba, España.

c Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries - Institut Català de la Vinya i el Vi. Plaça Àgora, 2. 08720 Vilafranca del Penedès (Barcelona), España.

Tel. (+34) 957 218636, \*e-mail: qe1movij@uco.es

## RESUMEN

Se compara la composición en compuestos del aroma de cavas elaborados mediante la inoculación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa P29, en formato de células libres o en formato de bio-cápsulas, para la segunda fermentación en botella ce-

rrada, a dos temperaturas y dos tiempos de crianza. Mediante adsorción en fase sólida en barras magnéticas (SBSE) y análisis por cromatografía de gases, acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), se han identificado 45 compuestos a los que se ha calculado su superficie relativa. Un análisis de varianza múltiple establece que 20 de ellos dependen simultánea y significativamente ( $p \leq 0,05$ ) del formato, la temperatura y el tiempo. Un mapa de calor diferencia los cambios de cada compuesto que son consecuencia de los factores estudiados. El análisis de componentes principales agrupa los cavas en base al formato, temperatura y tiempo de crianza mediante tres componentes, que explican el 80 % de la varianza total. Mediante un análisis de múltiples variables se obtienen huellas, basadas en ocho familias químicas, que diferencian los cavas obtenidos en cada una de las ocho condiciones ensayadas. Los vinos de bio-cápsulas son más ricos en terpenos, norisoprenoides y compuestos furánicos.

**Palabras clave:** vino espumoso, levadura, bio-cápsulas, aromas, análisis estadístico.

#### ABSTRACT

This study focuses on the aroma composition of "cava" sparkling wine, inoculated with the *Saccharomyces cerevisiae*, P29 strain, for the second fermentation in bottle, as free cells format or as bio-capsules, at two temperatures and two aging times. By Stir Bar Sorptive extraction (SBSE) technique and Gas Chromatography, coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) analysis, 45 compounds have been identified and their relative areas were calculated. A multiple variance analysis establishes that 20 of them are dependent simultaneously and significantly ( $p \leq 0,05$ ) on the format, temperature and time. A heat map differentiates the changes of each compound that are a consequence of the three factors studied. The analysis of principal components groups the cava wines based on the format, temperature and aging time, by means of three components, which explain 80% of the total variance. An analysis of multiple variables provides the fingerprints based on eight chemical families, which differentiates the cava wines obtained in each one of the eight conditions tested. The wines obtained with bio-capsules are the richest in terpenic compounds, norisoprenoids and furanic compounds.

**Keywords:** sparkling wine, yeast, bio-capsules, aroma compounds, statistical analysis.

## INTRODUCCION

La industria enológica moderna tiene como principal objetivo adaptar su producción a las preferencias del consumidor y junto con la comunidad científica, invierte grandes esfuerzos en la diversificación de productos y a la vez incrementar la rentabilidad del proceso productivo. En este sentido, el gran prestigio internacional e impacto socio-económico que en las últimas décadas han experimentado los vinos espumosos, hace de los mismos un objetivo prioritario de innovación particularmente en las regiones vitivinícolas tradicionalmente especializadas en la producción de vinos tranquilos.

Entre los vinos espumosos destacan por su calidad los elaborados mediante el método tradicional o “Champenoise”, basado en la etapa denominada toma de espuma (*prise de mousse*), que consiste en una segunda fermentación en botella cerrada, seguida de un mínimo periodo de crianza de 9 meses en contacto con las lías de la levadura.

Para mantener o incrementar la demanda de los vinos espumosos es necesario alcanzar los estándares de calidad y seguridad exigidos por el consumidor, siendo la crianza sobre lías una de las fases más importantes. En esta etapa tiene lugar la autólisis de la levadura (Torresi, Frangipane, & Anelli, 2011) y ha sido objeto de numerosas investigaciones como consecuencia de la influencia que en el perfil aromático tienen los enzimas y productos liberados durante la misma (Lopez de Lerma, Peinado, Puig-Pujol, Mauricio, Moreno, & Garcia-Martinez, 2018; Pozo-Bayon, Martin-Alvarez, Moreno-Arribas, Andujar-Ortiz, & Pueyo, 2010; Pozo-Bayon, Pueyo, Martin-Alvarez, Martinez-Rodriguez, & Polo, 2003; Riu-Aumatell, Bosch-Fuste, Lopez-Tamames, & Buxaderas, 2006). Sin embargo, las tendencias actuales de investigación se centran en el mayor control de la etapa de fermentación de la fase de toma de espuma y en el acortamiento de etapas posteriores, como la fase de removido de las lías de levadura. Los avances en el control de estas fases contribuirán a una mayor uniformidad de la calidad entre los lotes, a una puesta del producto en el mercado más rápida y a una disminución de los costes y el consumo energético derivado del proceso de elaboración (Giovenzana, Beghi, Vagnoli, Iacono, Guidetti, & Nardi, 2016; Kemp, Alexandre, Robillard, & Marchal, 2015; Martinez-Garcia, Garcia-Martinez, Puig-Pujol, Mauricio, & Moreno, 2017; Munoz-Redondo, Cuevas, Leon, Ramirez, Moreno-Rojas, & Ruiz-Moreno, 2017; Ruiz-Moreno, Munoz-Redondo, Cuevas, Marrufo-Curtido, Leon, Ramirez, *et al.*, 2017).

La etapa del removido es un proceso lento y costoso cuyo objetivo es facilitar la eliminación de las lías de levadura mediante su desplazamiento hacia el cuello de la botella. A este respecto, los sistemas de inmovilización de levaduras constituyen una línea de investigación en expansión y se considera que uno de los mayores beneficios que aporta es la disminución del tiempo y simplificación de esta etapa en la elaboración de los vinos espumosos (Moreno-García, García-Martínez, Mauricio, & Moreno, 2018). La inmovilización de levaduras supone su confinación en un soporte físico externo que sea aceptable desde el punto de vista económico, de la calidad y la seguridad alimentaria (Kourkoutas, Manojlovic, & Nedovic, 2010). A este respecto, los soportes descritos con mejores ventajas para los vinos espumosos son los de alginato cálcico, debido a su fácil preparación y su poder de fijación de levaduras (López de Lerma *et al.*, 2018). Sin embargo, algunos estudios han puesto de manifiesto un aumento del contenido en iones calcio y sodio en los vinos que aumenta el riesgo de alteraciones en sus características organolépticas (López de Lerma, Peinado, Puig-Pujol, Mauricio, Moreno, & García-Martínez, 2018; Puig-Pujol, Bertran, García-Martínez, Capdevila, Minguez, & Carlos Mauricio, 2013). Para evitar estos inconvenientes, recientemente se han introducido nuevos sistemas de confinamiento que presentan como ventajas la ausencia de soportes o aglutinantes químicos externos. Uno de estos sistemas es el denominada bio-cápsulas de levadura (Peinado, Moreno, Villalba, González-Reyes, Ortega, & Mauricio, 2006), que consiste en una co-inmovilización de determinadas cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* sobre hongos filamentosos con status GRAS (como el *Penicillium chrysogenum*) (Puig-Pujol *et al.*, 2013). Las aplicaciones de estas biocápsulas a diferentes procesos fermentativos han mostrado resultados muy satisfactorios y prometedores para el campo de la enología (García-Martínez, Moreno, Mauricio, & Peinado, 2015; García-Martínez, Puig-Pujol, Peinado, Moreno, & Mauricio, 2012; Peinado, Moreno, Villalba, González-Reyes, Ortega, & Mauricio, 2006), en especial en la elaboración de vinos espumosos. A este respecto, no existen muchos estudios sobre los cambios que las bio-cápsulas de levadura producen sobre la fracción volátil, responsable del aroma de los vinos espumosos, particularmente cuando se someten a diferentes condiciones de temperatura y tiempo de crianza (López de Lerma *et al.*, 2018; Puig-Pujol *et al.*, 2013).

