UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

**APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS EN LA CRIANZA SOBRE LÍAS Y
ENVEJECIMIENTO DE VINOS TINTOS**

Tesis Doctoral

JUAN MANUEL DEL FRESNO FLÓREZ

(Ingeniero Agrónomo)

Madrid 2019

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

Departamento de Química y Tecnología de Alimentos

**APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS EN LA CRIANZA SOBRE LÍAS Y
ENVEJECIMIENTO DE VINOS TINTOS**

Tesis Doctoral

JUAN MANUEL DEL FRESNO FLÓREZ

(Ingeniero Agrónomo)

Director

ANTONIO MORATA BARRADO

(Profesor de Química y Tecnología de Alimentos)

Madrid 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi maestro y tutor de tesis, Antonio Morata Barrado, por haberme formado de manera excepcional durante estos años. Su gran trabajo y dedicación, además de la confianza depositada, han hecho posible que se realizara este trabajo. Su pasión por la ciencia es claramente contagiosa y se traduce en los logros que su grupo de investigación es capaz de conseguir.

Agradezco al profesor José Antonio Suárez-Lepe la confianza depositada, que junto con su ayuda diaria me ha permitido complementar mi formación, sintiéndome orgulloso de estos años de trabajo.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, aunque también maestros, Iris y Carlos, por su ayuda para resolver todos los problemas que han ido apareciendo durante este trabajo y demostrando que un buen equipo es lo más importante.

A Rafael Cuerda, por su excelente trabajo para la aplicación industrial de las investigaciones, realizando una colaboración excepcional con Bodegas Comenge.

Agradezco al Profesor Jorge M. Ricardo da Silva del Instituto Superior de Agronomía de la Universidad de Lisboa por formarme durante mi estancia de investigación, donde la ayuda de Daniel y Diana fue fundamental y permitió enriquecer este trabajo.

Gracias a los compañeros del Departamento de Química y Tecnología de Alimentos por su ayuda, consejos y buenos momentos. Wendu, María Jesús, Karen, Carmen, María Antonia y Felipe. Gracias también a Cristian, Juan Antonio, José Antonio y Paco, por su ayuda en esos largos días de análisis en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros de piso, Miki, Joserra y Dani, por apoyarme y aguantarme en los momentos más difíciles de estos años.

A mi familia, y en especial a mis padres por confiar siempre en mí y animarme a dedicarme a lo que realmente me gusta. Os dedico este trabajo.

RESUMEN

La “crianza sobre lías” consiste en el contacto prolongado del vino con las lías. Durante esta particular crianza se produce la autólisis celular que implica la liberación de compuestos celulares al vino que interaccionan con el mismo, modificando sus características físico-químicas y sensoriales. Estas modificaciones, tienen especial interés para la obtención de vinos tintos de calidad. La principal desventaja de la técnica es su lentitud, ya que son necesarios al menos 9 meses para apreciar sus efectos. En este trabajo se han evaluado varias técnicas basadas en la aplicación de ultrasonidos para acelerar la crianza sobre lías. Además, se efectuó un estudio comparativo de barricas comerciales que permitió obtener información sobre la elección de la mejor barrica que se adapte a este tipo de crianzas. Mediante la sonicación de vinos tintos y medios modelo en presencia de lías de levadura se logró acelerar la lisis celular, identificada por un aumento del 50% en la concentración de polisacáridos parietales. Algunos parámetros químicos del vino se alteraron claramente por el tratamiento de ultrasonidos, produciéndose una reducción en el contenido de pigmentos totales de un 50% e incrementándose la concentración de oxígeno disuelto hasta 3,7 mg/L durante el tratamiento con ultrasonidos. Además, estos vinos presentaron una mala calidad sensorial identificada por un panel de cata. Por otra parte, la adición de lías de levadura previamente sonicadas permitió acelerar la autólisis celular sin los efectos perjudiciales que supone la sonicación de vinos. Se redujo el oxígeno disuelto y se incrementó el contenido en polisacáridos en un 20%. Se conservó una mayor cantidad de pigmentos totales, sin existir una variación significativa en la fracción de volátiles de origen fermentativo, índice de polifenoles totales o tonalidad. Además, la combinación de esta técnica con la adición de chips de roble dio lugar a vinos complejos, identificados como de gran calidad sensorial por un panel de cata experto. Al aplicar esta técnica a mayor escala, los resultados de oxígeno disuelto indicaron que la capacidad antioxidante de las lías fue anulada con sólo pequeñas variaciones respecto del vino control. El estudio comparativo de barricas de roble dio lugar a vinos de perfil aromático totalmente diferente, lo que indicó que además de la información aportada por la tonelería deben de tenerse en cuenta otros parámetros, como la cuantificación de compuestos volátiles cedidos por la madera de roble.

Palabras clave: crianza sobre lías, ultrasonidos, polisacáridos, oxígeno disuelto, antocianos y piranoantocianos, volátiles de fermentación, volátiles de madera de roble.

SUMMARY

The ageing on lees involves prolonged contact between the wine and the lees. The cell autolysis is produced during this particular ageing that involves the release of cell components into the wine that interacts with the wine's physico-chemical and sensory characteristics. These modifications are of special interest to obtain high quality red wines. The main drawback is that it is a slow process. Nine months are necessary to obtain perceptible effects in wines. This work evaluated several ultrasound techniques to accelerate the ageing on lees process. In addition, a comparative study of commercial barrels was done to obtain information about the best barrel for this ageing. The sonication of red wines and model media allowed the acceleration of yeast autolysis. This was identified by a 50% increase in the polysaccharide content. Some chemical parameters of the wine were clearly altered by the ultrasound treatment. A decrease of total pigments content around 50% and an increase of dissolved oxygen content up to 3.7 mg/L were identified during the ultrasound treatment. In addition, these wines showed a bad quality identified by a taste panel. In the other hand, the addition of previously sonicated lees accelerated the yeast autolysis avoiding the detrimental effects which were produced by wine sonication. The antioxidant capacity and the polysaccharides content were increased by 20 %. A greater quantity of pigments was preserved without significant variation in the fermentative volatile fraction, total polyphenol index and tonality. In addition, the combination of this technique with the addition of oak chips resulted in complex wines with high quality according to the expert taste panel. The application of this technique on a large scale entailed the annulation of the antioxidant capacity of the lees. The analyses only showed small differences with respect to the control wine. The comparative study of oak barrels resulted in wines with different aromatic profile. These results indicated that, in addition to the information provided by the cooperage, other parameters must be taken into account, such as the quantification of volatile compounds from oak wood.

Keywords: ageing on lees, ultrasound, polysaccharides, dissolved oxygen, anthocyanins and pyranoanthocyanins, fermentative volatile compounds, oak wood volatile compounds.

ÍNDICE

<i>ÍNDICE DE TABLAS.....</i>	<i>XVII</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS.....</i>	<i>XIX</i>
<i>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</i>	<i>1</i>
<i>1.1 La Crianza sobre lías en vinos tintos.....</i>	<i>3</i>
1.1.1 La pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.1.2 La autólisis celular.....	5
1.1.3 Liberación de compuestos celulares al vino y su aportación físico-química y sensorial.....	6
1.1.4 Otros efectos de la CSL sobre los vinos envejecidos.....	8
1.1.5 Métodos para la aceleración de la CSL.....	9
<i>1.2 La tecnología del ultrasonido.....</i>	<i>12</i>
1.2.1 Fundamento del uso de US.....	12
1.2.2 Aplicación de US en la industria alimentaria.....	13
1.2.3 Aplicaciones enológicas del US.....	15
<i>1.3 Parámetros de calidad en vinos tintos.....</i>	<i>16</i>
1.3.1 Compuestos fenólicos.....	16
1.3.2 Compuestos aromáticos.....	21
1.3.2.1 Aromas primarios.....	23
1.3.2.2 Aromas secundarios.....	24
1.3.2.3 Aromas terciarios.....	27
<i>1.4 Objetivos.....</i>	<i>31</i>

<i>CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS.....</i>	<i>33</i>
<i>2.1 Particularidades de los ensayos realizados.....</i>	<i>35</i>
2.1.1 Ensayo 1. Sonicación de vinos durante la CSL.....	35
2.1.2 Ensayo 2. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala laboratorio).....	39
2.1.3 Ensayo 3. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala semi-industrial).....	42
2.1.4 Ensayo 4. Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares.....	45
<i>2.2 Obtención de biomasa de levadura.....</i>	<i>47</i>
<i>2.3 Vinos tintos, medios modelo y chips de roble utilizados.....</i>	<i>49</i>
<i>2.4 Tratamiento de ultrasonidos.....</i>	<i>50</i>
<i>2.5 Análisis de parámetros enológicos básicos.....</i>	<i>51</i>
<i>2.6 Análisis de oxígeno disuelto.....</i>	<i>52</i>
<i>2.7 Análisis espectrofotométricos.....</i>	<i>52</i>
<i>2.8 Análisis de actividad tánica específica (ATE).....</i>	<i>54</i>
<i>2.9 Análisis de polisacáridos liberados durante la autólisis celular por HPLC-RI....</i>	<i>54</i>
<i>2.10 Análisis de compuestos volátiles procedentes de la fermentación por GC-FID.....</i>	<i>55</i>
<i>2.11 Análisis de compuestos volátiles procedentes de la variedad de uva y de la madera de roble por GC-MS.....</i>	<i>57</i>
<i>2.12 Análisis de antocianos y piranoantocianos por HPLC-DAD.....</i>	<i>58</i>
<i>2.13 Análisis de proantocianidinas.....</i>	<i>60</i>

<i>2.14 Análisis sensorial.....</i>	<i>62</i>
<i>2.15 Análisis estadístico.....</i>	<i>62</i>
<i>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i>	<i>63</i>
<i>3.1 Ensayo 1. Sonicación de vinos durante la crianza sobre lías (CSL).....</i>	<i>65</i>
3.1.1 Polisacáridos liberados durante la autólisis celular.....	66
3.1.2 Evolución del contenido en oxígeno disuelto durante el envejecimiento.....	67
3.1.3 Evolución de la acidez volátil durante el envejecimiento.....	70
3.1.4 Evolución de parámetros de color durante el envejecimiento.....	71
3.1.5 Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) durante el envejecimiento.....	74
3.1.6 Contenido en proantocianidinas al finalizar el periodo de envejecimiento.....	75
3.1.7 Actividad tánica específica al finalizar el periodo de envejecimiento.....	76
3.1.8 Evolución del contenido en antocianos y piranoantocianos durante el envejecimiento.....	77
3.1.9 Contenido en antocianos y piranoantocianos al finalizar el periodo de envejecimiento.....	80
3.1.10 Compuestos terpénicos identificados tras finalizar el envejecimiento.....	84
3.1.11 Evolución de compuestos volátiles procedentes de la fermentación durante el envejecimiento.....	85
3.1.12 Compuestos volátiles procedentes de la fermentación al finalizar el periodo de envejecimiento.....	89

3.1.13 Volátiles procedentes de la madera de roble al finalizar el periodo de envejecimiento.....	92
---	----

3.1.14 Análisis sensorial de los vinos envejecidos.....	95
---	----

3.2 Ensayo 2. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala laboratorio)...97

3.2.1 Efectos visibles del tratamiento con US sobre lías de levadura húmeda, liberación de polisacáridos durante el envejecimiento y tiempo de decantación en muestras de medio modelo.....	98
---	----

3.2.2 Evolución del contenido en oxígeno disuelto durante el envejecimiento.....	101
--	-----

3.2.3 Evolución de la acidez volátil durante el envejecimiento.....	103
---	-----

3.2.4 Evolución de parámetros de color durante el envejecimiento.....	104
---	-----

3.2.5 Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) durante el envejecimiento.....	106
--	-----

3.2.6 Evolución del contenido en antocianos y piranoantocianos durante el envejecimiento.....	107
---	-----

3.2.7 Contenido en antocianos y piranoantocianos al finalizar el periodo de envejecimiento.....	110
---	-----

3.2.8 Evolución de compuestos volátiles procedentes de la fermentación durante el envejecimiento.....	114
---	-----

3.2.9 Compuestos volátiles procedentes de la fermentación al finalizar el periodo de envejecimiento.....	117
--	-----

3.2.10 Volátiles procedentes de la madera de roble al finalizar el periodo de envejecimiento.....	121
---	-----

3.2.11 Análisis sensorial de los vinos envejecidos.....	124
---	-----

3.3 Ensayo 3. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala semi-industrial).....127

3.3.1 Efectos visibles del tratamiento con US sobre lías de levadura húmeda.... 128

3.3.2 Evolución del contenido en oxígeno disuelto durante el envejecimiento.....129

3.3.3 Evolución de la acidez volátil durante el envejecimiento.....130

3.3.4 Evolución de parámetros de color durante el envejecimiento.....131

3.3.5 Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) durante el envejecimiento.....133

3.3.6 Evolución del contenido en antocianos y piranoantocianos durante el envejecimiento.....134

3.3.7 Contenido en antocianos y piranoantocianos al finalizar el periodo de envejecimiento.....136

3.3.8 Evolución de compuestos volátiles procedentes de la fermentación durante el Envejecimiento.....137

3.3.9 Compuestos volátiles procedentes de la fermentación al finalizar el periodo de envejecimiento.....139

3.4 Ensayo 4. Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares.....141

3.4.1 Evolución de los parámetros de color e índice de polifenoles totales (IPT) durante el envejecimiento.....142

3.4.2 Evolución del contenido en antocianos y piranoantocianos durante el envejecimiento.....145

3.4.3 Evolución de fenoles volátiles.....148

3.4.4 Evolución de compuestos furánicos.....149

3.4.5 Evolución del contenido en lactonas.....	151
3.4.6 Evolución de aldehídos y alcoholes fenólicos.....	152
3.4.7 Evolución del contenido en 4-etilfenol.....	154
3.4.8 Compuestos volátiles de la madera de roble al finalizar el envejecimiento.....	155
<i>CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES.....</i>	159
<i>CONCLUSIONS.....</i>	163
<i>CAPÍTULO V. REFERENCIAS.....</i>	165
<i>ANEXO I. Publicaciones científicas.....</i>	179

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Barricas utilizadas en el ensayo 4. Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares	46
Tabla 2. Diseño experimental del ensayo 1. Sonicación de vinos durante la CSL.....	65
Tabla 3. Pigmentos identificados tras 135 días de envejecimiento.....	82
Tabla 4. Volátiles de fermentación tras 120 días de envejecimiento	91
Tabla 5. Diseño experimental del ensayo 2. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala laboratorio).....	97
Tabla 6. Pigmentos identificados tras 60 días de envejecimiento en ensayo 2	112
Tabla 7. Volátiles de fermentación tras 60 días de envejecimiento (mg/L) en el ensayo 2.....	119
Tabla 8. Diseño experimental del ensayo 3. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala semi-industrial).....	127
Tabla 9. Pigmentos identificados tras 354 días de envejecimiento en el ensayo 3.....	136
Tabla 10. Volátiles de fermentación al finalizar el periodo de envejecimiento (mg/L) en el ensayo 3.....	140
Tabla 11. Diseño experimental del ensayo 4. Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la membrana plasmática y pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
Figura 2. Clasificación de los compuestos fenólicos en vinos tintos.....	17
Figura 3. Formación de Vitisinas A y B en vinos tintos.....	20
Figura 4. Formación de piranoantocianos vinilfenólicos.....	21
Figura 5. Compuestos aromáticos de los vinos de crianza.....	22
Figura 6. Esquema de ejecución del ensayo 1. Sonicación de vinos durante la CSL.....	37
Figura 7. Esquema de ejecución del ensayo 2. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala laboratorio).....	40
Figura 8. Esquema de ejecución del ensayo 3. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala semi-industrial).....	43
Figura 9. Esquema de ejecución del ensayo 4. Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares.....	45
Figura 10. Esquema de obtención de biomasa de levadura para los ensayos 1 y 2.....	48
Figura 11. Fermentador para elaboración de biomasa de levadura a escala semi-industrial.....	48
Figura 12. Equipo UP400ST y sonotrodo H22DL2 para la sonicación de muestras de vino y de biomasa de levadura húmeda.....	50
Figura 13. Equipo Oenofoss para medida de parámetros enológicos básicos.....	51
Figura 14. Oxímetro HI9146V para medida de oxígeno disuelto.....	52
Figura 15. Espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible para la medida de IC, T, IPT y tiempo de decantación.....	53
Figura 16. Equipo HPLC-IR para medida de polisacáridos.....	55
Figura 17. Equipo GC-FID para medida de volátiles de fermentación.....	56