Este trabajo tiene como objetivo comparar la composición en compuestos del aroma de los cavas elaborados con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* P29, usada en dos formatos (células libres y bio-cápsulas), después de 15 y 24 meses de crianza y a temperatura controlada de 10 y 14 °C durante todo el periodo de estudio.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Levadura y condiciones experimentales

Se utilizó la cepa P29 de *Saccharomyces cerevisiae* (CECT 11770), seleccionada en la zona vitivinícola de la D.O. Penedès por el Instituto Catalán de la Viña y el Vino (INCAVI) que se usó en formato libre e inmovilizado en forma de bio-cápsulas. La inmovilización se llevó a cabo mediante el procedimiento patentado por el grupo de investigación Vitenol de la Universidad de Córdoba, usando como soporte biológico el hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* H3, que es un microorganismo GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro).

El vino base utilizado para los ensayos se elaboró con la mezcla de las variedades de uva cultivadas en la Región del Penedés: 50 % Macabeo + 30 % Xarel·lo + 20 % Parellada y sus características generales fueron 10,8 % v/v etanol; 6,4 g/L de acidez total (expresada en ácido tartárico) y pH 3.05. La segunda fermentación del vino base se llevó a cabo en botellas estándar de 750 mL a las que se añadieron 21 g/L de sacarosa, 1,5.106 y 0,6 mL/L de bentonita comercial (Adjuvant 83, Station Oenotechnique de Champagne, Epernay, Francia), con un contenido en SO<sub>2</sub> total de 90 mg/L. Se calculó el número de bio-cápsulas de levadura por botella que permitiesen la misma población de levaduras y las condiciones de preparación fueron previamente descritas por (García-Martínez, Peinado, Moreno, García-García, & Mauricio, 2011).

El colectivo total de muestras (N=24) se dividió en dos lotes de doce botellas, para la inoculación con levaduras libres (LL) e inmovilizadas como bio-cápsulas (BIO), que a su vez se dividieron en seis botellas de cada lote para la fermentación a distintas temperaturas (10 y 14 °C, respectivamente). La actividad fermentativa se controló a través del incremento de presión dentro de la botella por la formación de CO<sub>2</sub>, mediante un afrómetro in-

terno (Oenotilus, Station Oenotechnique de Champagne, Epernay, France). Transcurridos 15 y 24 meses de crianza a cada temperatura y formato (LL15M10T, LL15M14T, LL24M10T, LL24M14T, BIO15M10T, BIO15M14T, BIO24M10T y BIO24M14T), se procedió al removido, degüelle y apertura de 3 botellas de cada lote para su análisis.

## 2.2. Métodos de análisis

La extracción de los compuestos del aroma se realizó mediante la técnica SBSE, usando Twister® recubiertos con el adsorbente PoliDiMetilSiloxano (PDMS). La identificación de cada compuesto y el cálculo de las superficies relativas con respecto al patrón interno (nonanoato de etilo) se realizó mediante la plataforma analítica GC-MS de Agilent-Gerstel, provista de la Unidad de Desorción Térmica (TDU) y equipada con una columna capilar HP-5 (30 m, 0,25mm, 0,25  $\mu$ m). Las condiciones cromatográficas y del espectro de masas que se utilizaron, fueron descritas por Martínez-García *et al.*, (2017). La identificación de los compuestos se realizó mediante el software Chemstation de Agilent, usando las librerías de espectros Wiley7N y NIST08 y el índice de retención lineal (LRI) calculado, comparado con los recopilados en la página web del NIST.

## 2.3. Análisis estadístico

Los datos de áreas relativas que se muestran en este estudio son una medida semicuantitativa del contenido de cada compuesto y son directamente proporcionales a los contenidos que cada compuesto posee en el vino. Los datos corresponden al análisis de tres botellas (tres réplicas biológicas) analizadas cada una de ellas por triplicado y fueron previamente normalizados ( $\log_{10}$ ) y escalados (escalado Pareto) y posteriormente sometidos al test de Kruskal-Wallis, usando para ello el software Statgraphics Centurion XVI (Manugistics, Inc., Rockville, MD, EEUU). Para visualizar los efectos de las tres fuentes de variación consideradas: formato (factor 1), temperatura (factor 2) y tiempo (factor 3) sobre la fracción volátil de los vinos, se aplicó un análisis de la varianza múltiple de tres factores (MANOVA) y un Análisis Multivariante (MVA) que permitió la obtención de huellas dactilares. Finalmente, se han aplicado técnicas de análisis estadístico no supervisadas de reconocimiento de pautas, como un mapa de calor y análisis de componentes principales (PCA) mediante el programa estadístico MetaboAnalyst 4.0, de libre disposición en internet.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Compuestos minoritarios del aroma

Las Figuras 1, 2 y 3 muestran los valores medios y desviación estándar de las áreas relativas para los 45 compuestos del aroma identificados en los cavas elaborados en las ocho condiciones estudiadas. Los compuestos pertenecen a diversas familias químicas, habiéndose identificado 4 alcoholes, 8 compuestos carbonílicos, 3 ácidos carboxílicos, 17 ésteres, 2 terpenos, 2 norisoprenoides, 5 fenoles volátiles y 4 compuestos furánicos. La mayoría de estos compuestos se han descrito en bibliografía como productos derivados de la actividad fermentativa de la levadura (Cotea, Zanozaga, & Cotea, 2014). Mediante la aplicación del test de Kruskal-Wallis se obtiene que 39 compuestos muestran diferencias significativas ( $\alpha \leq 0.05$ ) entre los cavas elaborados en las 8 condiciones estudiadas y sólo los compuestos numerados 2, 3, 13, 19, 30 y 36 no presentan diferencias al mismo nivel de significación. En la tabla 1, también figuran los niveles de significación al nivel  $\alpha \leq 0.05$ , obtenidos mediante análisis MANOVA usando como fuentes de variación el formato (F), la temperatura ( $T^a$ ), el tiempo (t) y sus interacciones. Los resultados indican que 20 de las 45 variables (compuestos 1, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 17, 25, 28, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 42, 43 y 45) dependen significativamente de las tres fuentes de variación. Por otro lado, dieciséis variables (4, 9, 15, 16, 18, 20-24, 26, 27, 29, 34, 37 y 44) dependen de al menos dos fuentes. Sólo el 4-hidroxi-2-metoxicinamaldehído (10) y 2-metoxi-4-vinilfenol (38), mostraron dependencia únicamente del formato, mientras que 2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol (41) depende sólo de la temperatura.

En la familia de los alcoholes superiores destacan el 3-metil-1-butanol (1) y el 2-feniletanol (3), que presentan los mayores contenidos en los vinos y son importantes contribuyentes a la complejidad de su aroma (**Fig.1.A**). Estos alcoholes tienen su origen en el metabolismo de los azúcares y aminoácidos a través de la ruta de Erlich (Hazelwood, Daran, van Maris, Pronk, & Dickinson, 2008), mientras que los alcoholes de seis átomos de carbono, como el 1-hexanol, proceden de la acción de los enzimas lipoxigenasas y liasas sobre los ácidos grasos insaturados (Cotea *et al.*, 2014). Atendiendo a las fuentes de variación estudiadas (Tabla1), la dependencia del 3-metil-1-butanol y 1-decanol con el formato de levadura y la temperatura se describe por primera vez en este estudio, ya que en estudios previos

(López de Lerma *et al.*, 2018; Puig-Pujol *et al.*, 2013) sobre este tipo de vinos, elaborados con bio-cápsulas de levaduras no se estableció esta relación. La presencia de 1-decanol se detectó sólo en los vinos elaborados con bio-cápsulas, mientras que 3-metil-1-butanol presenta mayores áreas relativas en los vinos elaborados con levaduras en formato libre y dependen significativamente del tiempo de crianza.

Los compuestos carbonílicos se caracterizan por aportar notas cítricas y vegetales frescos al vino (Fig.1.C). En general, los aldehídos y cetonas identificados mostraron dependencia de las tres fuentes de variación. Con excepción del 4-hidroxi-2-metoxicinamaldehído (10) que depende del formato en que se usa la levadura y de la benzofenona (9) que depende de formato y tiempo de crianza (Tabla 1). La levadura inmovilizada aumenta el nivel de esta familia de compuestos, como se ha descrito por López de Lerma *et al.*, (2018). En relación al tiempo y temperatura, la tendencia observada para algunos compuestos no es clara (Fig.1.C), posiblemente debido a la interacción entre las fuentes de variación que presentan decanal, nonanal y 2,4-dihidroxi-5-benzofenona, (Tabla 1). Esto explicaría que los vinos obtenidos con bio-cápsulas a cortos periodos de crianza y ambas temperaturas (BIO15M10T y BIO15M14T), muestren mayores contenidos seguidos de BIO24M14T, mientras que los vinos BIO24M10T mostraron los mínimos valores registrados.

La presencia de ácidos orgánicos de cadena media y larga se atribuye a la respuesta de la levadura frente a las condiciones de estrés de la segunda fermentación (Martínez-García, *et al.*, 2017). En el presente estudio, se obtiene un aumento generalizado de estos compuestos cuando aumenta la temperatura y el tiempo, mostrando mayores niveles los cavas elaborados con bio-cápsulas a los 24 meses (BIO24M10T y BIO24M14T) (Fig.1.B.). Los cambios de cada compuesto se explican por posibles mecanismos de adsorción-desorción en las paredes de la levadura e hidrólisis química o enzimática de sus respectivos ésteres durante la etapa de autólisis (Gallardo-Chacon, Vichi, Lopez-Tamames, & Buxaderas, 2009) de la levadura. De los tres ácidos carboxílicos identificados en este estudio, sólo el ácido decanóico (14) mostró diferencias significativas para los tres factores (Tabla 1). La dependencia de este compuesto con respecto al formato de la levadura ha sido descrita previamente por otros autores (López de Lerma, *et al.*, 2018), sin embargo, es la primera vez que se describen variaciones significativas del ácido hexadecanóico (15) con el formato y el tiempo de crianza.

Los ésteres se caracterizan por aportar notas afrutadas y florales al aroma del vino y como se observa en la Tabla 1, la mayoría de ellos mostraron dependencia a un nivel  $\alpha \leq 0,05$ , con al menos un factor, con excepción de hexanoato de etilo y etil-4-etoxibenzoato. En relación al tiempo y temperatura se observa una tendencia general a la disminución del contenido en ésteres que, de acuerdo a Gallardo-Chacón *et al.*, (2010), está relacionada con sus características hidrofóbicas y su grado de adsorción en las paredes de las células de levadura (Fig. 2.A, B y C). Esto explica los menores niveles de ésteres registrados en las muestras obtenidas a 14°C y 24 meses (LL24M14T y BIO24M14T). Por el contrario, los valores máximos que presentan los vinos BIO24M10T, se explica por la interacción de factores observada en algunos ésteres (17, 21, 23, 25, 27, 31 y 32). Sólo 8 compuestos, en su mayoría ésteres etílicos, mostraron dependencia significativa con el formato de la levadura (16, 17, 21, 25, 26, 28, 31 y 32), lo que coincide con lo descrito por López de Lerma *et al.*, (2018).

Los terpenos y sesquiterpenos (Fig. 3.A.) son también importantes contribuyentes al aroma de los vinos y su dependencia con el formato ha sido descrita para algunos compuestos de esta familia (López de Lerma *et al.*, 2018). El carano es un monoterpeno bicíclico saturado, que como el pinano y el canfano posee olor a resina. Carano (33) y nerolidol (34) dependen también de este factor, mostrando mayores niveles los cavas elaborados con biocápsulas (Tabla 1). La temperatura afecta el nivel de carano, mientras que el tiempo afecta de manera opuesta a estos dos compuestos.

Dentro de los norisoprenoides (Fig. 3.C.), sólo el vitispirano mostró cambios significativos en su contenido para los tres factores y concuerda con lo descrito previamente por López de Lerma *et al.*, (2018) y Riu-Aumatell *et al.*, (2006) (Tabla 1). Los mayores registros para este compuesto se obtuvieron a los 24 meses y 14 °C en los cavas de bio-cápsulas y de células libres (BIO24M14T y LL24M14T).

Los fenoles volátiles (Fig. 3.B.) se caracterizan por aportar notas especiadas al vino y su presencia se atribuye a la actividad vinilfenol reductasa de las levaduras del género *Saccharomyces* y *Brettanomyces* (Cotea *et al.*, 2014). Contrariamente a lo obtenido por López de Lerma *et al.*, (2018), la mayoría de los fenoles volátiles identificados en este estudio mostraron variaciones significativas con formato y la temperatura, a excepción de 2,4-bis(1,1-dimetil) fenol (41) y 2-metoxi-4-vinilfenol, que sólo muestran dependencia de uno de los dos factores citados anteriormente (Tabla 1). En relación

al tiempo, sólo mostraron dependencia isoeugenol y 2-metoxi naftaleno. Los mayores contenidos registrados para esta familia se observaron en vinos LL24M14T y los mínimos para vinos LL15M10T y BIO24M14T.