Figura 18. Equipo GC-MS para la medida de volátiles de la madera de roble y compuestos terpénicos.....	58
Figura 19. Equipo HPLC-DAD para la medida de antocianos y piranoantocianos	59
Figura 20. Esquema de método de extracción y análisis de proantocianidinas	61
Figura 21. Procedimiento experimental del ensayo 1. Sonicación de vinos durante la CSL.....	66
Figura 22. Polisacáridos (mg/L) liberados durante la CSL en medio modelo en ensayo 1	67
Figura 23. Evolución de oxígeno disuelto (mg/L) durante el envejecimiento de medio modelo (a) y vinos (b) en el ensayo 1	69
Figura 24. Acidez volátil (g/L) expresado como ácido acético durante el envejecimiento de vinos del ensayo 1	71
Figura 25. Evolución de la intensidad colorante (unidades de absorbancia) (a) y la tonalidad (adimensional) (b) a lo largo del envejecimiento del ensayo 1	73
Figura 26. Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) (adimensional) a lo largo del envejecimiento del ensayo 1	74
Figura 27. Fracción de proantocianidinas (mg/L) al finalizar el periodo de envejecimiento del ensayo 1	76
Figura 28. Actividad tánica específica (ATE) al finalizar el periodo de envejecimiento en el ensayo 1	77
Figura 29. Evolución del contenido en antocianos y piranoantocianos (mg/L) a lo largo del envejecimiento del ensayo 1	79
Figura 30. Proyección de las dos primeras componentes del análisis de componentes principales (ACP) de los pigmentos tras 135 días de envejecimiento en ensayo 1	83
Figura 31. Linalol y α -terpineol en vinos envejecidos en el ensayo 1	85

Figura 32. Evolución de volátiles de fermentación (mg/L) a través del envejecimiento en el ensayo 1	88
Figura 33. Compuestos volátiles procedentes de la madera de roble al finalizar el envejecimiento en el ensayo 1	94
Figura 34. Análisis sensorial de los vinos envejecidos efectuado por panel entrenado de 9 jueces al finalizar el envejecimiento del ensayo 1	96
Figura 35. Procedimiento experimental del ensayo 2. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala laboratorio).....	98
Figura 36. (a) Lías sin tratamiento con US. (b) lías tras 20 minutos de tratamiento con US. (C) Polisacáridos (mg/L) liberados durante la CSL en medio modelo. (d) Tiempo de decantación por medición espectrofotométrica (unidades de absorbancia)	100
Figura 37. Evolución de oxígeno disuelto (mg/L) durante el envejecimiento de vinos (a) y medios modelo (b) en ensayo 2	102
Figura 38. Acidez volátil (g/L) expresado como ácido acético durante el envejecimiento de vinos del ensayo 2.....	103
Figura 39. Evolución de la intensidad colorante (unidades de absorbancia) (a) y la tonalidad (adimensional) (b) a lo largo del envejecimiento de los vinos del ensayo 2	105
Figura 40. Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) a lo largo del envejecimiento en el ensayo 2.....	106
Figura 41. Evolución del contenido en antocianos y piranoantocianos a lo largo del envejecimiento en el ensayo 2	109
Figura 42. Proyección de las dos primeras componentes del análisis de componentes principales (ACP) de los pigmentos tras 60 días de envejecimiento	113
Figura 43. Evolución de volátiles de fermentación a través del envejecimiento (mg/L) en el ensayo 2	116

Figura 44. Proyección de las dos primeras componentes del análisis de componentes principales (ACP) de los volátiles de fermentación tras 60 días de envejecimiento en el ensayo.....	120
Figura 45. Compuestos volátiles procedentes de la madera de roble al finalizar el envejecimiento en el ensayo 2.....	123
Figura 46. Análisis sensorial de los vinos envejecidos efectuado por panel entrenado de 9 jueces para el ensayo 2.....	125
Figura 47. Procedimiento experimental del ensayo 3. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala semi-industrial).....	127
Figura 48. (a) Lías sin tratamiento con US. (b) lías tras 30 minutos de tratamiento con US.....	128
Figura 49. Evolución de oxígeno disuelto (mg/L) durante el envejecimiento de vinos en el ensayo 3.....	130
Figura 50. Acidez volátil (g/L) expresado como ácido acético durante el envejecimiento de vinos del ensayo 3.....	131
Figura 51. Evolución de la intensidad colorante (unidades de absorbancia) (a) y la tonalidad (adimensional) (b) a lo largo del envejecimiento en ensayo 3.....	132
Figura 52. Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) a lo largo del envejecimiento en el ensayo 3.....	133
Figura 53. Evolución del contenido en antocianos totales (a) y piranoantocianos (b) a lo largo del envejecimiento en el ensayo 3.....	135
Figura 54. Evolución de volátiles de fermentación a través del envejecimiento (mg/L) en el ensayo 3.....	138
Figura 55. Procedimiento experimental del ensayo 4. Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares.....	142

Figura 56. Evolución de la intensidad colorante (unidades de absorbancia) (a), de la tonalidad (adimensional) y el índice de polifenoles totales (IPT) (b) a lo largo del envejecimiento de los vinos del ensayo 4.....	144
Figura 57. Evolución del contenido en antocianos totales (a) y piranoantocianos (b) a lo largo del envejecimiento en el ensayo 4.....	147
Figura 58. Evolución del contenido en fenoles volátiles a lo largo del envejecimiento en el ensayo 4.....	149
Figura 59. Evolución del contenido en compuestos furánicos a lo largo del envejecimiento en el ensayo 4.....	150
Figura 60. Evolución del contenido en lactonas a lo largo del envejecimiento en el ensayo 4.....	152
Figura 61. Evolución del contenido en aldehídos y alcoholes fenólicos a lo largo del envejecimiento en el ensayo 4.....	153
Figura 62. Evolución del contenido en etilfenoles a lo largo del envejecimiento en el ensayo 4.....	155
Figura 63. Proyección de las dos primeras componentes del análisis de componentes principales (ACP) de los volátiles procedentes de la madera de roble tras 240 días de envejecimiento en barrica del ensayo 4.....	157

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y
OBJETIVOS

1.1 La Crianza sobre lías en vinos tintos

La “crianza sobre lías” (CSL) es una técnica utilizada de forma tradicional en la elaboración de vinos espumosos, como el Champagne y el Cava, además de en la elaboración de los vinos blancos de Borgoña fermentados en barrica. Hoy en día, su uso está muy extendido, utilizándose también en la elaboración de vinos tintos.

Las lías del vino se definen como los residuos formados en el fondo del depósito tras la fermentación y durante el almacenamiento o tras tratamientos autorizados. También se denominan lías a los residuos generados tras la filtración o centrifugación. Aunque la composición de las lías es variable, fundamentalmente contienen microorganismos, levaduras en su mayoría, y en menor proporción ácido tartárico y materia inorgánica (**Pérez-Serranilla y De Castro, 2008**).

La técnica de CSL consiste en el contacto prolongado del vino con las lías finas (fundamentalmente biomasa celular). En el caso de los vinos espumosos, este contacto se produce tras la segunda fermentación del vino base en botella (**Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006; Martínez-Rodríguez *et al*, 2001**). Durante la CSL se producirán diversas modificaciones en la composición química y las características sensoriales del vino.

Es importante destacar que la CSL se puede realizar utilizando la biomasa producida durante la fermentación del vino, o por la adición externa de biomasa generada por multiplicación, lavado y liofilización de levadura seleccionada por su alta cinética de cesión de polisacáridos (**Suárez-Lepe y Morata, 2006**).

La importancia de la composición de la pared celular de la levadura así como el proceso en el que se liberan compuestos de origen celular al vino (autólisis celular) condicionaran la CSL. A continuación se describe la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* y el proceso de autólisis, además de los métodos utilizados hasta el momento para acelerar la CLS.

1.1.1 La pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*

La composición de la pared celular de la levadura condiciona de forma fundamental el proceso de CLS. Además, dicha pared define la morfología celular y mantiene la integridad, tanto en condiciones de estrés como en los procesos de crecimiento, división y esporulación (Suárez-Lepe y Morata, 2015). Sin la protección del protoplasto por parte de la pared celular, las levaduras podrían lizar, ya que la presión osmótica interna es alta en comparación con la presión ambiental (Moreno-Arribas y Polo, 2009).

La pared celular representa entre el 20 y el 30 % de la masa celular en seco (Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006) y está compuesta en un 90 % por polisacáridos y en un 10 % por lípidos y proteínas (Fornairon-Bonnefond *et al*, 2002). La fracción polisacárida parietal, se compone principalmente por glucano, es decir, cadenas β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucosa con ramificaciones laterales de β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucosa. Estas fibras se entrelazan con pequeñas cantidades de quitina formando una red tridimensional (Palomero *et al*, 2009) (Figura 1).

Figura 1. Representación de la membrana plasmática y pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Morata, 2004).

Las manoproteínas son macromoléculas complejas que actúan como componente estructural y son parcialmente responsables de la permeabilidad celular. Se trata de polímeros glicoproteicos parcialmente solubles en agua, formados por cadenas cortas de $\alpha(1\rightarrow2)$ D-manosa o $\alpha(1\rightarrow3)$ D-manosa unidos a polipéptidos en residuos de serina o treonina (Villetaz *et al*, 1980). Las manoproteínas se encuentran en la parte más exterior de la pared celular (Pradelles *et al*, 2008) unidas a zonas más internas, en concreto a la red tridimensional formada por glucano y quitina (Giovani *et al*, 2012).

1.1.2 La autólisis celular

La autólisis de la levadura se define como la hidrólisis de los biopolímeros intracelulares debido a la acción de las endo-hidrolasas. Dicha autólisis, se ve inducida por la propia muerte celular y va seguida por la formación de compuestos de bajo peso molecular (Fornairon-Bonnefond *et al*, 2002; Babayan y Bezrukov, 1985). Por tanto, durante la CSL se producirán los denominados “fenómenos de autólisis” que darán lugar a la descomposición de la membranas celulares, la liberación de constituyentes intracelulares y la liberación de enzimas hidrolíticas que producirán la hidrólisis de los biopolímeros intracelulares en productos de bajo peso molecular (Pérez-Serranilla y De Castro, 2008). Además, la pared celular también se degradará gradualmente a través de la rotura de las fibras de glucano y quitina. Las enzimas pertenecientes a la propia levadura muerta son las responsables de dicha degradación. Incluyendo glucanasas (presentes en la pared celular hasta 4 meses después de la muerte de la levadura) y manosidasas (Palomero *et al*, 2007).

Los fenómenos de autólisis celular han sido investigados por diversos autores, entre los cuales (Babayan y Bezrukov, 1985) proponen 4 pasos diferenciados en los que tiene lugar el proceso.

- En primer lugar se produce la degradación de las endoestructuras celulares, liberando proteasas vacuolares en el citoplasma.
- A continuación, se produce la degradación de los inhibidores citoplasmáticos específicos de las proteasas. Dando lugar a la activación de las mismas.

- En tercer lugar, se produce la hidrólisis de los polímeros intracelulares que se acumularán en el espacio restringido por la pared celular.
- Por último, los diferentes productos hidrolíticos son liberados al medio cuando su peso molecular es suficientemente pequeño para atravesar los poros de la pared celular.

En cuanto a la descomposición de la pared celular y liberación de sus componentes al vino durante la CSL cabe destacar el papel de las β -glucanasas. Dichas enzimas se clasifican en endo y exo-glucanasas e hidrolizan los enlaces glucosídicos de las cadenas de β -glucanos (Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006). A este respecto, Charpentier y Freyssinet, 1989 proponen el siguiente mecanismo:

- Inicialmente se produce una liberación de polisacáridos y de cadenas cortas de oligosacáridos. Una fracción de estos polisacáridos corresponde a manoproteínas unidas covalentemente al glucano de la pared intacta. Este fenómeno se debe a la acción de las enzimas endo- y exo- β -(1,3)-glucanasas.
- Posteriormente, se produce la liberación de manoproteínas de elevado peso molecular, procedentes mayoritariamente de la zona periplásmica. Esto es debido a la desestabilización de la estructura de la pared como consecuencia de la hidrólisis parcial del glucano.
- A continuación la acción de las β -(1,3)-glucanasas continúa degradando los glucanos en los restos de la pared y en el medio extracelular.
- Finalmente las exo- β -(1,3)-glucanasas, solubilizadas en el medio, degradan el glucano unido a las manoproteínas y estas últimas a su vez pueden ser hidrolizadas.

1.1.3 Liberación de compuestos celulares al vino y su aportación físico-química y sensorial

Como ya se ha indicado anteriormente, el proceso de autólisis celular producido durante la CSL da lugar a la liberación de determinados compuestos de origen celular al vino. Dichos compuestos interaccionan con el mismo, modificando sus características físico-químicas y sensoriales. A continuación se citan de forma resumida la naturaleza de los compuestos liberados y la implicación de los mismos sobre el vino.

La liberación de compuestos nitrogenados al vino es debida a la hidrólisis de proteínas (**Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006**). La levadura liberará proteínas y péptidos que serán hidrolizados extracelularmente dando lugar a péptidos y aminoácidos libres. Las condiciones de crianza de los vinos, con valores de pH entre 3 y 4 así como temperaturas de entre 10 y 15°C no son las óptimas para la proteólisis (**Fornairon-Bonnefond et al, 2002**), por lo que la actividad proteolítica durante la CSL se deberá fundamentalmente a la propia levadura utilizada. En cuanto a la aportación en los vinos, los aminoácidos y péptidos actúan como precursores de aromas, algunos pueden presentar sabores dulces o amargos y juegan un importante papel como activadores de la fermentación maloláctica (**Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006; Morata et al, 2005**). Es interesante destacar que los aminoácidos liberados durante la CSL pueden dar lugar a la formación de aminas biógenas (tiramina, putrescina, cadaverina, feniletilamina) por descarboxilación de los mismos. Esto ocurre en presencia de determinados microorganismos y actividades enzimáticas descarboxilasa (**Pérez-Serranilla y De Castro, 2008**). Las aminas biógenas provocan efectos perjudiciales sobre el consumidor como el dolor de cabeza, las náuseas o la hipertensión.

La CSL también implica la cesión de una fracción lipídica al vino. Dicha fracción normalmente se asocia a la membrana celular de la levadura y la forman mayoritariamente triglicéridos, fosfoglicéridos y esteroides de membrana. De entre los ácidos grasos que componen los triglicéridos, el ácido palmitoleico y el ácido oleico son los más comunes (**Fornairon-Bonnefond et al, 2002**). La fracción lipídica parece tener una influencia sobre las capacidades espumantes del vino. **Gallart et al, (2002)** observaron que dicha influencia depende del equilibrio que exista en el vino entre los ácidos orgánicos en sus formas libres y unidas como ésteres etílicos. Deduciendo de esta forma que las capacidades espumantes mejorarán con cualquier procedimiento enológico que aumente la síntesis de ésteres etílicos de ácidos grasos.

Nucleótidos y nucleósidos son liberados durante la lisis celular. **Charpentier et al, (2005)** observaron un aumento en determinados parámetros sensoriales en vinos enriquecidos con nucleótidos. Por lo que estos compuestos podrían tener una importante influencia como potenciadores de sabor.

En cuanto a los compuestos procedentes de la pared celular, cabe destacar los polisacáridos liberados tras la acción de las glucanasas. Estos compuestos presentan un

fuerte efecto sobre las propiedades físico-químicas y sensoriales de los vinos envejecidos. De los cuales, las manoproteínas son los polisacáridos mayoritarios (**Palomero *et al*, 2009**). La concentración de manoproteínas en los vinos es de aproximadamente 100-150 mg/L, presentando tamaños muy variables de entre 5.000 hasta más de 800.000 Da (**Pérez-Serranilla y De Castro, 2008**). Las manoproteínas actúan como estabilizadores contra precipitaciones tartáricas y proteicas (**Lubbers *et al*, 1994**). Además, interaccionan con la fracción fenólica de los vinos tintos, proporcionando una mayor estabilidad en el contenido en antocianos monoméricos (**Saucier *et al*, 1997**). También interaccionan con los taninos reduciendo la astringencia e incrementando el cuerpo del vino y la sedosidad en boca. Otra propiedad de los polisacáridos es la estimulación del crecimiento de las bacterias lácticas lo que da lugar a la estimulación de la fermentación maloláctica (**Giovani *et al*, 2012**). Otra propiedad que cabe destacar es la influencia sobre las propiedades espumantes. **Martínez-Lapuente *et al*, (2015)** observaron que las manoproteínas y polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa son pobres formadores de espuma pero buenos estabilizadores de la misma.