Los compuestos furánicos (Fig. 3.D) proceden de reacciones no enzimáticas de degradación de los azúcares y su dependencia con factores como tiempo y temperatura ha sido descrita en la bibliografía (Serra-Cayuela, Castellari, Bosch-Fuste, Riu-Aumatell, Buxaderas, & Lopez-Tamames, 2013). Sin embargo, es la primera vez que se describen cambios de furfural, 2-furanmetanol y 5-(hidroximetil) furfural relacionados con el formato de la levadura (Tabla 1).

### 3.2. Análisis estadístico

Mediante el uso de las técnicas de análisis estadístico no supervisadas de reconocimiento de pautas se puede establecer la influencia de los tres factores (formato, temperatura y tiempo) sobre la composición en aromas de los cavas. En primer lugar, se procedió a elaborar un mapa de calor, con objeto de observar los cambios de cada compuesto identificado en el conjunto de muestras. Por otro lado, se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) cuyo objetivo principal es disminuir el número de variables (45) e identificar aquellas que poseen mayor relación con los cambios observados. Por último, mediante un análisis multivariante (MVA) realizado sobre la suma de áreas relativas de cada compuesto, agrupados en familias químicas se obtuvieron huellas dactilares que asocian una causa a su efecto de una forma visual, fácil de entender.

#### 3.2.1. Mapa de Calor

La figura 4 presenta el mapa de calor obtenido para las ocho condiciones analizadas, usando como variables todos los compuestos identificados, la distancia Euclídea y el método de Ward como regla de agrupación y medida de la proximidad entre las muestras consideradas. En la citada figura, se representan en coloración roja intensa y azul los valores de mayor y menor área relativa respectivamente, para los compuestos volátiles analizados en los cavas obtenidos en las distintas condiciones de estudio. El mapa de calor visualiza los valores anormalmente altos o bajos de un mismo colectivo de muestras, que coinciden con los compuestos que no ofrecían variaciones significativas en el apartado 3.1. (2, 3, 13, 19, 30 y 36). Además, se identifi-

can fácilmente los compuestos que sólo se presentan en los cavas elaborados con biocápsulas (1-decanol, propanoato de cis-3-hexenilo y nerolidol) o con células libres (2-metoxinaftaleno). En general, se observa también que los vinos con 24 meses de crianza, presentan un número menor de compuestos del aroma, en comparación con los cavas de 15 meses. Igualmente, se observa para estos últimos un menor contenido en los compuestos 6, 14, 16, 17, 22, 25, 29, 33, 35 y 38, que a su vez son los más característicos de los vinos con 24 meses de crianza en bio-cápsulas (BIO24M14T y BIO24M10T). Por último, los vinos de bio-cápsulas a 15 meses muestran mayores niveles de los compuestos 4, 5, 7, 11, 26, 32, 34, 40, 42, 43 y 45, mientras que los compuestos 15, 18, 20, 21, 24, 23, 27, 31 y 39 caracterizaban a sus homólogos obtenidos con células libres (LL15M10T y LL15M14T).

### 3.2.2. Análisis de Componentes principales

En la Figura 5., se exponen los resultados obtenidos mediante el análisis PCA. Tres componentes principales (CP1, CP2 y CP3) explican el 80% de la varianza total. En una representación del plano definido por CP1 y CP2, los cavas elaborados con bio-cápsulas se sitúan en la parte negativa de la componente CP1, que explica el 33,5% de la varianza y los obtenidas con células libres se localizan en la parte positiva (Fig. 5.A.) al igual que ocurre en el plano definido por CP1 y CP3 (Fig. 5.B.). Por tanto, CP1 explica los cambios relacionados con el formato de levadura, siendo las 7 variables que más influyen las numeradas: 12 (0,184), 15 (0,200), 8 (0,204), 39 (0,399), 34(-0,254), 33 (-0,308) y 26 (-0,360). La componente CP2, que explica el 31,1% de la varianza y agrupa las muestras por el tiempo, localizándose en la zona positiva los espumosos con 15 meses de crianza tanto con levadura en forma libre e inmovilizadas (Fig. 5.A.). En este caso, las variables más correlacionadas son 34 (0,231), 8 (0,242), 26 (0,248), 31 (0,253), 12 (0,269), 45 (0,399), 28 (-0,090), 17 (-0,167), 9 (-0,177) y 33 (-0,313), entre otros. Por último, la componente CP3, que explica el 15,4% de la varianza, pone de manifiesto el efecto de la temperatura y refleja que los vinos obtenidos a 10°C poseen siempre una menor puntuación que sus homólogos de 14°C (Fig.5.B.). Las ocho variables más influyentes en esta región son 1 (0,238), 35(0,249), 8(0,290), 45(0,299), 15 (-0,129), 31(-0,234), 20(-0,257) y 17(-0,272).

Por lo general, la separación entre lotes es clara en el nuevo espacio de componentes principales, con excepción de aquellos vinos obtenidos con bio-cápsulas a 15 meses para ambas temperaturas. Además, para este mis-

mo colectivo de vinos, el efecto de la temperatura es más acusado a tiempos más prolongados. La tendencia contraria se observa para vinos obtenidos con levaduras libres que puede explicarse con las posibles interacciones entre factores. López de Lerma *et al.*, (2018), obtuvieron agrupaciones similares para vinos obtenidos con dos cepas de levadura inoculadas en tres formatos durante el tiraje (libres, inmovilizadas con alginato y bio-cápsulas) y sometidos a 32 meses de crianza. Sin embargo, no se estudió la influencia de la temperatura y tiempo en la fracción volátil de los cavas.

### 3.2.3. Huellas Dactilares

El resultado de la aplicación de MVA se muestra en la Figura 6, que representa los polígonos de ocho lados obtenidos para cada condición. Cada radio del polígono se corresponde con una familia química: 1. Alcoholes; 2. Compuestos carbonílicos; 3. Ácidos; 4. Ésteres y lactonas; 5. Terpenos y sesquiterpenos; 6. Norisoprenoides; 7. Fenoles volátiles y 8. Compuestos furánicos. Este tipo de análisis se ha empleado para estudiar la influencia de factores de estrés, como la presión de CO<sub>2</sub> endógeno, en el metabolismo de la levadura durante etapa de toma de espuma (Martínez-García *et al.*, 2017).

De acuerdo a la Fig.6 se observa que los vinos elaborados con bio-cápsulas presentan huellas de mayor tamaño y más irregulares, comparados con sus homólogos de levaduras libres, siendo las huellas más pequeñas aquellas obtenidas para LL15M10T y LL24M14T. La falta de similitud encontrada en los vinos de bio-cápsulas a largos tiempos de envejecimiento (BIO24M10T y BIO24M14T) contrasta con la similitud de aquellas obtenidas a tiempos cortos (BIO15M10T y BIO15M14T). Este hecho, se corresponde con la proximidad de estas muestras al representarlas en el espacio de componentes principales descrito en el apartado anterior.

En relación al formato utilizado, con independencia del tiempo y temperatura, los vinos de biocápsulas son más ricos en terpenos (5), norisoprenoides (6) y compuestos furánicos (8), comparados con sus homólogos de levaduras libres. Las restantes familias mostraron en su mayoría valores igual o incluso superiores, salvo excepciones. De este modo, se han registrado contenidos mínimos de alcoholes (1) y compuestos carbonílicos (2) en vinos BIO24M10T y de ésteres (4) y fenoles volátiles (7) en los vinos BIO24M14T. Lo que podría explicarse por el efecto de la interacción formato, temperatura y tiempo.

En relación a la temperatura, se observaron mayores contenidos en la familia de compuestos carbonílicos (2), ácidos (3), ésteres y lactonas (4), norisoprenoides (6), fenoles volátiles (7) y compuestos furánicos (8) en los vinos obtenidos a 14°C y ambos lotes. Por el contrario, se registraron menores valores en alcoholes (1) y, ocasionalmente, terpenos (5) al aumentar la temperatura. Esta tendencia es generalizada para todas las condiciones salvo en las familias de alcoholes (1) y fenoles volátiles (7) en los cavas con 24 meses de crianza elaborados con bio-cápsulas.

Por último, las muestras 24 meses presentan una disminución generalizada con de los niveles de alcoholes (1), compuestos carbonílicos (2), ésteres (3), compuestos furánicos (8) y un aumento en los ácidos (3), terpenos y sesquiterpenos (5), norisoprenoides (6) y fenoles volátiles (7) con respecto a las muestras de 15 meses. De nuevo, los vinos BIO24M14T mostraron tendencia opuesta en los contenidos de alcoholes y fenoles volátiles.

#### 4. CONCLUSIONES

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa P29, usada en formato inmobilizado, como bio-cápsulas, permite elaborar vinos espumosos tipo cava, con un perfil de compuestos del aroma característico. Ocho familias químicas (alcoholes, compuestos carbonílicos, ácidos, ésteres, terpenos, norisoprenoides, fenoles volátiles y compuestos furánicos) presentan, en general mayores niveles en los cavas elaborados con bio-cápsulas frente a los elaborados con células libres. Sólo el compuesto 2-metoxi-4-vinilfenol depende significativamente del formato usado, mientras que ningún compuesto depende exclusivamente de la temperatura o del tiempo de crianza y sin embargo, 6 ésteres (18,20,22,24,29 y 44) dependen significativamente a la vez ambas fuentes de variación. Por último 7 compuestos (5,6,11,14,28,40 y 42) dependen significativamente de las tres fuentes consideradas y sin interacciones significativas entre ellos.

Mediante 3 componentes principales, que explican el 80 % de la varianza total, se agrupan las muestras de acuerdo al formato, temperatura y tiempo y permiten seleccionar los compuestos volátiles, responsables del aroma, que más se afectan por cada una de las fuentes de variación estudiadas. Las huellas dactilares obtenidas mediante el análisis de variables múltiples realizado sobre ocho familias químicas permiten diferenciar de una manera visual y fácil de comprender los vinos obtenidos en las ocho condiciones ensayadas.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación al XXIII Programa Propio de Fomento de la Investigación 2018 (MOD 4.2. SINERGIAS, Ref. XXIII PP Mod. 4.2) Universidad de Córdoba y también la colaboración del personal del INCAVI.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

COTEA, D.V.; ZANOZAGA, C.; COTEA, V.V. (2014). Teatrise of Oenochemistry. In E. A. Romane (Ed.), vol. I (pp. 232-288). Bucharest, Romania.

GALLARDO-CHACON J.; VICHI S.; LOPEZ-TAMAMES E.; BUXADERAS, S. (2009). Analysis of Sparkling Wine Lees Surface Volatiles by Optimized Headspace Solid-Phase Microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8), 3279-3285.

GARCIA-MARTINEZ, T.; MORENO, J.; MAURICIO, J.C.; PEINADO, R. (2015). Natural sweet wine production by repeated use of yeast cells immobilized on *Penicillium chrysogenum*. *Lwt-Food Science and Technology*, 61(2), 503-509.

GARCIA-MARTINEZ, T.; PEINADO, R.A.; MORENO, J.; GARCIA-GARCIA, I.; MAURICIO, J.C. (2011). Co-culture of *Penicillium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* leading to the immobilization of yeast. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(6), 812-817.

GARCIA-MARTINEZ, T.; PUIG-PUJOL, A.; PEINADO, R.A.; MORENO, J.; MAURICIO, J.C. (2012). Potential use of wine yeasts immobilized on *Penicillium chrysogenum* for ethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(3), 351-359.

GIOVENZANA, V.; BEGHI, R.; VAGNOLI, P.; IACONO, F.; GUIDETTI, R.; NARDI, T. (2016). Evaluation of Energy Saving Using a New Yeast Combined with Temperature Management in Sparkling Base Wine Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(3), 308-314.

HAZELWOOD, L.A.; DARAN, J.M.; VAN MARIS, A.J.A.; PRONK, J.T.; DICKINSON, J.R. (2008). The ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism (vol 74, pg 2259, 2008). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3920-3920.

KEMP, B.; ALEXANDRE, H.; ROBILLARD, B.; MARCHAL, R. (2015). Effect of Production Phase on Bottle-Fermented Sparkling Wine Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(1), 19-38.

KOURKOUTAS, Y.; MANOJLOVIC, V.; NEDOVIC, V.A. (2010). *Immobilization of Microbial Cells for Alcoholic and Malolactic Fermentation of Wine and Cider*. New York: Springer.

LOPEZ DE LERMA, N.; PEINADO, R.A.; PUIG-PUJOL, A.; MAURICIO, J. C.; MORENO, J.; GARCIA-MARTINEZ, T. (2018). Influence of two yeast strains in free, bioimmobilized or immobilized with alginate forms on the aromatic profile of long aged sparkling wines. *Food Chemistry*, 250, 22-29.

MARTINEZ-GARCIA, R.; GARCIA-MARTINEZ, T.; PUIG-PUJOL, A.; MAURICIO, J.C.; MORENO, J. (2017). Changes in sparkling wine aroma during the second fermentation under CO<sub>2</sub> pressure in sealed bottle. *Food Chem*, 237, 1030-1040.

MORENO-GARCIA, J.; GARCIA-MARTINEZ, T.; MAURICIO, J.C.; MORENO, J. (2018). Yeast Immobilization Systems for Alcoholic Wine Fermentations: Actual Trends and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 9, 13.