1.1.4 Otros efectos de la CSL sobre los vinos envejecidos

Los compuestos liberados tras la lisis celular tienen una repercusión sobre el aroma del vino envejecido. Normalmente hay un aumento de la complejidad del mismo, al combinarse con la aportación previa de volátiles fermentativos o con los volátiles procedentes de la madera de roble, si la CSL se realiza en barrica (**Morata *et al*, 2005**). De forma general, la CSL aumenta la concentración de ésteres y alcoholes superiores, estos últimos en concentraciones excesivas pueden reducir la calidad aromática de los vinos. Aunque el principal riesgo en cuestión aromática que supone la CSL, es la aparición de aromas negativos derivados de azufre. Estos compuestos aromáticos presentan diferentes orígenes, pero las lías de levadura parecen ser uno de los principales responsables de su aparición (**Pérez-Serranilla y De Castro, 2008**).

Otro efecto destacado es la protección frente al oxígeno. Las lías de levadura presentan un potente efecto reductor. La afinidad de las lías por el oxígeno, así como su consumo potencial, es mayor incluso que el que aporta la fracción polifenólica del vino (**Fornairon-Bonnefond y Salmon, 2003**). Este potente poder reductor es la razón por la

que aparecen aromas a reducción cuando se almacenan los vinos en presencia de sus lías totales. Las lías de levadura son capaces de consumir oxígeno, lo que posibilita combinar la técnica de CSL con la elaboración de vinos con bajas concentraciones de sulfuroso. El consumo de oxígeno, posiblemente se debe a el ataque preferencial del oxígeno sobre los lípidos de las membranas celulares (**Fornairon-Bonnefond *et al*, 2002**). Otros autores, en cambio, consideran las proteínas y glucanos como las principales fracciones antioxidantes (**Gallardo-Chacón *et al*, 2010**). El mayor antioxidante de las células vivas es el tripéptido glutatión, la concentración de este compuesto en vinos depende de la cepa de levadura utilizada en la fermentación, e incrementa cuando el vino es almacenado en presencia de lías (**König *et al*, 2009**). La capacidad antioxidante no es constante a lo largo del envejecimiento. **Gallardo-Chacón *et al*, (2010)** estudiaron la capacidad antioxidante de la superficie celular de levadura y observó un decrecimiento progresivo de la misma a lo largo del tiempo. Posiblemente, debido a la modificación estructural de la pared celular y a la oxidación de grupos activos.

Por último, cabe destacar, la capacidad de adsorción por parte de las lías de determinados compuestos negativos. Los etilfenoles (4-etilfenol y 4-etilguaicol) son compuestos responsables de defectos aromáticos en los vinos y son retenidos por las lías. Esta adsorción puede deberse a la unión de los etilfenoles con los lípidos residuales así como a la interacción con los grupos funcionales de las manoproteínas y los aminoácidos libres de la superficie de las paredes celulares (**Nieto-Rojo *et al*, 2014**). Además, otros autores han demostrado la capacidad de las lías de reducir los contenidos en Ocratoxina A tras solo 7 días de contacto con las lías húmedas (**Moruno *et al*, 2005**). La Ocratoxina A es una micotoxina cancerígena, que puede estar presente en mostos y vinos, y es producida por varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium*.

1.1.5 Métodos para la aceleración de la CSL

Los diferentes efectos citados anteriormente, hacen que la técnica de CSL tenga particular interés para la mejora de la calidad de vinos tintos de crianza. La principal desventaja radica en la lentitud del proceso de lisis celular, que puede durar al menos 12 meses (**Martínez-Rodríguez *et al*, 2001**). Esta es la razón por la que en la mayoría de países productores, la legislación exija un envejecimiento sobre lías de al menos 9 meses, que

garantice efectos perceptibles en los vinos (**Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006**). La forma tradicional de incrementar el contenido en polisacáridos de los vinos en CSL es el denominado “bâtonnage”, que consiste en la suspensión de las lías de levadura por agitación (**Pérez-Serranilla y De Castro, 2008**). Diversas técnicas han sido investigadas para inducir la lisis celular y de esta forma acelerar la CSL. A continuación se citan algunas de las técnicas utilizadas hasta el momento.

El uso de levaduras de alta cinética de cesión de polisacáridos, así como el uso de levaduras con diferente composición de la pared celular, ha sido estudiado por diversos autores. **Loira et al, (2013)** optimizaron la técnica de CSL en combinación con la adición de chips de roble mediante la selección de levaduras no-*Saccharomyces* para la vinificación en tinto. Sus resultados indicaron que los criterios de selección deben de contemplar tanto la capacidad de la cepa para la liberación de polisacáridos como la interacción con otros componentes del vino. **Palomero et al, (2009)** usaron diferentes géneros de levaduras no-*Saccharomyces* en CSL, mostrando resultados muy positivos en la cinética de liberación de polisacáridos. Del mismo modo **Guilloux-Benatier et al, (2000)** utilizaron 8 cepas diferentes de no-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora osmophila*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia fermentans*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Starmerella bacillaris*, *Torulaspora delbrueckii* y *Zygosaccharomyces florentinus*) demostrando que todas las cepas liberaron mayor cantidad de polisacáridos que *Saccharomyces cerevisiae*. **Todd et al, (2000)** utilizaron cepas de levaduras Killer y sensibles, para realizar una fermentación mixta que dio lugar a una muerte rápida de las levaduras sensibles y a una liberación mayor de proteínas, consideradas en esta investigación como marcadores de la autólisis. Además, algunos autores han utilizado técnicas de ingeniería genética para la constitución de una cepa de levadura industrial autolítica (**Cebollero et al, 2009**).

La adición de enzimas es otra de las técnicas investigadas. **Torresi et al, (2014)** experimentaron la adición de preparados enzimáticos comerciales ricos en β -glucanasa, promoviendo de esta forma la liberación de componentes de la levadura en el vino espumoso. En la misma línea, **Palomero et al, (2007)** realizaron un estudio comparativo entre la autólisis convencional y la asistida por adición de β -glucanasa. Sus resultados indicaron que la adición de esta enzima produce una aceleración de la lisis celular,

pudiéndose completar en tan solo dos semanas. Mientras que la autólisis convencional tardó 5 meses en mostrar concentraciones significativas de polisacáridos.

Otra forma en acelerar la autólisis es la combinación de diferentes cepas junto con diferentes condiciones de fermentación. **Todd et al, (2000)** utilizaron 3 cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* con diferentes temperaturas y concentraciones de azúcares durante la fermentación. De esta forma demostró que diferentes condiciones de estrés influyen de manera diferente en la liberación de polisacáridos, dependiendo de la cepa utilizada durante la fermentación alcohólica.

Otros autores se decantan por la aplicación de técnicas físicas que interfieran directamente sobre la integridad de la pared celular. **Liu et al, (2016)** estudiaron el uso de ultrasonidos y microondas, ambos combinados con tratamientos de agitación y abrasión para acelerar la lisis celular de levadura. El incremento significativo de polisacáridos mostró el ultrasonido como una técnica interesante para acelerar la CSL. El contenido en polisacáridos fue aún mayor cuando se utilizó el vidrio como agente abrasivo. El potencial para inducir la autólisis por medio de técnicas de homogenización a alta presión, fue investigado por **Comuzzo et al, (2015)** que aplicó dicha técnica en una cepa comercial de *Saccharomyces bayanus* en comparación con la autólisis inducida térmicamente. Sus resultados indicaron que aplicando un tratamiento de 150 MPa se consigue una fracción volátil interesante con una menor concentración de ácidos grasos libres de cadena corta y una mayor cantidad ésteres etílicos. Por último, la aplicación de campos eléctricos pulsados fue estudiada por **Martínez et al, (2016)**, consiguiendo hasta 4,2 veces más de polisacáridos en muestras tratadas con esta técnica.

1.2 La tecnología del ultrasonido

La aplicación de ultrasonidos (US) es la técnica utilizada en los ensayos de la presente tesis doctoral con el objetivo de acelerar el proceso de lisis celular y por consiguiente, acelerar la técnica de CSL. A continuación, se describe el fundamento del tratamiento de US y las aplicaciones que ha tenido dicha tecnología hasta el momento, en la industria alimentaria y más concretamente en la industria enológica.

1.2.1 Fundamento del uso de US

El US es una onda mecánica de alta frecuencia ($>16\text{kHz}$) (**Povey y McClements, 1988**). Estos valores se encuentran por encima del límite de la audición humana (**Awad *et al*, 2012; Cacciola *et al*, 2013**). En la industria alimentaria la aplicación de US se puede dividir en dos tipos según el rango de frecuencia utilizado. El US denominado de alta frecuencia (100kHz - 1MHz), que se utiliza como técnica analítica para proporcionar información sobre las propiedades físico-químicas de los alimentos, y el US de potencia (16 - 100kHz) utilizado en la industria para modificar las propiedades físico-químicas de los alimentos (**Patist y Bates, 2008; Awad *et al*, 2012**).

El mecanismo de acción del US es debido a los efectos de la denominada “Presión acústica (P_a)”. Se trata de una onda sinusoidal dependiente del tiempo (t), la frecuencia (f) y la amplitud máxima de la presión de la onda ($P_{a,\text{max}}$) (**Patist y Bates, 2008**).

$$P_a = P_{a,\text{max}} \text{sen}(2\pi ft)$$

La amplitud máxima es proporcional a la entrada de potencia del transductor. A altas amplitudes se generan burbujas a partir de núcleos de gas existentes en el propio fluido, dichas burbujas sufren procesos de compresión y rarefacción (**Patist y Bates, 2008**). Estos procesos dan lugar al colapso de las partículas del medio, generando el denominado fenómeno de “cavitación” (**Povey y McClements, 1988**) que provoca la implosión de las burbujas (**Morata *et al*, 2017**). Estas implosiones generan unas condiciones extremas en el interior de las burbujas con temperaturas de 5000 K y presiones de hasta 1000 atmósferas (**Cacciola *et al*, 2013**). Estas condiciones provocan la aparición de ondas de

cizallamiento de alta energía y turbulencia en la zona de cavitación (**Patist y Bates, 2008**). Estos fenómenos provocan ciertas reacciones químicas y aceleran las velocidades de reacción en el medio tratado (**García-Martín y Sun, 2013**).

La efectividad del tratamiento de US sobre un medio líquido depende de dos factores. La energía o entrada de energía por volumen del material tratado (kWh/L) y la intensidad o densidad de poder acústico (W/cm^2) que es la producción de potencia real por área de la superficie del sonotrodo (**Patist y Bates, 2008**). Es interesante destacar que aunque el US es considerado una tecnología no térmica, su aplicación en tiempos mayores de 5 minutos puede ocasionar temperaturas en torno a 60 °C (**Morata *et al*, 2017**).

1.2.2 Aplicación de US en la industria alimentaria.

El uso de US en la industria alimentaria es sobradamente conocido. Diversos procesos de alimentos, conservación y extracción pueden verse mejorados al complementarse por la tecnología del US (**Chemat y Khan, 2011; Balachandran *et al*, 2006**). Entre las principales aplicaciones utilizadas actualmente se pueden destacar las siguientes:

- El cocinado de alimentos se ve mejorado debido a la mejor transferencia de calor. Por esta misma razón, los procesos de congelación/cristalización y secado de alimentos también se ven claramente mejorados por esta técnica.
- Los procesos de marinado de alimentos son optimizados debido a al incremento de transferencia de masa que aporta la tecnología ultrasónica.
- La desgasificación de bebidas por la aplicación de US es un proceso muy eficiente gracias a los fenómenos de compresión y rarefacción generados en el líquido.
- La filtración y desmoldeado también pueden verse claramente mejorados ya que el US disgrega la torta de filtración y los fenómenos de vibración posibilitan que los productos cocinados puedan ser desmoldeados con mayor facilidad.

Por último, cabe destacar que el fenómeno de cavitación anteriormente descrito puede ser aprovechado en otros procesos industriales. Ya que evita la formación de espuma, puede estabilizar emulsiones e incluso mejorar el corte de alimentos cuando se usan hojas unidas a una fuente ultrasónica (**Chemat y Khan, 2011**).

Además de las aplicaciones industriales ya citadas. La tecnología del US sigue siendo investigada para su aplicación en el procesado de determinados alimentos. **Cárcel et al, (2007)** utilizaron el US sobre carne en salmuera, observando que la intensidad de US aplicada varía la transferencia de masa durante el proceso. Los tratamientos más intensos dieron lugar a mayores contenidos tanto en humedad como en transferencia de NaCl. Otros autores han orientado sus investigaciones a la mejora de extracción de compuestos de interés. **Albu et al, (2004)** observaron un aumento en la extracción de ácido carnósico al aplicar US sobre la planta *Rosmarinus officinalis*. Con respecto a la aplicación sobre bebidas fermentadas, otras investigaciones tratan de mejorar los largos procesos de envejecimiento. **Chang y Chen, (2002)** aplicaron US a 20kHz para acelerar el envejecimiento de vinos de arroz y de maíz. Sus resultados indican que el vino de arroz se envejeció más rápidamente con calidad similar a la obtenida mediante el envejecido tradicional. Mientras que el vino de maíz no obtuvo la misma calidad.

En el campo de la microbiología de alimentos, la aplicación de US sufre una ligera controversia. De forma general, es posible afirmar que el efecto antimicrobiano de los alimentos no es demasiado significativo y depende en gran medida de la temperatura generada durante el proceso de cavitación **Demirdöven y Baysal, (2008)**. Sin embargo, otros autores **Gracin et al, (2016)** demostraron que tratamientos continuos de US (400 W, 24kHz y 100 µm de amplitud) pueden reducir la población de *Brettanomyces* y de bacterias lácticas hasta valores de 89,1-99,7% y 71,8-99,3% respectivamente. Parece ser que la combinación de US con calor y/o presión podría ser una tecnología prometedora para matar bacterias en los alimentos (**Piyasena et al, 2003**). Teniendo en cuenta que otros autores afirman que la inactivación de los microorganismos es mayor en mayores tamaños de la célula tratada (**Wu et al, 2012**).

1.2.3 Aplicaciones enológicas del US

En el campo enológico, la tecnología de US no se encuentra actualmente difundida y varias de las investigaciones han ido orientadas a la desinfección y limpieza de barricas (Yap y Bagnall, 2009; Yap *et al*, 2007). Sin embargo, se trata de una prometedora tecnología, que puede tener un gran número de aplicaciones, tanto sobre mosto de uva como sobre vino terminado.

El US es una tecnología capaz de degradar la pared de las células vegetales, mejorando de esta forma la extracción de antocianos y otros compuestos fenólicos (Morata *et al*, 2017). Dicha extracción se puede realizar en la etapa de maceración y dependerá de otros factores como la temperatura alcanzada y el contenido en etanol (Ghafoot *et al*, 2009). Dependiendo de los compuestos que se desee extraer de la piel de la uva, los US pueden ser realmente eficientes. Carrera *et al*, (2015) demostraron que tratamientos con US de tan solo 6 minutos son suficientes para la extracción de la mayoría de los aminoácidos de la piel de la uva. Del mismo modo, los US pueden ser utilizados para la extracción de compuestos aromáticos de mostos y vinos (Cocito *et al*, 1995).

En cuanto a aplicaciones sobre vino terminado, el US puede ser utilizado como técnica para acelerar el envejecimiento, lo que podría proporcionar a los vinos un mayor contenido en antocianinas y una disminución de los taninos, considerándose este hecho como positivo para la producción de vinos de alta calidad (García-Martín y Sun, 2013). También es interesante destacar, que la aplicación de esta técnica aunque no modifica parámetros enológicos básicos como el pH, la acidez total o el contenido en etanol y azúcares, puede ser perjudicial cuando se aplica en exceso, por la aparición de aromas desagradables y notas a quemado (García-Martín y Sun, 2013). También existe una mejora en la extracción de compuestos volátiles procedentes de chips de roble cuando el envejecimiento se realiza con US (Tao *et al*, 2014).

A nivel laboratorio existen aplicaciones que pueden resultar interesantes, ya que se pueden utilizar técnicas ultrasónicas para monitorizar fermentaciones alcohólicas (Lamberti *et al*, 2009) e incluso para optimizar métodos de extracción líquido-líquido con diclorometano, para la posterior medida de compuestos volátiles mediante GC-FID (Cabredo-Pinillos *et al*, 2006).