MUNOZ-REDONDO, J.M.; CUEVAS, F.J.; LEON, J.M.; RAMIREZ, P.; MORENO-ROJAS, J.M.; RUIZ-MORENO, M.J. (2017). Quantitative Profiling of Ester Compounds Using HS-SPME-GC-MS and Chemometrics for Assessing Volatile Markers of the Second Fermentation in Bottle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(13), 2768-2775.

PEINADO, R.A.; MORENO, J.J.; VILLALBA, J.M.; GONZALEZ-REYES, J. A.; ORTEGA, J.M.; MAURICIO, J.C. (2006). Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1), 79-84.

POZO-BAYON, M.A.; MARTIN-ALVAREZ, P.J.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; ANDUJAR-ORTIZ, I.; PUEYO, E. (2010). Impact of using Trepát and Monastrell red grape varieties on the volatile and nitrogen composition during the manufacture of rose Cava sparkling wines. *Lwt-Food Science and Technology*, 43(10), 1526-1532.

POZO-BAYON, M.A.; PUEYO, E.; MARTIN-ALVAREZ, P.J.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A.J.; POLO, M.C. (2003). Influence of yeast strain, bentonite addition, and aging time on volatile compounds of sparkling wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(4), 273-278.

PUIG-PUJOL, A.; BERTRAN, E.; GARCIA-MARTINEZ, T.; CAPDEVILA, F.; MINGUEZ, S. y CARLOS MAURICIO, J. (2013). Application of a New Organic Yeast Immobilization Method for Sparkling Wine Production. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64(3), 386-394.

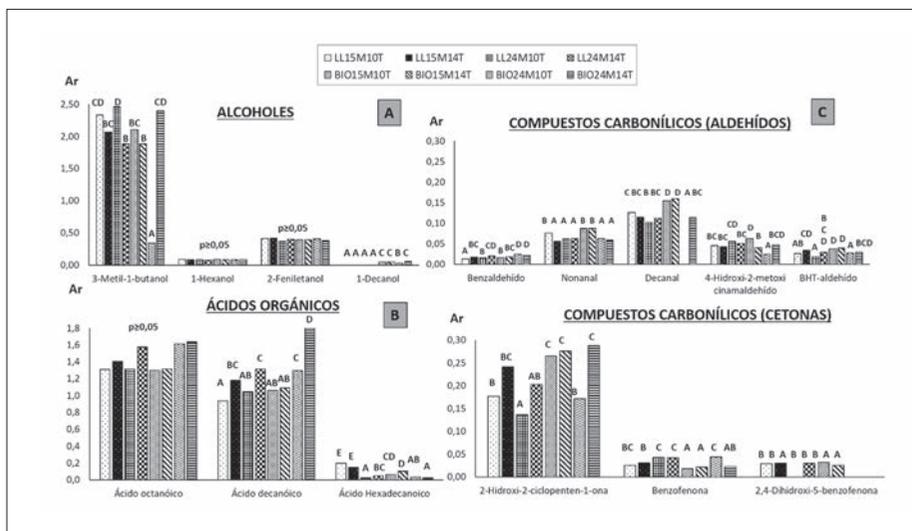
RIU-AUMATELL, M.; BOSCH-FUSTE, J.; LOPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. (2006). Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. *Food Chemistry*, 95(2), 237-242.

RUIZ-MORENO, M.J.; MUNOZ-REDONDO, J.M.; CUEVAS, F.J.; MARRUFO-CURTIDO, A.; LEON, J.M.; RAMIREZ, P.; MORENO-ROJAS, J.M. (2017). The influence of pre-fermentative maceration and ageing factors on ester profile and marker determination of Pedro Ximenez sparkling wines. *Food Chemistry*, 230, 697-704.

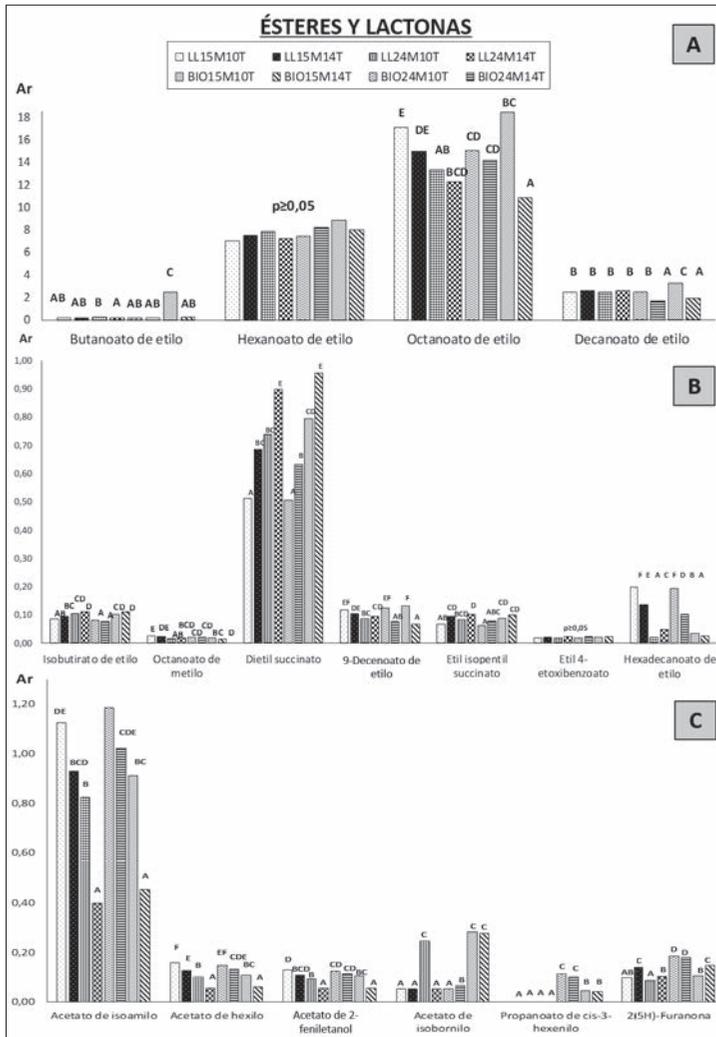
SERRA-CAYUELA, A.; CASTELLARI, M.; BOSCH-FUSTE, J.; RIU-AUMATELL, M.; BUXADERAS, S.; LOPEZ-TAMAMES, E. (2013). Identification of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) in Cava sparkling wines by LC-DAD-MS/MS and NMR spectrometry. *Food Chemistry*, 141(4), 3373-3380.

TORRESI, S.; FRANGIPANE, M. T.; y ANELLI, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chemistry*, 129(3), 1232-1241.

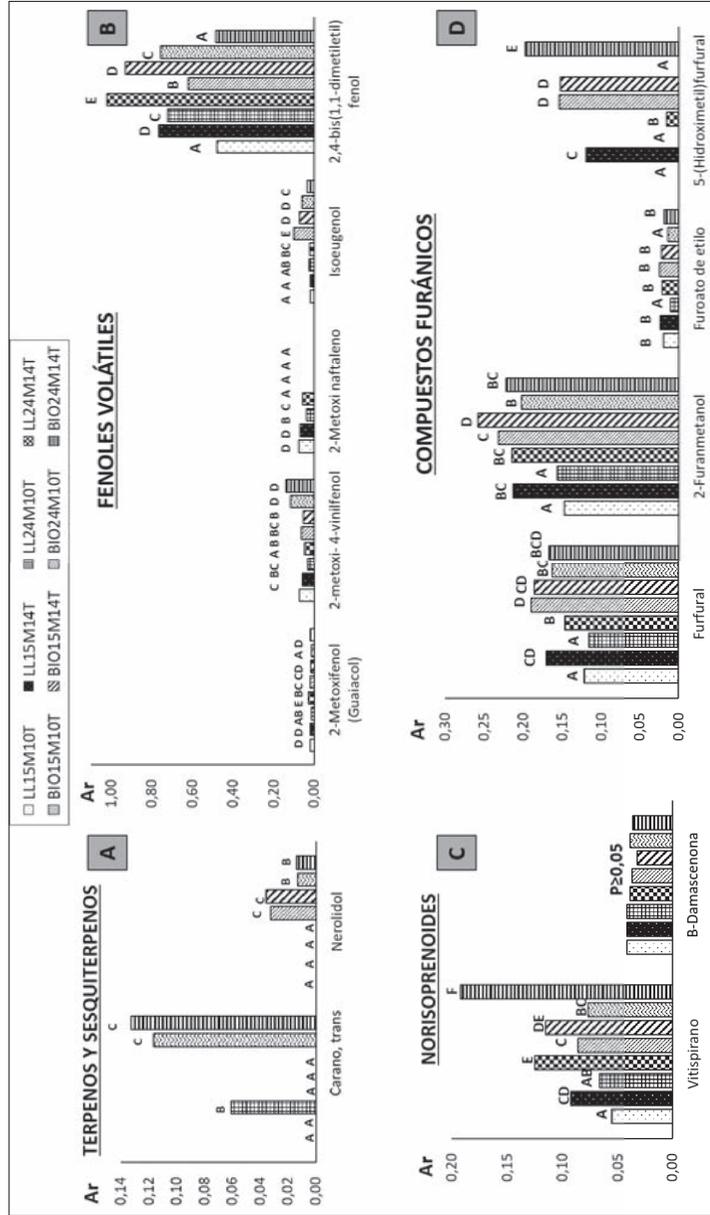
**Figura 1.** Valores medios de la fracción de alcoholes (A), ácidos (B) y compuestos carbonílicos (C). Distintas letras indican diferencias significativas entre grupos homogéneos formados por los ocho tipos de muestras. LL:- Libres y BIO: Biocápsulas. 15M10T: 15 meses crianza y 10°C; 15M14T: 15 meses de crianza y 14°C; 24M10T: 24 meses de crianza y 10°C; 24M14T: 24 meses de crianza y 14°C.



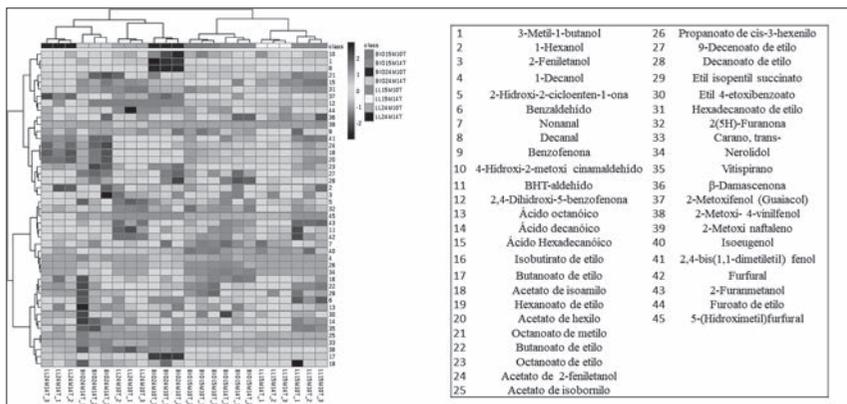
**Figura 2.** Valores medios de la fracción de ésteres etílicos (A y B), acetatos, lactonas y otros ésteres (C). Distintas letras indican diferencias significativas entre grupos homogéneos formados por los ocho tipos de muestras. LL: Libres y BIO: Biocápsulas. 15M10T: 15 meses crianza y 10°C; 15M14T: 15 meses de crianza y 14°C; 24M10T: 24 meses de crianza y 10°C; 24M14T: 24 meses de crianza y 14°C.



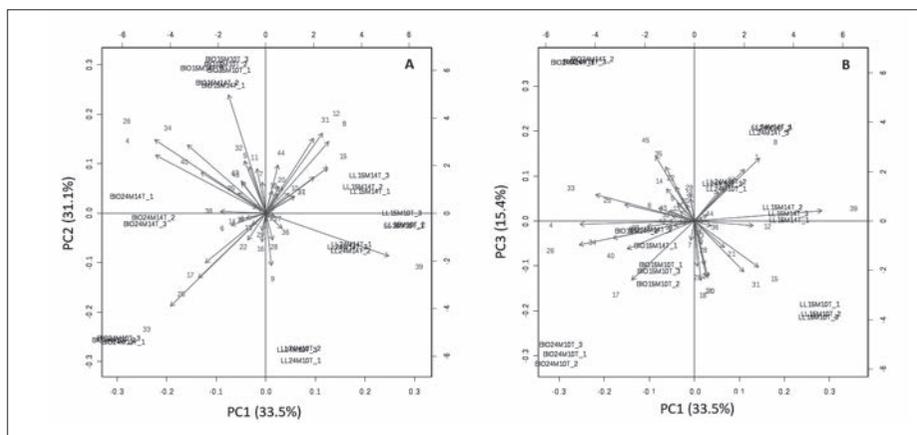
**Figura 3.** Valores medios de la fracción de terpenos y sesquiterpenos (A), fenoles volátiles (B), norisoprenoides (C) y compuestos furánicos (D). Distintas letras indican diferencias significativas entre grupos homogéneos formados por los ocho tipos de muestras. LL:Libres y BIO: Biocápsulas. 15M10T: 15 meses crianza y 10°C; 15M14T: 15 meses de crianza y 14°C; 24M10T: 24 meses de crianza y 10°C; 24M14T: 24 meses de crianza y 14°C.



**Figura 4.** Mapa de calor para los 24 vinos, basado en la distancia Euclídea. LL: células libres; BIO: biocápsulas tomadas a dos temperaturas (10 y 14°C) después de 15 y 24 meses de crianza.