En lo respectivo a la CSL, también se han realizado algunos estudios que incluyen la aplicación de US. **Cacciola *et al*, (2013)** afirman que el fenómeno de cavitación, generado en el líquido durante la aplicación de US, es capaz de dañar la membranas celulares, provocando la liberación de coloides como polisacáridos y manoproteínas. Este comportamiento de las lías durante la cavitación, hace que la aplicación de US sea una tecnología con potencial para asistir la CSL. Por lo que algunas investigaciones posteriores también han utilizado los US como **Kulkarni *et al*, (2015)**, que aceleraron el proceso de CSL al realizar tratamientos de US en combinación con la adición de biomasa de levaduras no-*Saccharomyces*.

1.3 Parámetros de calidad en vinos tintos

Aunque no podemos evaluar la calidad de los vinos de una manera totalmente objetiva, algunos compuestos se relacionan directamente con la calidad de los vinos tintos, ya que provocan unas características sensoriales y una estabilidad en el mismo que son características de los vinos de calidad. A continuación se definen diversos compuestos de calidad en vinos tintos, que han sido evaluados en el presente trabajo y que junto al análisis sensorial, han servido para la obtención de conclusiones relativas a la calidad de los vinos terminados procedentes de los distintos ensayos realizados.

1.3.1 Compuestos fenólicos

Es sobradamente conocida la importancia de los compuestos fenólicos en los vinos, en particular en vinos tintos, ya que estas moléculas son las responsables del color y de otras propiedades sensoriales como la astringencia, el amargor y la aspereza. En el caso de vinos blancos cabe destacar que estos compuestos están involucrados en el pardeamiento oxidativo.

Se distinguen dos grupos diferenciados de compuestos fenólicos. Los denominados “flavonoides” y los “no-flavonoides”. Dentro del grupo flavonoide, los antocianos y los flavanoles tienen gran importancia en la calidad de los vinos tintos. Los antocianos son pigmentos de color rojo. Los flavanoles existen como monómeros de catequinas y como

oligómeros y polímeros. A los flavanoles también se les denomina “taninos condensados o proantocianidinas” (Cheynier *et al*, 2006).

Figura 2. Clasificación de los compuestos fenólicos en vinos tintos

Taninos

Los taninos del vino también son llamados proantocianidinas. Esta acepción es debida a que liberan antocianos de color rojo cuando son calentados en solución ácida (Cheynier *et al*, 2006). El término “tanino” se refiere a la propiedad particular de estos compuestos de interaccionar con proteínas, lo que está relacionado con la percepción de la astringencia (Cheynier *et al*, 2006). Por tanto, las proantocianidinas (taninos condensados) son metabolitos polifenólicos secundarios, muy extendidos en el reino vegetal, y capaces de precipitar proteínas (De Freitas y Mateus, 2001). Se trata de sustancias distribuidas irregularmente que no tienen una función metabólica específica

(**Ricardo-Da-Silva *et al*, 1991**). Inicialmente se encuentran presentes en la parte sólida de la piel de la uva, semilla y tallo, en concreto tiene gran importancia la presencia de estos compuestos en las paredes celulares y vacuolas del hollejo de uva (**Saucier *et al*, 2006**).

Las proantocianidinas se extraen durante el proceso de maceración-fermentación de la vinificación de uva tinta (**Peyrot des Gachons y Kennedy, 2003**). Las principales proantocianidinas están formadas por condensación de unidades de (+) catequina y (-) epicatequina (**Dallas *et al*, 1995; Saucier *et al*, 2006**).

Las proantocianidinas juegan un papel importante en las reacciones de oxidación del vino, de pardeamiento enzimático (**Dallas *et al*, 1995**), en la formación de turbidez (**Monagas *et al*, 2003**), en reacciones de condensación durante el proceso de envejecimiento del vino y en la percepción de la astringencia y el amargor. Se cree que el fenómeno de astringencia se debe a la interacción de las proteínas salivares con los polifenoles presentes en el vino. Esto dará como resultado la formación de agregados insolubles que precipitan, obstruyendo la lubricación del paladar y causando una sensación desagradable de aspereza, sequedad y constricción (**De Freitas y Mateus, 2001; Ricardo-Da-Silva *et al*, 1991**). La sensación de amargor se asocia con procianidinas oligoméricas que alcanzan su máximo con el tetrámero de epicatequina. Mientras que la astringencia, se debe a procianidinas de mayor peso molecular (**Lea y Arnold, 1978**).

Antocianos

Los antocianos son pigmentos presentes en las variedades de uvas tintas. Dichos compuestos se localizan en el hollejo de la uva, excepto en las variedades tintoreras donde se encuentran también en la pulpa (**Cheyrier *et al*, 2006**). Por tanto, los antocianos al igual que los taninos, se extraen durante la fermentación-maceración en presencia de los hollejos de uva tinta. Se trata de derivados glicosidados de las 5 antocianidinas o agliconas: malvidina, petunidina, peonidina, delphinidina y cianidina. Mayor diversidad resulta por la acilación de la glucosa por los ácidos acético, *p*-cumárico y cafeico. El perfil de antocianos es una característica varietal y como tal, puede ser utilizada para distinguir variedades de uva tinta (**Cheyrier *et al*, 2006**).

Los antocianos son compuestos muy inestables por lo que su concentración decrece a lo largo del tiempo. Ya que reaccionan con otros constituyentes del vino tornando a formas poliméricas más estables durante el envejecimiento (**Morata et al, 2007a**). Además, contribuyen a la calidad química y organoléptica del vino obtenido debido a la interacción con otros compuestos fenólicos, así como con proteínas y polisacáridos (**Mazza y Francis, 1995**). Los antocianos pueden condensarse con flavanoles directamente o por mediación del acetaldeído u otros compuestos (**Alcalde-Eon et al, 2006**). Los mayores cambios en el color del vino tinto ocurren durante el primer año de envejecimiento, donde normalmente el vino está almacenado a granel (**Mateus y De Freitas, 2001**).

Piranoantocianos

La estabilidad colorante del vino se debe a diversos fenómenos como la polimerización, los fenómenos de copigmentación o la formación de piranoantocianos. Los polímeros formados durante el envejecimiento del vino son más estables que sus formas monoméricas y presentan coloraciones más anaranjadas (**Morata et al, 2004**).

Entre los fenómenos anteriormente citados cabe destacar la formación de piranoantocianos. Estos compuestos se forman debido a la transformación de los antocianos originando un nuevo anillo pirano en su estructura por adición de diferentes compuestos, también presentes en el vino, al carbono en la posición 4 y al grupo hidroxilo en la posición 5 (**Alcalde-Eon et al, 2006**). Los piranoantocianos se forman durante la fermentación alcohólica y durante la maceración y envejecimiento (**Morata et al, 2012**). Estas moléculas dan lugar a una mayor estabilidad colorante y presentan coloraciones más anaranjadas (**Morata et al, 2012**).

De entre los distintos piranoantocianos presentes en el vino algunos de los más interesantes son las vitisinas y los piranoantocianos vinilfenólicos. Su estructura con un anillo pirano heteroaromático, mejora la estabilidad colorante del vino a diferentes pHs (**Morata et al, 2012**). Las vitisinas se forman por la reacción entre el ácido pirúvico y el acetaldehído con malvidin-3-*O*-glucósido (**Figura 3**), formándose las vitisinas A y B respectivamente. El interés de estos compuestos radica en su estabilidad bajo las condiciones de envejecimiento del vino. Además, son más resistentes a la decoloración

por SO₂ que otros antocianos y expresan colores más profundos a pH 4 (**Morata *et al*, 2007a**). El ácido pirúvico se libera en la fermentación alcohólica por el metabolismo de las levaduras implicadas, pero además, puede ser liberado por las bacterias lácticas durante la fermentación maloáctica (**Morata *et al*, 2007a**). Del mismo modo, el acetaldehído también es liberado en la fermentación alcohólica. En algunos vinos fortificados el acetaldehído además es incorporado por adición de un destilado, lo que da lugar a un mayor contenido en vitisina B en este tipo de vinos (**Morata *et al*, 2007a**).

Figura 3. Formación de Vitisinas A y B en vinos tintos

Los piranoantocianos vinilfenólicos se forman por la condensación de antocianos, principalmente malvidin-3-O-glucósido, y vinilfenoles (**Figura 4**). Los vinilfenoles se originan durante la fermentación por acción de la enzima hidroxycinamato descarboxilasa (HCDC) de las levaduras, que es capaz de transformar los ácidos hidroxicinámicos (*p*-cumárico, cafeico y ferúlico) (**Morata *et al*, 2007b**).

	R1	R2	
Ácido cafeico	OH	H	Malvidin-3-O-glucósido-4-vinilcatecol
Ácido- <i>p</i> -cumárico	H	H	Malvidin-3-O-glucósido-4-vinilfenol
Ácido ferúlico	OCH3	H	Malvidin-3-O-glucósido-4-vinilguaiaicol

Figura 4. Formación de piranoantocianos vinilfenólicos

1.3.2 Compuestos aromáticos

El aroma es otro de los aspectos clave en la calidad de los vinos tintos. La mezcla compleja de más de 1000 compuestos volátiles que contiene el vino (**Tan *et al*, 2005**) pertenecientes a diferentes familias químicas, es fundamental para la obtención de vinos de calidad. A continuación se describen los aromas analizados en los vinos obtenidos con los ensayos realizados (**Figura 5**), con el objetivo de definir su perfil aromático.

Figura 5. *Compuestos aromáticos de los vinos de crianza*

1.3.2.1 Aromas primarios

Los aromas primarios del vino son aquellos que proceden de la variedad de uva. Se trata del denominado “aroma varietal”, en el que los compuestos terpénicos tienen un papel fundamental por su aportación floral y frutal, así como de aromas a semillas y raíces (Câmara *et al*, 2004). Solo algunos de estos compuestos son vinculados a aromas varietales específicos. Este es el caso del linalool, geraniol y nerol que se consideran propios de la variedad moscatel (Styger *et al*, 2011). En cuanto al resto de variedades, el contenido en compuestos terpenicos es mucho menor, con valores totales ente 1-4 mg/L (Mateo y Jiménez, 2000).

Los alcoholes monoterpénicos se encuentran localizados en el hollejo de uva. Donde se pueden encontrar en forma libre o ligados glicosidicamente. Dando lugar en este caso a compuestos inodoros. Durante la fermentación alcohólica, las levaduras pueden liberar glicosidasas que hidrolizan los enlaces glicosídicos liberando de esta forma los compuestos aromáticos varietales hasta el momento inodoros (Styger *et al*, 2011; Strauss *et al*, 1986). Los alcoholes monoterpénicos mayoritarios de la uva son el linalool, geraniol, nerol, citronelol y el α -terpineol (Mateo y Jiménez, 2000). De los cuales, los más aromáticos son el linalool y el geraniol ya que presentan bajos umbrales de percepción (Strauss *et al*, 1986; Pedersen *et al*, 2003). Estos compuestos aportan un carácter floral al perfil aromático de los vinos (Styger *et al*, 2011).

A pesar de que la presente tesis doctoral está enfocada al envejecimiento de vinos y que dichos vinos son únicamente de la variedad Tempranillo, es interesante mencionar que se han identificado dos compuestos terpénicos por cromatografía de gases con espectrometría de masas, se trata del linalool y el α -terpineol. De los cuáles, el más potente aromáticamente es el linalool, con un umbral de percepción de 15 $\mu\text{g/L}$ y cuyo descriptor olfativo es la lavanda. Frente a los 250 $\mu\text{g/L}$ de umbral de percepción que presenta el α -terpineol (Zalacain *et al*, 2007) y cuyo aroma se describe como un floral aroma a pino.

1.3.2.2 Aromas secundarios

La fermentación alcohólica supone la transformación de los azúcares del mosto en etanol y CO₂. Además, da lugar a la excreción de otros metabolitos directamente relacionados con la glicólisis como el glicerol y el acético, los cuales se encuentran en considerables concentraciones en el vino final (Styger *et al*, 2011). Pero estos no son los únicos metabolitos producidos durante el proceso de vinificación, sino que se liberan una serie de volátiles que pueden enriquecer el perfil aromático del vino. Aportando los denominados “aromas secundarios o fermentativos”. A continuación se describen algunos de los compuestos volátiles fermentativos con importancia en la calidad de vinos tintos.

Los compuestos aromáticos directamente relacionados con la fermentación alcohólica tienen especial importancia. El acetaldehído es un importante compuesto aromático que representa el 90% de los aldehídos presentes en el vino (Styger *et al*, 2011). Este compuesto es producido a través del metabolismo glucídico de la levadura por descarboxilación del piruvato. Además, el proceso de oxidación del etanol y el metabolismo de bacterias acéticas pueden aportar mayores contenidos de acetaldehído a los vinos (Liu y Pilone, 2000). Cuando el acetaldehído se encuentra en bajas concentraciones da lugar a una positiva repercusión sensorial ya que aporta un agradable aroma afrutado. Sin embargo, un aroma irritante con recuerdos a manzana verde y hierba aparece cuando este compuesto se encuentra en grandes concentraciones (Styger *et al*, 2011). Su umbral de percepción varía entre 100-125 mg/L mientras que su concentración media en vinos es de 30 mg/L (Liu y Pilone, 2000; Peinado *et al*, 2004b; Moreno-Arribas y Polo, 2009). Además de su repercusión sobre el perfil aromático, cabe destacar la capacidad del acetaldehído para reaccionar con otros compuestos. Tanto con proteínas y aminoácidos libres, dando lugar a una amplia gama de compuestos aromáticos, como con los antocianos y otros polifenoles del vino (Styger *et al*, 2011).

Otro importante compuesto aromático es el diacetilo. Dicho compuesto se forma a partir del acetaldehído y su principal origen es el metabolismo de las bacterias lácteas durante la fermentación maloláctica. Aunque las levaduras también son capaces de sintetizarlo. Presenta un umbral de percepción de 8mg/L, aportando a bajas concentraciones aromas a nueces. En altas concentraciones se relaciona directamente con el carácter lácteo de un vino, por su aroma a mantequilla (Styger *et al*, 2011). La mayoría del diacetilo es

metabolizado en acetoína y 2,3-butanodiol. Estos compuestos tienen un alto umbral de percepción (150 mg/L) por lo que no son fuertemente aromáticos. El 2,3-butanodiol se origina por reducción de la acetoína. Su concentración media en vinos es de 0,57 g/L. Aunque puede aparecer en concentración de hasta 3g/L teniendo repercusiones sobre la estructura del vino (**Moreno-Arribas y Polo, 2009**).

Alcoholes superiores

Otra familia química de origen fermentativo y con importancia sobre el perfil aromático de los vinos son los alcoholes superiores. Dichos compuestos son producidos durante el metabolismo de aminoácidos (ruta de Ehrlich). El catabolismo de los aminoácidos ramificados (leucina, valina e isoleucina), de los aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y del azufrado metionina lleva a la formación de los ácidos de fusel y subsecuentemente de los alcoholes de fusel o alcoholes superiores (**Suárez-Lepe y Morata, 2015**).

Los alcoholes superiores en grandes concentraciones tienen un efecto negativo sobre la calidad del vino, se considera que contenidos totales superiores a 400 mg/L suponen una percepción organoléptica negativa (**Rapp y Versini, 1995**). El contenido medio en vinos varía entre 130-520 mg/L. Los más importantes son el 2-metil-1-butanol y el 3-metil-1butanol (alcohol isoamílico). Este último es el de mayor importancia cuantitativa, al encontrarse en concentraciones que oscilan entre 90 y 300 mg/L (**Suárez-Lepe y Morata, 2015**). El único alcohol superior que contribuye positivamente al aroma del vino es el 2-feniletanol cuyo descriptor olfativo son los pétalos de rosa (**Swiegers et al, 2005**). Dicho compuesto presenta un umbral de percepción de 10 mg/L (**König et al, 2009**).

Los altos niveles en alcoholes superiores dan lugar a sensaciones vinosas. El empleo de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con baja producción de estos compuestos permite una mejor expresión varietal de las uvas tintas que es a su vez es mejor valorada por los catadores (**Suárez-Lepe y Morata, 2015**).

Ésteres

Los ésteres volátiles constituyen un importante grupo de compuestos aromáticos, y se consideran la principal fuente del aroma afrutado de los vinos (**Liu *et al*, 2000; Sumby *et al*, 2010**). Los ésteres se forman cuando reaccionan un alcohol y un grupo carboxilo liberándose una molécula de agua. En el vino los ésteres se pueden clasificar en dos grupos: los formados durante el envejecimiento por esterificación química entre alcoholes y ácidos a pH bajos, y los formados enzimáticamente. La síntesis enzimática de ésteres está catalizada por esterasas y lipasas que son producidas por muchos microorganismos (**Suárez-Lepe y Morata, 2015**). Las reacciones de esterificación entre un alcohol y un ácido son demasiado lentas para ser las causantes de las grandes cantidades de esteres que se encuentran en los vinos, por lo que la síntesis enzimática parece ser el principal responsable (**Styger *et al*, 2011**).

Entre los ésteres más importantes de los vinos tintos se pueden destacar el acetato de etilo y el lactato de etilo. El acetato de etilo es el éster más abundante en vinos y da a lugar a efectos favorables sobre la percepción organoléptica siempre y cuando se presente en concentraciones inferiores a 80 mg/L (**Plata *et al*, 2003**) ya que a concentraciones mayores aporta un desagradable aroma a disolvente y barniz (**Sumby *et al*, 2010**). El lactato de etilo es un éster con repercusión sensorial positiva asociado con aroma afrutado y lácteo, su umbral de percepción es de 150 mg/L (**Peinado *et al*, 2004a; Lloret *et al*, 2002**). Además contribuye a la suavidad en boca del vino (**Tao y Li, 2009**). El lactato de etilo se forma a partir de la reacción de esterificación entre el etanol y el ácido láctico. Antes de realizar la fermentación maloláctica, su concentración media en el vino tinto varía entre 5-8 mg/L, y se incrementa hasta 90-150 mg /L tras el metabolismo de las bacterias ácido lácticas (**Loira, 2014**).

1.3.2.3 Aromas terciarios

Los aromas terciarios son los obtenidos durante el envejecimiento del vino. En la D.O Ribera del Duero (España) el término comercial “Crianza” se reserva a los vinos tintos envejecidos en barrica. Durante el proceso de envejecimiento en barrica de roble ocurren una serie de procesos químicos, físicos y físico-químicos como la clarificación del vino, la difusión de oxígeno a través de los poros de la madera y la extracción tanto de compuestos aromáticos como de taninos (**Fernández de Simón *et al*, 2003; De Simón *et al*, 2014**). Como parte del estudio aromático de los vinos estudiados, tienen especial importancia los compuestos aromáticos que desde la madera de roble se cederán al vino en crianza sobre lías, enriqueciendo el perfil aromático del mismo. A este respecto, cabe destacar la composición química de la madera, que dependerá de diferentes factores como la especie de roble, el origen geográfico o el procesado en la tonelería (secado y tostado) (**Fernández de Simón *et al*, 2003**). En concreto, tiene gran importancia el tratamiento de tostado que se lleva a cabo en la tonelería. Durante dicho tratamiento se producen diversas modificaciones sobre la estructura macromolecular de la madera, esto conduce a la degradación de polisacáridos y fenoles, dando lugar a la aparición de nuevos compuestos volátiles como los compuestos furánicos y los fenoles volátiles (**García *et al*, 2012**).

A continuación se describen los diferentes compuestos procedentes tanto de barricas como de chips de roble, que han sido analizados por GC-MS.

Fenoles volátiles

Entre los compuestos de madera de roble agrupados como fenoles volátiles cabe destacar el guaiacol y el eugenol. Ambos se obtienen por la ruptura de la lignina durante el proceso de tostado en tonelería. El guaiacol es el compuesto responsable de los aromas a quemado y ahumado de los vinos envejecidos (**Arapistas *et al*, 2004**). Este compuesto aumenta su concentración en vinos junto con la intensidad de tostado (**Pérez-Prieto *et al*, 2002**). Y su umbral de percepción es de 75 µg/L (**Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2006; Díaz-Plaza *et al*, 2002**). El eugenol presenta un menor umbral de percepción (15 µg/L de acuerdo con **Díaz-Plaza *et al*, (2002)**), aportando aromas especiados además de los ahumados (**Arapistas *et al*, 2004**).

Es complicado definir los contenidos medios de compuestos aromáticos de madera presentes en vinos envejecidos ya que esto depende de diversos factores. Entre ellos se puede destacar el tipo de roble (francés o americano), la intensidad de tostado, los usos de la barrica y el tiempo de contacto entre la barrica y el vino. **Towey y Waterhouse, 1996** realizaron un envejecimiento de vino de la variedad Chardonnay en barricas nuevas, tanto de roble americano como francés, durante un periodo de 7 meses. Las concentraciones medias de guaicol fueron de 53 µg/L en barricas de roble americano y 49 µg/L en barricas de roble francés. Del mismo modo los contenidos en eugenol fueron de 20 µg/L tanto en roble francés como americano.

Compuestos furánicos

Otra familia de compuestos que podemos encontrar en los vinos envejecidos en barrica son los compuestos furánicos. Estos compuestos proceden de la degradación de monosacáridos. El hidroximetilfurfural y el 5-metilfurfural proceden de las hexosas de celulosas, mientras que el furfural deriva de las pentosas, las cuales son los componentes principales de las hemicelulosas (**Garcia *et al*, 2012**). La aportación sensorial del furfural es debida a sus aromas a frutos secos, en concreto a almendras tostadas (**Arapitsas *et al*, 2004**). No se trata de un compuesto aromático intenso ya que presenta un alto umbral de percepción de 20 mg/L de acuerdo con **Díaz-Plaza *et al*, 2002**. En el estudio citado anteriormente, **Towey y Waterhouse, 1996** obtuvieron valores medios de furfural de 4500 µg/L en barricas de roble francés y 4700 µg/L en barricas de roble americano, ambos valores por debajo del umbral de percepción de este compuesto. Otro compuesto furánico de importancia, es el 5-metilfurfural que también aporta aromas a almendra tostada y presenta un alto umbral de percepción 45 mg/L.

Es interesante destacar que es posible apreciar una disminución de estos aldehídos durante el envejecimiento. Esto es debido a la reducción biológica de estos compuestos a su alcohol correspondiente. De estos alcoholes el más importante es el alcohol furfurílico (**Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2006**).

Lactonas

Desde el punto de vista sensorial las roble-lactonas son los compuestos más importantes cedidos por la madera. Están presentes en la madera antes del tostado pero su contenido aumenta con el mismo. La roble-lactona (*cis* y *trans* isómeros de β -metil- γ -octolactona) a menudo es denominada whisky-lactona al ser descubierta en el Bourbon. Se origina a través de los lípidos del roble, en concreto por oxidación de los mismos (**Pérez-Prieto *et al*, 2002**). Dichos compuestos influyen directamente sobre el carácter del vino envejecido. Las roble-lactonas se encuentran en el vino en equilibrio con su forma ácida y su correspondiente éster etílico (**Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2006**). A estos compuestos se les atribuye el carácter a madera y coco (**Arapitsas *et al*, 2004**). Aunque también son descritos por otros autores como responsables de notas a vainilla y chocolate negro (**Pollnitz *et al*, 1999**). El isómero *cis* es más potente aromáticamente, con un umbral de percepción de 92 $\mu\text{g/L}$ (**Pérez-Prieto *et al*, 2002**). Aunque otros autores lo sitúan en 46 $\mu\text{g/L}$ (**Wilkinson *et al*, 2004**). Un mayor umbral de percepción es atribuido al isómero *trans* (460 $\mu\text{g/L}$ de acuerdo con **Chatonnet *et al*, 1990**).

Como referencia a su contenido en vinos, una vez más podemos referirnos al estudio de **Towey y Waterhouse, (1996)** que tras los 7 meses de envejecimiento en barricas nuevas obtuvieron contenidos medios del isómero *cis* en torno a 225 $\mu\text{g/L}$ en roble americano y 120 $\mu\text{g/L}$ en roble francés. En cuanto a los valores medios que dichos autores obtuvieron en el isómero *trans*, fueron de 40 y 90 $\mu\text{g/L}$ en roble americano y francés respectivamente.

Aldehídos y alcoholes fenólicos

Los aldehídos fenólicos son generados durante la termodegradación de la lignina en el proceso de tostado (**García *et al*, 2012**). La vainillina es el aldehído fenólico de mayor importancia que podemos encontrar en vinos envejecidos. Su presencia se considera positiva por su agradable aportación de aroma a vainilla (**Arapitsas *et al*, 2004**) y su bajo umbral de percepción de 320 $\mu\text{g/L}$ (**Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2006**) hace que sea un compuesto de gran importancia sobre el perfil aromático de los vinos envejecidos. Otro compuesto derivado de la hidrólisis de la lignina que también aporta aromas a vainilla es el siringaldehído. Dicho compuesto, se puede encontrar en grandes cantidades

en vinos envejecidos pero no suele influir sobre el perfil sensorial del mismo ya que presenta un alto umbral de percepción, 50 mg/L de acuerdo con (**Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2006**).

Los aldehídos fenólicos, al igual que los aldehídos furánicos, se pueden reducir a su alcohol correspondiente durante el envejecimiento. Tras un tiempo de crianza en barrica, el contenido en vainillina puede verse reducido por su paso a alcohol vainílico. Este compuesto es más estable que la vainillina, ya que no parece sufrir transformaciones durante el envejecimiento (**Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2006**).

Es interesante destacar que hay variaciones en la concentración de vainillina encontrada por diferentes autores. **Towey y Waterhouse, (1996)** no detectaron vainillina en vinos Chardonnay envejecidos durante 7 meses en barricas nuevas. Mientras que **Pérez-Prieto et al, (2002)** obtuvieron concentraciones medias en torno a 90 µg/L en barricas de roble americano y 50 µg/L en barricas de roble francés. Ambas de 3 usos tras un envejecimiento de 6 meses con vino tinto de la variedad Monastrell.

Etilfenoles

Durante el periodo de envejecimiento, microorganismos indeseables, tales como *Brettanomyces* pueden aparecer en la barrica de roble, produciendo cantidades significativas de etilfenoles que aportan un desagradable aroma medicinal, a establo y el denominado “gusto a caballo” (**Pérez-Prieto et al, 2002**). Los etilfenoles que podemos encontrar en vinos envejecidos son el 4-etilfenol y el 4-etilguaiaicol. Ambos compuestos son formados por *Brettanomyces* a partir de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico de las uvas (**Pérez-Prieto et al, 2002**). El 4-etilfenol presenta un umbral de percepción de 620 µg/L, mientras que el 4-etilguaiaicol de 140 µg/L (**Chatonnet et al, 1992**). Una inadecuada sanitación, valores elevados de pH, y bajas concentraciones de SO₂ son condiciones propicias para el desarrollo de *Brettanomyces* que deberán evitarse durante el envejecimiento en barrica.

1.4 Objetivos

Objetivo general 1

El objetivo general de esta tesis es determinar si el tratamiento con US del vino en presencia de lías o bien, de la lía de levadura, es un método adecuado para acelerar la técnica tradicional de CSL, consiguiéndose en un tiempo menor vinos tintos de calidad, con características similares a los obtenidos en el proceso tradicional de envejecimiento.

Objetivo general 2

Realizar un estudio comparativo de vino tinto envejecido en barricas de roble francés con denominaciones comerciales similares. Para, de esta forma, obtener información objetiva que permita al enólogo la elección de la barrica que mejor se adapte al proceso de envejecimiento en crianza sobre lías y a la obtención de vinos tintos de calidad diferenciada.

Objetivos específicos

A continuación, se enumeran los objetivos específicos de los ensayos realizados para la consecución del objetivo general 1:

1. Evaluar el efecto de la aplicación de ultrasonidos sobre medio modelo en presencia de lías. Obteniendo, mediante el seguimiento de cesión de polisacáridos, información sobre la velocidad de autólisis celular en estas condiciones.
2. Evaluar la calidad de los vinos que han sufrido tratamientos de sonicación, utilizando para ello la medida analítica de compuestos con repercusión directa sobre la calidad de los vinos tintos, así como la repercusión sensorial que tiene dicho tratamiento.
3. Evaluar la aplicación de ultrasonidos sobre lías húmedas para su posterior adición a medio modelo. Para obtener, mediante el seguimiento de cesión de polisacáridos, información sobre la velocidad de autólisis celular de la levadura en estas condiciones.
4. Evaluar la calidad de los vinos obtenidos a escala laboratorio, tras el proceso de envejecimiento sobre lías húmedas sonicadas. Utilizando para ello la medida de

compuestos con repercusión directa sobre la calidad de los vinos tintos, así como la repercusión sensorial que tiene el citado proceso de envejecimiento sobre los vinos.

5. Evaluar la calidad de los vinos obtenidos a escala semi-industrial en “Bodegas Comenge”, tras el proceso de envejecimiento sobre lías húmedas sonicadas en barricas de acero inoxidable de 120 L de capacidad.

CAPÍTULO II: MATERIAL Y ***MÉTODOS***

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se han realizado tres ensayos con los que se pretende utilizar la tecnología de ultrasonidos (US) para acelerar la crianza sobre lías (CSL) sin afectar a la calidad de los vinos envejecidos. Dos de ellos a escala laboratorio (ensayos 1 y 2) y uno a escala semi-industrial (ensayo 3).

Se ha realizado un cuarto ensayo semi-industrial complementario, con el que se pretende obtener información objetiva sobre las maderas de roble utilizadas en crianza.

2.1 Particularidades de los ensayos realizados

A continuación se describen las particularidades de la ejecución de los cuatro ensayos que componen la presente tesis. Los métodos analíticos y los procesos comunes a varios ensayos, así como el material utilizado (tipos de vinos y biomasa de levaduras) y los equipos empleados se describen detalladamente en los epígrafes 2.2 al 2.14, haciendo referencia a los ensayos donde se han realizado dichos métodos analíticos y procesos.

2.1.1 Ensayo 1. Sonicación de vinos durante la CSL

El primer ensayo del presente trabajo se realizó sobre dos grupos de muestras. Vino tinto de la variedad tempranillo, para el análisis de parámetros de calidad. Y medio modelo, para la monitorización de la autólisis celular mediante la cesión de polisacáridos en dicho medio.

El ensayo se realizó por triplicado en frascos ISO de 2 litros de capacidad. Dejando un espacio de cabeza de 63 mL, correspondiente con el volumen del sonotrodo. De forma que al introducir el mismo para el tratamiento de US, el líquido llenó en su totalidad el frasco sin espacios de aire. Todas las muestras se mantuvieron cerradas con tapón de polipropileno durante el envejecimiento, que se realizó a 14°C durante 135 días. La agitación una vez por semana simuló el proceso tradicional de “bâtonnage”.

La dosis añadida de biomasa de levadura liofilizada fue de 0,8 g/L y la dosis de chips de roble fue de 2,5 g/L.

Códigos de muestras

Los tratamientos realizados a cada tipo de muestra por triplicado siguieron los siguientes códigos de identificación.

- C: Vino tinto control.
- CU: Vino tinto con tratamiento con US.
- CL: Vino tinto con adición de lías de levadura liofilizada.
- CLU: Vino tinto con adición de lías de levadura liofilizada y tratamiento con US.
- CLC: Vino tinto con adición de lías de levadura liofilizada y adición de chips de roble.
- CLCU: Vino tinto con adición de lías de levadura liofilizada, adición de chips de roble y tratamiento con US.
- M: Medio modelo control.
- MU: Medio modelo con tratamiento con US.
- ML: Medio modelo con adición de lías de levadura liofilizada.
- MLU: Medio modelo con adición de lías de levadura liofilizada y tratamiento con US.

Figura 6. Esquema de ejecución del ensayo I. Sonicación de vinos durante la CSL.

Tratamiento de US

Tanto el vino tinto como el medio modelo fueron tratados con US, 5 minutos 2 veces por semana durante las primeras 5 semanas. A partir de este momento, con la intención de acelerar la lisis celular, el tratamiento se aumentó a 15 minutos, hasta obtener un tiempo de tratamiento acumulado de 170 minutos. Una vez alcanzado dicho tiempo, la CSL se llevó a cabo sin ningún tratamiento, a excepción de la toma de muestra y la agitación semanal.

Análisis realizados en muestras de vino tinto

Análisis realizados de forma periódica para la monitorización de la crianza de los vinos objeto de estudio:

- Parámetros enológicos básicos.
- Índice de polifenoles totales (IPT).
- Oxígeno disuelto.
- Intensidad colorante.
- Tonalidad.
- Compuestos volátiles procedentes de la fermentación.
- Contenido en antocianos y piranoantocianos.