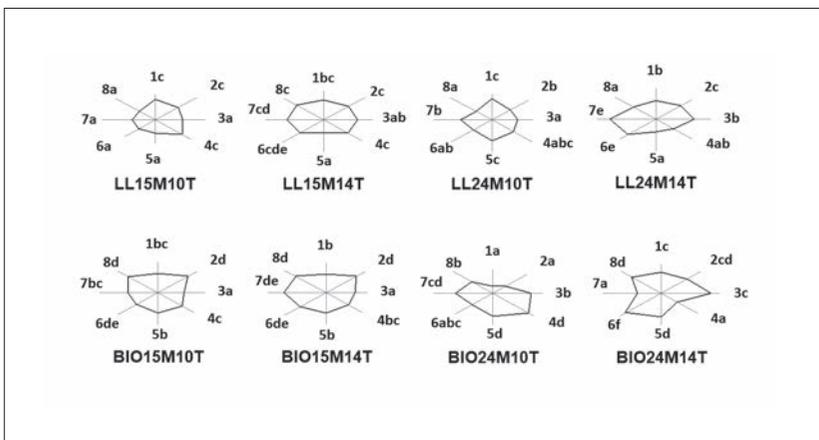


**Figura 5.** Análisis de componentes principales realizado con las áreas relativas de la fracción de compuestos volátiles minoritarios. Fig. 5.A. Biplot para componentes PC2vsPC1. Fig. 5.B. Biplot para PC3vs.PC1. Para la identificación de las muestras véase Figura 1.



**Figura 6.** Huella dactilar para cavas obtenidos por MVA de los compuestos volátiles agrupados por familias químicas. Cada radio del polígono corresponde a una familia química: 1. Alcoholes. 2. Aldehídos y cetonas. 3. Ácidos. 4. Ésteres y lactonas. 5. Terpenos y sesquiterpenos. 6. Norisoprenoides. 7. Fenoles volátiles. 8. Compuestos furánicos. La distancia desde el centro a cada vértice corresponde al valor de cada grupo. El final del radio es la media más tres veces la desviación estándar y el centro la media menos tres veces la desviación estándar. a. b. c. e Diferentes letras en la misma familia indican diferencias significativas de los datos previamente normalizados y escalados al 0.05 de confianza según el test de significación de Kruskal Wallis.

Para identificación de las muestras ver figura 1.



**Tabla 1.** Compuestos identificados por Espectrometría de masas y grado de significación ( $p \leq 0,05$ ) obtenido por MANOVA. Fuentes de variación: F= Formato, T<sup>a</sup>= Temperatura y t=tiempo y sus interacciones (F<sub>x</sub>T<sup>a</sup>, F<sub>x</sub>t, T<sup>a</sup>x<sub>t</sub>, F<sub>x</sub>T<sup>a</sup>x<sub>t</sub>).

Nº	COMPUESTO	F	T <sup>a</sup>	t	F <sub>x</sub> T <sup>a</sup>	F <sub>x</sub> t	T <sup>a</sup> x <sub>t</sub>	F <sub>x</sub> T <sup>a</sup> x <sub>t</sub>
1	3-Metil-1-butanol1	s	s	s	s	s	s	s
2	1-Hexanol1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3	2-Feniletanol1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
4	1-Decanol1	s	s	ns	s	ns	ns	ns
5	2-Hidroxi-2-ciclopenten-1-ona2	s	s	s	ns	ns	s	ns
6	Benzaldehído2	s	s	s	s	ns	s	ns
7	Nonanal2	s	s	s	ns	s	ns	s
8	Decanal2	s	s	s	s	s	s	s
9	Difenilmetanona (Benzofenona)2	s	ns	s	s	ns	s	ns
10	4-Hidroxi-2-metoxi cinamalaldehído2	s	ns	ns	ns	s	s	s
11	BHT-aldehído2	s	s	s	ns	ns	ns	ns
12	2,4-Dihidroxi-5-benzofenona2	s	s	s	s	s	s	s
13	Ácido octanóico3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
14	Ácido decanóico3	s	s	s	ns	s	ns	ns
15	Ácido Hexadecanoico3	s	ns	s	ns	s	ns	s
16	Isobutirato de etilo4	s	ns	s	ns	ns	ns	ns
17	Butanoato de etilo4	s	s	s	s	s	s	s
18	Acetato de isoamilo4	ns	s	s	ns	s	s	ns
19	Hexanoato de etilo4	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
20	Acetato de hexilo4	ns	s	s	ns	ns	s	ns
21	Octanoato de metilo4	s	ns	s	ns	ns	ns	s
22	Dietil succinato4	ns	s	s	ns	ns	ns	ns

23	Octanoato de etilo <sup>4</sup>	ns	s	s	s	s	s	s
24	Acetato de 2-feniletanol <sup>4</sup>	ns	s	s	ns	ns	s	ns
25	Acetato de isobornilo <sup>4</sup>	s	s	s	s	s	s	s
26	Propanoato de cis-3-hexenilo <sup>4</sup>	s	ns	s	ns	s	ns	ns
27	9-Decenoato de etilo <sup>4</sup>	ns	s	s	s	ns	ns	s
28	Decanoato de etilo <sup>4</sup>	s	s	s	s	s	ns	ns
29	Etil isopentil succinato <sup>4</sup>	ns	s	s	ns	ns	ns	ns
30	Etil 4-etoxibenzoato <sup>4</sup>	ns						
31	Hexadecanoato de etilo <sup>4</sup>	s	s	s	s	ns	s	s
32	2(5H)-Furanona <sup>4</sup>	s	s	s	ns	s	ns	s
33	Carano, trans-5	s	s	s	s	s	s	s
34	Nerolidol <sup>5</sup>	s	ns	s	ns	s	ns	ns
35	Vitispirano <sup>6</sup>	s	s	s	ns	ns	s	s
36	$\beta$ -Damascenona <sup>6</sup>	ns						
37	2-Metoxifenol (Guaiacol) <sup>7</sup>	s	s	ns	s	ns	s	ns
38	2-metoxi- 4-vinilfenol <sup>7</sup>	s	ns	ns	ns	s	s	ns
39	2-Metoxi naftaleno <sup>7</sup>	s	s	s	s	s	s	s
40	Isoeugenol <sup>7</sup>	s	s	s	s	s	ns	ns
41	2,4-bis(1,1-dimetiletil) fenol <sup>7</sup>	ns	s	ns	s	s	s	s
42	Furfural <sup>8</sup>	s	s	s	s	ns	ns	ns
43	2-Furanmetanol <sup>8</sup>	s	s	s	s	s	s	s
44	Furoato de etilo <sup>8</sup>	ns	s	s	s	ns	s	ns
45	5-(Hidroxi metil) furfural <sup>8</sup>	s	s	s	s	s	s	s

s: Significativa, ns: no significativa. Superíndices indican la familia química a la que pertenece cada compuesto: 1 alcoholes. 2 compuestos carbonílicos. 3 ácidos carboxílicos. 4 ésteres y lactonas. 5 terpenos y sesquiterpenos. 6 norisoprenoides. 7 fenoles volátiles. 8 compuestos furánicos.