Análisis realizados una única vez al finalizar el periodo de envejecimiento:

- Volátiles procedentes de madera de roble.
- Compuestos terpénicos procedentes de la variedad de uva.
- Contenido de proantocianidinas.
- Actividad tánica específica (ATE).
- Análisis sensorial por panel de cata experto.

Análisis realizados en muestras de medio modelo

Análisis realizados de forma periódica para la monitorización de la cesión de polisacáridos y el poder reductor de las lías.

- Contenido en polisacáridos.
- Oxígeno disuelto.

2.1.2 Ensayo 2. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala laboratorio)

Al igual que en el primer ensayo, se realizó sobre dos grupos de muestras. Vino tinto de la variedad tempranillo, para el análisis de parámetros de calidad. Y medio modelo, para la monitorización de la autólisis celular mediante la cesión de polisacáridos en dicho medio.

El ensayo se realizó por triplicado en frascos topacios de 1 L de capacidad. Dejando un espacio de cabeza de 63 mL, correspondiente con el volumen del sonotrodo. Todas las muestras se mantuvieron cerradas con tapón de polipropileno durante el envejecimiento que se realizó a 14°C durante 60 días. Las muestras se agitaron una vez por semana, simulando el proceso tradicional de “bâtonnage”.

La dosis añadida de biomasa de levadura húmeda con y sin sonicación fue de 6 g/L y la dosis de chips de roble fue de 2,5 g/L.

Figura 7. Esquema de ejecución del ensayo 2. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala laboratorio).

Códigos de muestras

Los tratamientos realizados a cada tipo de muestra por triplicado siguieron los siguientes códigos de identificación.

- C: Vino tinto control.
- CL: Vino tinto con adición de lías de levadura húmeda.
- CLS: Vino tinto con adición de lías de levadura húmeda sonicada.
- CC: Vino tinto con adición de chips de roble.
- CCL: Vino tinto con adición de chips de roble y lías de levadura húmeda.
- CCLS: Vino tinto con adición de chips de roble y lías de levadura húmeda sonicada.
- ML: Medio modelo con adición de lías de levadura húmeda.
- MLS: Medio modelo con adición de lías de levadura húmeda sonicada.

Tratamiento de US

Se trató con US un volumen de 50 mL de lías de levadura húmeda, hasta la apreciación visual de la aparición de células lisadas en microscopía óptica. Esto ocurrió tras 20 minutos de tratamiento. Es conveniente indicar que la sonicación se realizó previamente a la adición a vinos y medios modelo, por lo que las muestras no sufrieron ningún tratamiento durante el envejecimiento.

Análisis realizados en muestras de vino tinto

Análisis realizados de forma periódica para la monitorización de la crianza de los vinos objeto de estudio:

- Parámetros enológicos básicos.
- Índice de polifenoles totales (IPT).
- Oxígeno disuelto.

- Intensidad colorante.
- Tonalidad.
- Volátiles procedentes de la fermentación.
- Contenido en antocianos y piranoantocianos.

Análisis realizados una única vez al finalizar el periodo de envejecimiento:

- Análisis de compuestos volátiles procedentes de la madera de roble.
- Análisis sensorial por panel de cata experto.

Análisis realizados en muestras de medio modelo.

Análisis realizados de forma periódica para la monitorización de la cesión de polisacáridos y el poder reductor de las lías.

- Contenido en polisacáridos.
- Oxígeno disuelto.

Al final del periodo de envejecimiento, también se midió el tiempo de decantación de las lías en medio modelo, para de esta forma obtener información sobre cómo el tratamiento de US podría afectar a la futura clarificación del vino.

2.1.3 Ensayo 3. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala semi-industrial)

Este tercer ensayo se realizó a escala semi-industrial, tratando de apreciar posibles variaciones con el ensayo 2, debidas al aumento de volumen en la CSL. Dicho ensayo se efectuó en “Bodegas Comenge” (Ribera del Duero, España).

El ensayo se realizó por triplicado en barricas de acero inoxidable de 120 L de capacidad. Todas se mantuvieron cerradas con tapón de acero inoxidable excepto para el “bâtonnage” semanal y la toma de muestra bimensual. El envejecimiento tuvo una

duración de 211 días en la sala de barricas de Bodegas Comenge (14°C). La dosis añadida de levadura húmeda sonicada fue de 6 g/L.

Figura 8. Esquema de ejecución del ensayo 3. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala semi-industrial).

Códigos de muestras

Las barricas de acero inoxidable, por triplicado, fueron identificadas con el siguiente código.

- C: Vino tinto control.
- CLS: Vino tinto control con adición de lías de levadura húmeda sonicada.

Tratamiento de US

Se trataron con US 2L de levadura húmeda, hasta la apreciación visual de células lisadas en microscopía óptica. Esto ocurrió tras 30 minutos de tratamiento.

Análisis realizados periódicamente

Análisis realizados de forma periódica para la monitorización de la crianza de los vinos objeto de estudio:

- Parámetros enológicos básicos.
- Oxígeno disuelto.
- Índice de polifenoles totales (IPT).
- Intensidad colorante.
- Tonalidad.
- Volátiles procedentes de la fermentación.
- Contenido en antocianos y piranoantocianos.

2.1.4 Ensayo 4. Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares

El hecho de que la CSL se suele realizar en barrica de roble, junto a la necesidad de envejecimiento en madera para la denominación “Crianza” en Ribera del Duero, ha dado lugar a la realización de este último ensayo. Se trata de un ensayo comparativo de barricas nuevas de roble de 225 L de capacidad. El ensayo se ha realizado por triplicado para las barricas de roble francés utilizadas actualmente en “Bodegas Comenge”. Durante un periodo de envejecimiento de 240 días a una temperatura de 14°C se envejeció vino tinto en barricas pertenecientes a las siguientes tonelerías: Surtep (Bordeaux, Francia); Tonnellerie Sylvain (Saint-Denis-de-Pile, Francia); Boutes (Bordeaux, Francia); Alain Fouquet (Angers, Francia); Brive Tonneliers (Brive-la-Gaillarde, Francia). Todos los vinos fueron envejecidos durante 8 meses y la toma de muestra fue bimensual.

Figura 9. Esquema de ejecución del ensayo 4. Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares.

Códigos de muestras

La tabla 1 muestra los códigos con que se identificaron las diferentes barricas de roble objeto de estudio, así como sus características comerciales.

Tabla 1. Barricas utilizadas en el ensayo 4. Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares.

Código de muestras	Barrica	Origen	Tostado	Edad	Volumen	Tiempo de envejecimiento
STP	Surtep Top Premium	Roble francés	Medio	Nuevo uso	225 L	14°C durante 240 días
SP	Surtep Premium	Roble francés	Medio	Nuevo uso	225 L	14°C durante 240 días
SR	Sylvain Réserve	Roble francés	Medio	Nuevo uso	225 L	14°C durante 240 días
BC	Boutes Coeur	Roble francés	Medio plus	Nuevo uso	225 L	14°C durante 240 días
AF	Alain Fouquet St. Emilion Style	Roble francés	Medio bajo	Nuevo uso	225 L	14°C durante 240 días
TB	Treuil Tonnellerie de Brive	Roble francés	Medio bajo	Nuevo uso	225 L	14°C durante 240 días

Análisis realizados periódicamente

Análisis realizados de forma periódica para la monitorización de la crianza de los vinos objeto de estudio:

- Parámetros enológicos básicos.
- Índice de polifenoles totales (IPT).
- Intensidad colorante.
- Tonalidad.
- Contenido en antocianos y piranoantocianos.
- Volátiles procedentes de la madera de roble.

2.2 Obtención de biomasa de levadura

Las lías de levadura utilizadas en los ensayos del presente trabajo, se han obtenido a partir de la cepa CTPL22 *Saccharomyces cerevisiae* (aislada en Ribera del Duero, España). Dicha levadura ha sido seleccionada en investigaciones anteriores por el Departamento de Química y Tecnología de Alimentos de la E.T.S.I Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (UPM).

La biomasa de levadura añadida en los ensayos a escala laboratorio (**ensayos 1 y 2**) se obtuvo mediante crecimiento en medio YEPD enriquecido con glucosa hasta 100 g/L. La biomasa fue lavada con agua destilada y centrifugada a 1200 rpm durante 3 minutos. A continuación se descartó el sobrenadante. Este proceso de lavado y centrifugación se repitió 3 veces. Para el **ensayo 1**, la biomasa además fue liofilizada utilizando un aparato Edwards Modulyo (Crawley, Reido Unido).

La biomasa de levadura añadida en el **ensayo 3** a escala semi-industrial se obtuvo por multiplicación celular de la cepa CTPL22 en un bioreactor de 400 L de capacidad (**Figura 11**) situado en Bodegas Comenge. Dicho bioreactor fue diseñado en proyectos de investigación anteriores por el Departamento de Química y Tecnologías de Alimentos de la E.T.S.I. Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (UPM) en colaboración con Bodegas Comenge. El proceso de multiplicación celular estuvo basado en el mantenimiento de una temperatura de $27\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante dos días a suministro constante de oxígeno y con agitación continua. Tras dos días de multiplicación en estas condiciones, se obtuvieron 4 L de lías húmedas limpias (lavadas con agua destilada).

Figura 10. Esquema de obtención de biomasa de levadura para los ensayos 1 y 2

Figura 11. Fermentador para elaboración de biomasa de levadura a escala semi-industrial.

2.3 Vinos tintos, medios modelo y chips de roble utilizados

Todos los vinos utilizados en este trabajo son vinos tintos elaborados a partir de uva de *Vitis vinifera* de la variedad Tempranillo. Elaborados en Bodegas Comenge por procesos tradicionales orientados a la obtención de vinos óptimos para la crianza en barrica de roble. Todos los vinos realizaron la fermentación maloláctica con anterioridad al inicio de los ensayos.

El vino utilizado en el **ensayo 1** pertenece a la cosecha 2015 y tuvo un envejecimiento previo en barrica de tres meses. Los análisis previos a la realización del ensayo dieron lugar a los siguientes valores: pH=3,8; acidez volátil=0,34 g/L expresada como ácido acético; contenido en etanol 14% vol/vol; ácido láctico=2g/L; contenido en sulfuroso total=90 mg/L, índice de polifenoles totales (IPT)=55; Contenido en antocianos totales=220 mg/L.

El vino utilizado en los **ensayos 2 y 3** pertenece a la cosecha 2016. También fue envejecido previamente en barrica de roble durante 3 meses y su análisis inicial dio lugar a los siguientes valores: pH=3,6; acidez volátil=0,38 expresada como ácido acético; contenido en etanol=13,5 % vol/vol; ácido láctico=2g/L; Contenido en sulfuroso total=70 mg/L; Índice en polifenoles totales=56; antocianos totales=175 mg/L; intensidad colorante=1,2 (unidades de absorbancia); Tonalidad=60,8 (adimensional); volátiles totales de fermentación=1755,8 mg/L.

El ensayo comparativo de vino envejecido en barricas de roble (**ensayo 4**) se realizó con vino de la campaña 2017, en dicho vino inicial, solo se realizó un análisis de parámetros básicos mostrando un pH de 3,7; un contenido en etanol de 14 % vol/vol y una acidez volátil de 0,35 g/L expresado como ácido acético.

El medio modelo que ha sido utilizado en los **ensayos 1 y 2** para simular la CSL fue elaborado con características similares a la de los vinos de los citados ensayos. La composición de dicho medio es agua destilada con etanol en un 14% vol/vol, acidificado con ácido fosfórico hasta un pH de 3,8 y sulfitado en una dosis de 90 mg/L con K₂S₂O₅.

Los chips de madera de roble utilizados en los **ensayos 1 y 2** fueron suministrados por Boisé (Villeneuve-lès-Maguelone, Francia) con la denominación comercial “tostado

medio”. Antes del pesado previo a la adición en las muestras, se identificaron los chips de tamaño similar para obtener una superficie de extracción lo más homogénea posible.

2.4 Tratamiento de ultrasonidos

El equipo “UP400ST digital ultrasonic processor” (Hielscher, Teltow, Alemania) (**Figura 12**) de 400W y 24 kHz fue utilizado para realizar la sonicación de los vinos y medios modelo de los **ensayos 1, 2 y 3**. El sonotrodo que complementó dicho equipo fue un H22DL2 (Hielscher, Teltow, Alemania) que cuenta con un diámetro de 22 mm y una profundidad máxima en el medio a tratar de 165mm, una amplitud máxima de 50 μm y una densidad de poder acústica de 52 W/cm^2 .

Figura 12. Equipo UP400ST y sonotrodo H22DL2 para la sonicación de muestras de vino y de biomasa de levadura húmeda.

2.5 Análisis de parámetros enológicos básicos

La denominación “parámetros enológicos básicos” hace referencia a la medida de etanol y pH llevada a cabo como análisis inicial de los vinos a utilizar en los diferentes ensayos. Junto con el análisis de acidez volátil, realizado de forma periódica en todos los vinos estudiados.

El equipo utilizado para la obtención de los citados parámetros ha sido un OenoFoss™ (FOSS Iberia, Barcelona, España) (**Figura 13**) dicho equipo utiliza espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Figura 13. Equipo Oenofoss para medida de parámetros enológicos básicos.

2.6 Análisis de oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto fue medido tanto en vinos como en medios modelo de los **ensayos 1, 2 y 3** utilizando un oxímetro HI9146V (Hanna instruments, Rhode Island, Estados Unidos) (**Figura 14**). Las medidas se realizaron durante un minuto, tiempo en que las muestras estuvieron abiertas hasta la estabilización del oxímetro a valor constante. Se utilizó un agitador magnético para homogenizar el contenido de oxígeno alrededor de la membrana de la sonda.

Figura 14. Oxímetro HI9146V para medida de oxígeno disuelto.

2.7 Análisis espectrofotométricos

Los parámetros colorimétricos intensidad colorante y tonalidad se determinaron en todos los ensayos utilizando un equipo Agilent 8453 UV-visible System (Agilent Technologies, California, Estados Unidos) (**Figura 15**) de acuerdo con el método de Glories (**Glories, 1984a; 1984b**). Dicho método se basa en la determinación de la absorbancia a las

longitudes de onda 420, 520 y 620 nm en cubetas de vidrio de 1mm de paso óptico. La intensidad colorante se obtuvo por suma de las tres longitudes de onda y la tonalidad a partir del ratio entre las absorbancias a 420 y 520 nm.

El tiempo de decantación (**ensayo 2**) se obtuvo por consecutivas medidas de absorbancia a 480 nm durante un total de 28,3 horas en una cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico.

El índice de polifenoles totales (IPT) en todos los ensayos, se obtuvo utilizando el mismo espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm. En este caso, se utilizaron cubetas de cuarzo de 1cm de paso óptico tras previa dilución del vino en agua destilada (1/100). El valor del IPT (adimensional) corresponde con la absorbancia a 280 nm multiplicado por el factor de dilución.

Figura 15. Espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible para la medida de IC, T, IPT y tiempo de decantación.

2.8 Análisis de actividad tánica específica (ATE)

Este análisis se realizó únicamente en las muestras de vino correspondientes al **ensayo 1** como complemento a la información aportada con el análisis de procianidinas realizado en el mismo ensayo. La ATE se obtuvo de acuerdo al método descrito por **De Freitas y Mateus, (2001)**. Dicho método se basa en la diferencia entre medidas nefelométricas de la dilución del vino problema (1/50) antes y después de la adición de 300µL de dilución de albumina de suero bovino (0,8 g/L) y tras 20 minutos de reposo en la oscuridad.

La turbidez, expresada en unidades nefelométricas de turbidez (UNT) se midió usando un equipo HI 93703 (Hanna instruments, Rhode Island, USA).

2.9 Análisis de polisacáridos liberados durante la autólisis celular por HPLC-RI.

La cesión de polisacáridos durante la CSL se midió en los **ensayos 1 y 2** únicamente en muestras de medio modelo tras filtración previa de las muestras a 0,45 µm. El análisis se realizó por cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción (HPLC-RI) de acuerdo con el método descrito por **Loira et al, (2013)**. Para ello, se utilizó un cromatógrafo Waters (Waters, Milford, Estados Unidos) (**Figura 16**) equipado con una bomba 600E, un inyector 717p y un detector RI 2410. La separación se realizó con una columna de exclusión molecular Ultrahydrogel 250 (Waters, Milford, Estados Unidos).

El eluyente utilizado fue una dilución NaNO₃ (0,1 M) en agua ultrapura (MilliQ). El tamaño de los polisacáridos fue comparado con estándares conocidos de pululanos (Shodex, Showa Denko K.K, Japón): P-800 (788 kDa), P-400 (404 kDa), P-200 (212 kDa), P-100 (112 kDa), P-50 (47,3 kDa), P-20 (22,8 kDa), P-10 (11,8 kDa) y P-5 (5,9 kDa). El contenido en polisacáridos presente en los medio modelo de los **ensayos 1 y 2** fue calculado a partir de una recta de calibrado, realizada a partir de los estándares anteriormente citados.

Figura 16. Equipo HPLC-RI para medida de polisacáridos

2.10 Análisis de compuestos volátiles procedentes de la fermentación por GC-FID

Los compuestos volátiles procedentes de la fermentación alcohólica se analizaron por cromatografía de gases por detector de ionización en llama (GC-FID), de acuerdo con el método descrito por **Abalos *et al*, (2011)** tras filtrado previo de las muestras de vino a 0,45 μm . Este análisis se realizó en los ensayos **1,2 y 3**. El equipo utilizado fue un Agilent Technologies 6850 (Agilent Technologies, California, USA) (**Figura 17**) con inyector automático 6850, detector de ionización en llama integrado y una columna capilar DB-624 de 60 m x 250 μm x 1,40 μm .

El gas portador utilizado es hidrógeno a un flujo de 22,1 L/min. Los gases nitrógeno y aire sintético son utilizados en el detector, para la estabilización de la señal y favorecer la formación de la llama. La separación de volátiles en la columna se realizó de acuerdo a un gradiente de temperaturas. La temperatura inicial fue de 40°C durante los 5 primeros minutos, incrementando linealmente a razón de 10°C/min hasta alcanzar 250°C que

corresponde con la temperatura del inyector. Esta temperatura se mantuvo durante 5 minutos antes de volver a 40°C. La temperatura del detector fue de 300°C.

El método utiliza 4-metil-2-pentanol como estándar interno y está calibrado con patrones externos en 5 niveles para los siguientes compuestos volátiles: 2,3-butanodiol, acetaldehído, metanol, 1-propanol, diacetilo, acetato de etilo, 2-butanol, isobutanol, 1-butanol, acetoína, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, acetato de isobutilo, butirato de etilo, lactato de etilo, 2,3-butanodiol, acetato de isoamilo, hexanol, 2-feniletanol y acetato de 2-feniletilo (Fluka, Sigma-Aldrich Corp., Buchs SG, Suiza).

Figura 17. Equipo GC-FID para medida de volátiles de fermentación.

2.11 Análisis de compuestos volátiles procedentes de la variedad de uva y de la madera de roble por GC-MS

Los compuestos volátiles procedentes de la madera de roble junto con los compuestos terpénicos procedentes de la variedad de uva, fueron analizados en los ensayos **1,2 y 4** por cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS). Siguiendo el método descrito por **Loira *et al*, (2013)**. El equipo utilizado fue un Agilent Technologies 6890N-MSD-5973N (**Figura 18**) equipado con una columna DB-WAX (30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 μ m de espesor de película) (J&W Scientific, Folsom, Estados Unidos) para la separación cromatográfica.

El ratio SPLIT usado fue 20:1. La temperatura del horno fue de 60°C durante 1 minuto. Se siguió una rampa de temperaturas de 3°C por minuto hasta alcanzar 150°C, donde se continuó con una rampa de 10°C por minuto hasta 260°C. Dicha temperatura se mantuvo durante 2 minutos. El flujo de helio utilizado fue de 1 mL por minuto.

El método de análisis exige una preparación previa de la muestra, que consiste en la extracción con 250 μ L de diclorometano de los volátiles de 2,5 mL de vino. Adicionando previamente 0,37 g de NaCl. Un agitador vortex mezcló los componentes para la posterior centrifugación a 10.000 rpm y 4°C. Por último, la fase de diclorometano se extrajo e introdujo en viales de vidrio para su inyección en el cromatógrafo.

El método utiliza 25 μ L de una dilución 3,4 dimetilfenol (10^5 ppb) como estándar interno. La calibración se realizó para 5 puntos utilizando los siguientes estándares externos: furfural, 5-metilfurfural, alcohol furfurílico, roblelactona, vainillina, vainillato de etilo, acetovainillona, alcohol vainílico, siringaldehído, 4-etilfenol, guaiacol, eugenol y como compuestos terpénicos, el α -terpineol y el linalool.

Figura 18. Equipo GC-MS para la medida de volátiles de la madera de roble y compuestos terpénicos

2.12 Análisis de antocianos y piranoantocianos por HPLC-DAD

Los compuestos antocianos y piranoantocianos se determinaron en **todos los ensayos** por cromatografía líquida de alta resolución asociada a un detector de matriz de fotodiodos (HPLC-DAD) de acuerdo con el método descrito por **Kulkarni *et al*, (2015)**. El equipo utilizado fue un cromatógrafo Agilent 1200 (Agilent Technologies, California, Estados Unidos) (**Figura 19**). Utilizando para la separación una columna de fase reversa Kinetex C18 de dimensiones (100 mm x 4,6 mm y 2,6 μm de tamaño de partícula) (Agilent Technologies, California, Estados Unidos).

La fase móvil está formada por dos eluyentes empleados en modo gradiente a un flujo de trabajo de 0,8 mL/min, eluyente A: agua mili Q/ácido fórmico (95:5 v/v) y eluyente B: metanol/ácido fórmico (95:5 v/v).

La cuantificación se llevó a cabo mediante la calibración con estándar interno de malvidina-3-O-glucósido en un rango de 1 a 500 mg/L. Y los siguientes compuestos fueron identificados por su máxima longitud de onda de absorción: delphinidin-3-O-glucósido (D3G), cianidin-3-O-glucósido (Cy3G), petunidin-3-O-glucósido (Pt3G), peonidin-3-O-glucósido (Pn3G), malvidin-3-O-glucósido (M3G), malvidin-3-O-glucósido-acetaldehído o vitisina B (Vit B), malvidin-3-O-glucósido-piruvato o vitisina A (Vit A), delphinidin-3-O-(6-acetil)-glucósido (D3GAc), cianidin-3-O-(6-acetil)-glucósido (Cy3GAc), petunidin-3-O-(6-acetil)-glucósido (Pt3GAc), peonidin-3-O-(6-acetil)-glucósido (Pn3GAc), malvidin-3-O-(6-acetil)-glucósido (M3GAc), delphinidin-3-O-(6-p-cumaroil)-glucósido (D3GCm), cianidin-3-O-(6-p-cumaroil)-glucósido (Cy3GCm), petunidin-3-O-(6-p-cumaroil)-glucósido (Pt3GCm), peonidin-3-O-(6-p-cumaroil)-glucósido (Pn3GCm), malvidin-3-O-(6-p-cumaroil)-glucósido (M3GCm), malvidin-3-O-glucosido-4-vinilfenol (M3GVnf), malvidin-3-O-glucosido-4-vinilguaiacol (M3GVg) y malvidin-3-O-(6''-p-cumaroil-glucosido)-vinilfenol (M3GCmVnf).

Figura 19. *Equipo HPLC-DAD para la medida de antocianos y piranoantocianos*

2.13 Análisis de proantocianidinas

El análisis de proantocianidinas se realizó en el **ensayo 1**, siguiendo el método descrito por **Sun *et al*, (1998)**. Catequinas, proantocianidinas monoméricas y proantocianidinas poliméricas fueron fraccionadas en cartuchos C₁₈ Sep-Pak (Bedford, Estados Unidos), partiendo de muestras secas de vino. Para el fraccionamiento se hicieron pasar a través de los cartuchos diferentes solventes orgánicos que junto con secados intermedios en corriente de nitrógeno dieron lugar a la obtención de tres fracciones (FI, FII y FIII).

Sobre las diferentes fracciones obtenidas se midió la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro Unicam UV–vis UV4 (Unicam, Cambridge, Reino Unido).

La cuantificación del contenido en proantocianidinas se realizó usando curvas estándar, preparadas a partir de monómeros, oligómeros y polímeros de flavan-3-ol. Dichas curvas, fueron realizadas previamente por el personal investigador del Instituto Superior de Agronomía, Universidad Técnica de Lisboa, Portugal.

Figura 20. Esquema de método de extracción y análisis de proantocianidinas.

2.14 Análisis sensorial

El análisis sensorial se realizó en los **ensayos 1 y 2** por un panel experto de nueve jueces de ambos géneros y edades comprendidas entre 28 y 54 años pertenecientes al Departamento de Química y Tecnología de Alimentos de la E.T.S.I Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (UPM).

Los jueces completaron una ficha de cata bajo iluminación fluorescente, donde se presentaron de forma aleatoria 20 mL en cata-vinos normalizados. Evaluaron los atributos sensoriales en una escala de 1 (atributo no perceptible) a 5 (atributo altamente perceptible). Excepto en el parámetro tonalidad, donde la puntuación 1 hizo referencia a tonos púrpura mientras que la puntuación 5 quedó reservada para tonos amarillos. Al final del análisis, cada juez valoró la impresión general aportada por cada vino, considerando tanto atributos visuales, como gustativos y olfativos, así como la ausencia de defectos.

2.15 Análisis estadístico

El procesamiento estadístico para los datos obtenidos en los ensayos realizados, incluyó medias, desviaciones estándar, test ANOVA y de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD). Además del análisis de componentes principales (PCA). Para todo este procesamiento de datos se utilizó el programa Statgraphics CENTURION XV, v.15 (Graphics Software Systems, Rockville, MD, Estados Unidos) donde el nivel de significación se estableció en $p < 0,05$ (95%).

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

3.1 Ensayo 1. Sonicación de vinos durante la crianza sobre lías (CSL)

La **Tabla 2** muestra de forma resumida las condiciones experimentales del ensayo 1. Se especifican en detalle en el apartado 2.1.1 del Capítulo II: Material y Métodos.

Posteriormente (epígrafes 3.1.1 a 3.1.14) se describen los resultados monitorizados durante el periodo total de envejecimiento, así como los obtenidos al finalizar dicho periodo.

Tabla 2. Diseño experimental del ensayo 1. Sonicación de vinos durante la CSL

Código de muestra	Tipo de muestra	Volumen	Dosis de chips de roble	Dosis de levadura liofilizada	Tratamiento de US	Tiempo de envejecimiento
C	Vino tinto	2L	-	-	-	135 días a 14°C
CU	Vino tinto	2L	-	-	170 min (acumulado)	135 días a 14°C
CL	Vino tinto	2L	-	0,8 g/L	-	135 días a 14°C
CLU	Vino tinto	2L	-	0,8 g/L	170 min (acumulado)	135 días a 14°C
CLC	Vino tinto	2L	2,5 g/L	0,8 g/L	-	135 días a 14°C
CLCU	Vino tinto	2L	2,5 g/L	0,8 g/L	170 min (acumulado)	135 días a 14°C
M	Medio modelo 14%; pH=3,8	2L	-	-	-	135 días a 14°C
MU	Medio modelo 14%; pH=3,8	2L	-	-	170 min (acumulado)	135 días a 14°C
ML	Medio modelo 14%; pH=3,8	2L	-	0,8 g/L	-	135 días a 14°C
MLU	Medio modelo 14%; pH=3,8	2L	-	0,8 g/L	170 min (acumulado)	135 días a 14°C

Figura 21. Procedimiento experimental del ensayo 1. Sonicación de vinos durante la CSL

3.1.1 Polisacáridos liberados durante la autólisis celular

Atendiendo a la evolución del proceso de lisis celular, la monitorización de la liberación de polisacáridos a los medios modelo, ha sido el método utilizado para el seguimiento de la autólisis celular. Se trata de los componentes mayoritarios liberados durante la mencionada autólisis. De los cuales, las manoproteínas son los polisacáridos principales (Fornairon-Bonnefond *et al*, 2002).

La **Figura 22** muestra la liberación de polisacáridos durante los 135 días de envejecimiento. Durante todo el ensayo, se pudieron observar contenidos significativamente mayores de polisacáridos en las muestras sonicadas (MLU). Se

alcanzaron valores de hasta $11,8 \pm 2,1$ mg/L al finalizar el envejecimiento, fueron aproximadamente el doble de los observados en las muestras control sin tratamiento con ultrasonidos (US) ($5,3 \pm 1,5$ mg/L). Esto indica claramente que la sonicación de vinos en presencia de lías podría ser un método efectivo para acelerar la lisis celular y por tanto la CSL.

Figura 22. Polisacáridos (mg/L) liberados durante la CSL en medio modelo en ensayo 1. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.1.2 Evolución del contenido en oxígeno disuelto durante el envejecimiento

De forma general, se pudo apreciar que las muestras de medio modelo mostraron menores contenidos en oxígeno disuelto que las muestras de vino (**Figura 23**). Este hecho posiblemente es debido a la capacidad antioxidante que aportan los polifenoles presentes en el vino (Brenna y Pagliarini, 2001).

En relación a la evolución de oxígeno disuelto en muestras de medio modelo, la **Figura 23a** muestra que los medios modelo sonicados presentaron menores cantidades de oxígeno durante el periodo de tratamiento con US. Estas características no se mantuvieron al finalizar dicho periodo, ya que tras 135 días de envejecimiento, todas las muestras presentaron valores de oxígeno disuelto en torno a 8,5 mg/L. A excepción de las muestras ML que mantuvieron valores significativamente menores (8,1 mg/L).

En cuanto a las muestras de vino, durante los primeros 61 días de envejecimiento (etapa de sonicación) todos los vinos que recibieron tratamiento con US aumentaron los valores en oxígeno disuelto (**Figura 23b**). Dichos valores, fueron inferiores a 4 mg/L, los cuales están lejos de los niveles de saturación de oxígeno en vino (8 mg/L de acuerdo con **Singleton, 1987**). Una vez finalizado el periodo donde se aplicó US, las muestras tratadas redujeron el contenido en oxígeno disuelto a valores cercanos a los de sus controles (C, CL y CLC). Estos valores, en torno a 0,5 mg/L son similares a los encontrados por otros autores tras envejecer vinos en barricas de roble francés (**Nevares y Del Alamo, 2008**).

Figura 23. Evolución de oxígeno disuelto (mg/L) durante el envejecimiento de medio modelo (a) y vinos (b) en el ensayo 1. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.1.3 Evolución de la acidez volátil durante el envejecimiento

La acidez volátil se utiliza rutinariamente como parámetro indicativo del deterioro del vino. Se trata de la suma de los ácidos orgánicos destilables por arrastre de vapor. De los cuales, el ácido acético es el mayoritario. Por esta razón se suele utilizar la acidez volátil para indicar el contenido en ácido acético. Sin embargo, este parámetro también incluye otros ácidos destilables como el fórmico, el propiónico y el butírico (**Zoecklein et al, 1995**).

La **Figura 24** muestra la evolución de la acidez volátil a lo largo del periodo de envejecimiento. Es interesante destacar, que en ninguno de los vinos estudiados se alcanzaron valores considerados perjudiciales para la calidad aromática de los vinos (0,7 g/L de acuerdo con **Blouin y Peynaud, (2004)**).

Durante el periodo de tratamiento con US los contenidos en acidez volátil fueron similares en todas las muestras, con valores entre 0,39 y 0,46 g/L expresado como g/L de ácido acético. Solo se apreciaron diferencias significativas entre muestras control sin tratamiento con US (C, CL y CLC) y muestras sonicadas (CU, CLU y CLCU). Dichas diferencias fueron mayores una vez finalizado el periodo de tratamiento con US, presentándose durante todo el envejecimiento, valores de acidez volátil menores en las muestras tratadas con US que en las muestras control. A excepción de la muestra CLU, que tras 135 días de envejecimiento mostró valores en torno a 0,5 g/L, similares a los de las muestras control (C, CL y CLC). Los resultados obtenidos no son coincidentes con las observaciones de otros autores ya que **Singlenton y Draper, (1963)** tras sonicar vinos observaron un incremento de acidez volátil.

En lo relativo a la presencia de lías de levadura, no se apreciaron diferencias significativas entre los vinos C (sin lías) y los vinos CL envejecidos en presencia de lías liofilizadas. Este resultado no coincide con el obtenido por **González-Marco y Ancín-Azpilicueta, (2006)** que observaron un incremento de la acidez volátil comprendido entre 0,05-0,18 al envejecer vinos de la variedad Chardonnay en crianza sobre lías durante un periodo de 180 días. Sin embargo, estos aumentos de acidez volátil pueden no ser debidos a la presencia de lías, ya que en este ensayo se han obtenido incrementos similares en todas las muestras incluidos el vino control (C).

Figura 24. Acidez volátil (g/L) expresado como ácido acético durante el envejecimiento de vinos del ensayo 1. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.1.4 Evolución de parámetros de color durante el envejecimiento

La **Figura 25a** muestra la evolución de la intensidad colorante a lo largo de los 135 días de envejecimiento. Se puede apreciar una disminución progresiva de este parámetro para todas las muestras y todo el periodo de envejecimiento. En especial, para los vinos envejecidos en presencia de lías (CL) respecto de los vinos control (C). El tratamiento con US dio lugar a que las muestras mantuvieran mayor intensidad colorante durante los primeros 120 días de envejecimiento. Del mismo modo, la presencia de chips de roble no parece tener una influencia significativa sobre la intensidad colorante, puesto que las

muestras CLC y CLCU mostraron la misma tendencia. Una vez finalizado el periodo de envejecimiento, todos los vinos presentaron intensidades colorantes en torno a valores de 1,4-1,47 unidades de absorbancia. A excepción del vino control (C) con valores de este parámetro de $1,59 \pm 0,05$. Esta disminución tras el envejecimiento sobre lías de intensidad colorante coincide con los resultados obtenidos por otros autores, **Loira et al, (2013)** observaron la misma tendencia al envejecer vinos tintos durante 6 meses con lías de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. En cambio, **Fernández et al, (2011)** no apreciaron diferencias significativas en el parámetro intensidad colorante tras envejecer vinos con lías lisadas durante cuarenta días. Es posible que los resultados obtenidos sean distintos debido al método utilizado por el autor para lisar las células de levadura (acidificación y combinación de acidificación con β -glucanasas y pectinasas).

En lo relativo a la evolución de la tonalidad de los vinos estudiados (**Figura 25b**), todas las muestras mantuvieron valores de tonalidad constante y similares, en torno a 72, durante el periodo de sonicación de muestras. Solo se apreciaron valores significativamente superiores en este periodo sobre las muestras CU. Una vez finalizado el periodo de tratamiento con US, los vinos no sonicados (C, CL, CLC) mantuvieron tonalidades similares, mientras que las muestras sonicadas (CU, CLU y CLCU) aumentaron la tonalidad hasta valores significativamente superiores. La presencia de lías y la presencia de chips parecen no tener una influencia clara sobre la tonalidad, en este caso, los resultados concuerdan por los obtenidos por **Fernández et al, (2011)**, cuyos autores no apreciaron diferencias significativas en la absorbancia a 420 nm tras la CSL.

Figura 25. Evolución de la intensidad colorante (unidades de absorbancia) **(a)** y la tonalidad (adimensional) **(b)** a lo largo del envejecimiento del ensayo 1. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.1.5 Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) durante el envejecimiento

El índice de polifenoles totales proporciona, mediante la medida de la absorbancia de los vinos a 280 nm, una relación directa con el contenido fenólico de los vinos (Cetó *et al*, 2012). A este respecto, en la **Figura 26** se aprecia la evolución de IPT en los vinos estudiados durante los 135 días de envejecimiento que duró este ensayo. De forma general, los valores de IPT para todos los vinos se mantuvieron en valores medios que oscilaron entre 50 y 55.

Una vez finalizado el periodo de sonicación de muestras, se produjo un decrecimiento significativo de IPT en muestras CU a los 61 días de envejecimiento. Dichos valores, aumentaron hasta alcanzar las medidas del resto de vinos. Tras 135 días de envejecimiento no se apreciaron diferencias significativas entre los vinos estudiados. Lo que indica resultados discordantes con otros autores, que revelaron la capacidad de las lías de retener compuestos fenólicos (Barrio-Galán *et al*, 2011) posiblemente porque son necesarios envejecimientos más prologados para obtener datos significativos usando la medida directa de absorbancia a 280 nm.

Figura 26. Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) (adimensional) a lo largo del envejecimiento del ensayo 1. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.1.6 Contenido en proantocianidinas al finalizar el periodo de envejecimiento

Complementando el estudio del contenido polifenólico de los vinos de este ensayo, las fracciones polimérica, oligomérica y monomérica de proantocianidinas fueron medidas al finalizar el envejecimiento. Las proantocianidinas o taninos condensados se relacionan con diferentes percepciones de importancia para la calidad de vinos tintos. Las proantocianidinas de alto peso molecular se relacionan con la sensación de astringencia, mientras que la fracción oligomérica está relacionada con el amargor de los vinos (**Lea y Arnold, 1978**).

Considerando el contenido total de proantocianidinas presentes en los vinos envejecidos, las muestras CU dieron lugar a concentraciones significativamente superiores al vino control (C) (**Figura 27**). Sin embargo, este efecto de los US fue contrario cuando el vino se envejeció en presencia de lías. Ya que, el tratamiento resultó en una disminución significativa en el contenido en proantocianidinas totales, tanto en presencia como en ausencia de chips de roble.

La fracción polimérica ha sido la predominante en todos los vinos estudiados. Y por tanto, el tratamiento con US ha producido los mismos efectos que en contenido en proantocianidinas totales. Esto es, una disminución de la fracción polimérica de aproximadamente un 30 % en las muestras tanto de los vinos CLU como de los CLCU.

En relación a la fracción oligomérica, cabe destacar un incremento significativo de dicha fracción, en vinos tratados en presencia de lías y chips de roble al aplicar US (CLCU), respecto de su control CLC. Es posible que el tratamiento con US incremente la transferencia de compuestos de naturaleza similar desde la madera de roble.

La fracción monomérica ha sido la minoritaria, con valores comprendidos entre 2,75 y 6,5 mg/L. Donde los vinos control (C) presentaron valores significativamente inferiores al resto de muestras.

No se ha observado una tendencia clara relativa a una disminución del contenido en proantociandinas debido a la adsorción por parte de las lías de levadura. Los resultados de otros autores indican que la adsorción de proantocianidinas y otros compuestos fenólicos por parte de la levadura, es mucho menor cuando las células se encuentran

lisadas (Mekoue *et al*, 2015). En contraposición a los resultados obtenidos por estos autores, en el presente ensayo, las muestras sonicadas dieron lugar a menores contenidos en proantocianidinas totales, por lo que las muestras lisadas por el efecto del US absorbieron mayores cantidades de taninos condensados.

Figura 27. Fracción de proantocianidinas (mg/L) al finalizar el periodo de envejecimiento del ensayo 1. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Barras con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.1.7 Actividad tánica específica al finalizar el periodo de envejecimiento

La interacción entre las proteínas salivares y los polifenoles del vino da como resultado la generación de precipitados insolubles y por tanto la denominada sensación de astringencia (De Freitas y Mateus, 2001). La actividad tánica específica (ATE) tras 135 días de envejecimiento se muestra en la **Figura 28**. Dicho parámetro mide la capacidad de los taninos presentes en el vino para precipitar albúmina de suero bovino. No se apreció que el tratamiento con US tuviera efecto alguno sobre la ATE. Además, es interesante

destacar que la presencia de lías no disminuyó el fenómeno de astringencia en los vinos estudiados, ya que las muestras en CSL mostraron mayores valores de ATE que las muestras envejecidas sin lías (C y CU).

Figura 28. Actividad tánica específica (ATE) al finalizar el periodo de envejecimiento en el ensayo 1. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Barras con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.1.8 Evolución del contenido en antocianos y piranoantocianos durante el envejecimiento

En todos los vinos estudiados se observó un decrecimiento progresivo de antocianos totales a lo largo del periodo de envejecimiento (**Figura 29a**). Las diferencias entre muestras se incrementaron una vez finalizado el periodo de sonicación. Tras 135 días de envejecimiento las muestras sonicadas mostraron menores contenidos en antocianos totales en comparación con sus respectivos controles. Es posible que esta pérdida de pigmentos tenga su origen en el incremento en oxígeno disuelto producido durante el tratamiento con US (**Figura 23**). Además, los menores valores se localizaron en las

muestras CU, donde la ausencia de lías provoca que no exista un efecto protector antioxidante, que sí estuvo presente en el resto de muestras. No se encontraron diferencias significativas entre CLU y CLCU durante todo el ensayo. Sin embargo, la presencia de chips de roble, redujo el contenido en antocianos totales en vinos sin tratamiento con US (CLC respecto de CL). Hay que señalar que no se observó un efecto adsorbente de antocianos por parte de las lías de levadura, lo cual está en contraposición con los resultados obtenidos por otros autores (**Loira et al, 2013**).

La evolución de pigmentos estables en los vinos envejecidos se muestra en la **Figura 29b y 29c**. Los piranoantocianos vinilfenólicos son pigmentos altamente estables que se forman por condensación de antocianos procedentes de la uva, en su mayoría malvidin-3-*O*-glucósido, y los vinilfenoles (**Morata et al, 2007**). En una primera etapa, correspondiente con el periodo de tratamiento con US, apenas se identificaron diferencias significativas en los vinos estudiados. Transcurridos 90 días de envejecimiento, las diferencias en contenido de piranoantocianos vinilfenólicos se hicieron más notables, resultando en un incremento de concentración en las muestras que habían sufrido un tratamiento con US. Dicho incremento, coincide con las mayores concentraciones de oxígeno disuelto identificadas en el periodo de sonicación (**Figura 23**). Una vez transcurridos 135 días de envejecimiento, el contenido en piranoantocianos vinilfenólicos de las muestras sonicadas (CU, CLU y CLCU) se redujo hasta valores inferiores a los de sus respectivos controles (C, CL y CLC).

En relación a otros pigmentos de alta estabilidad, la evolución de vitisinas se expone en la **Figura 29c**. Estos pigmentos estables, se forman por condensación entre antocianos de uva y los metabolitos glicolíticos acetaldehído y ácido pirúvico (**Morata et al, 2007**). En este caso, al igual que en la evolución de piranoantocianos vinilfenólicos, hubo un incremento significativo de vitisinas en las muestras sonicadas a los 90 días de envejecimiento. En la finalización del ensayo, los valores de vitisinas en muestras sonicadas se redujeron por debajo de las concentraciones encontradas en sus respectivos controles. A excepción de las muestras CLC y CLCU que no mostraron diferencias significativas entre ellas.

Figura 29. Evolución del contenido en antocianos y piranoantocianos (mg/L) a lo largo del envejecimiento del ensayo 1. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.1.9 Contenido en antocianos y piranoantocianos al finalizar el periodo de envejecimiento

Complementado la información obtenida en la evolución de pigmentos que aporta la **Figura 29**, la **Tabla 3** expone los pigmentos identificados tras 135 días de envejecimiento, así como sus concentraciones. En este último análisis, se pudo apreciar que la aplicación de US se tradujo en una pérdida de pigmentos totales para todos los vinos tratados. Dicha pérdida fue de un 56% para los vinos CU, de un 49% para los vinos CLU y de un 47,8% para los vinos CLCU. La presencia de chips de roble no tuvo influencia alguna sobre el contenido en pigmentos totales. Sin embargo, la presencia de lías de levadura dio como resultado un mayor mantenimiento de pigmentos totales respecto del vino control (C).

La fracción de antocianos monoméricos es la más abundante, y por tanto, ha sufrido el mismo decrecimiento que el contenido en pigmentos totales al aplicar el US. Respecto a los pigmentos resultantes de la acilación de la glucosa por los ácidos acético y cumárico, todos los vinos tratados con US también redujeron la concentración en antocianos acetílicos y cumarílicos.

En relación a los pigmentos estables vitisina A y vitisina B, la suma de ambos decreció significativamente en vinos tratados con US, especialmente cuando dichos vinos son envejecidos en presencia de lías y chips de roble (CLCU). Las concentraciones encontradas de piranoantocianos vinilfenólicos fueron muy bajas, con contenidos entre 0,7 y 0,9 mg/L. Por esta razón, no se pudo apreciar la influencia del US sobre estos pigmentos.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para 16 antocianos y piranoantocianos (**Figura 30**). La distribución se explicó para las dos primeras componentes. Los antocianos monoméricos y piranoantocianos vinilfenólicos contribuyeron positivamente a la componente principal 1 (CP1), mientras que vitisina B contribuyó negativamente a dicha componente. En relación a la componente principal 2 (CP2), indicar que se vio contribuida positivamente por los piranoantocianos vinilfenólicos, la vitisina B, D3GAc, C3G, M3GAc, D3GCm y vitisina A. Mientras que la D3G, Pn3G, M3G6pCmtrans, Pt3G, M3G6pCmcis, Pt3GAc y Pn3GAc contribuyeron negativamente a la CP2.

Tras el ACP, se identificaron tres clusters (**Figura 30**). En relación a la CP1, Los vinos criados sobre lías de levadura, con y sin la presencia de chips de roble (CL y CLC) son agrupados con mayores concentraciones en antocianos monoméricos y vinilfenólicos. Mientras que los vinos sonicados son explicados con la variable vitisina B. Respecto de la CP2, la distribución destaca los vinos control (C) influenciados por los pigmentos estables vitisina B y piranoantocianos vinilfenólicos.

Tabla 3. Pigmentos identificados tras 135 días de envejecimiento. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Valores con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

Pigmentos	Abreviación	Controles			Tratamiento con US		
		C	CL	CLC	CU	CLU	CLCU
Delfinidin-3- <i>O</i> -glucósido	D3G	19,7 $\pm$ 0,3 ^c	19,7 $\pm$ 0,2 ^c	19,1 $\pm$ 0,3 ^c	8,1 $\pm$ 0,5 ^a	10,0 $\pm$ 0,8 ^b	10,0 $\pm$ 0,2 ^b
Cianidin-3- <i>O</i> -glucósido	C3G	1,1 $\pm$ 0,0 ^e	0,9 $\pm$ 0,0 ^b	1,0 $\pm$ 0,0 ^d	0,4 $\pm$ 0,0 ^a	0,6 $\pm$ 0,1 ^b	0,6 $\pm$ 0,0 ^b
Petunidin-3- <i>O</i> -glucósido	Pt3G	16,9 $\pm$ 0,2 ^c	17,5 $\pm$ 0,4 ^d	17,1 $\pm$ 0,4 ^{cd}	6,9 $\pm$ 0,3 ^a	8,4 $\pm$ 0,6 ^b	8,3 $\pm$ 0,2 ^b
Peonidin-3- <i>O</i> -glucósido	Pn3G	4,8 $\pm$ 0,1 ^c	4,9 $\pm$ 0,2 ^c	4,6 $\pm$ 0,1 ^c	2,9 $\pm$ 0,1 ^b	2,4 $\pm$ 0,2 ^a	2,4 $\pm$ 0,1 ^a
Malvidin-3- <i>O</i> -glucósido	M3G	64,4 $\pm$ 0,9 ^c	68,9 $\pm$ 1,2 ^d	66,7 $\pm$ 1,3 ^{cd}	27,8 $\pm$ 1,1 ^a	34,8 $\pm$ 2,2 ^b	34,5 $\pm$ 0,8 ^b
Antocianos monoméricos		106,9 $\pm$ 1,4 ^c	111,9 $\pm$ 1,8 ^d	108,5 $\pm$ 2,0 ^{cd}	46,3 $\pm$ 1,9 ^a	56,2 $\pm$ 3,8 ^b	55,7 $\pm$ 1,2 ^b
Vitisina B	VitB	0,6 $\pm$ 0,0 ^{cd}	0,5 $\pm$ 0,0 ^b	0,4 $\pm$ 0,0 ^a	0,5 $\pm$ 0,0 ^c	0,6 $\pm$ 0,0 ^d	0,5 $\pm$ 0,0 ^b
Vitisina A	VitA	1,5 $\pm$ 0,0 ^c	1,6 $\pm$ 0,0 ^d	1,5 $\pm$ 0,1 ^c	1,2 $\pm$ 0,1 ^{ab}	1,2 $\pm$ 0,1 ^b	1,1 $\pm$ 0,1 ^a
Vitisinás		2,0 $\pm$ 0,1 ^c	2,1 $\pm$ 0,0 ^c	1,9 $\pm$ 0,1 ^b	1,7 $\pm$ 0,1 ^b	1,8 $\pm$ 0,1 ^b	1,5 $\pm$ 0,1 ^a
Delfinidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	D3GAc	1,3 $\pm$ 0,0 ^c	1,1 $\pm$ 0,0 ^b	1,2 $\pm$ 0,0 ^b	0,9 $\pm$ 0,1 ^a	0,9 $\pm$ 0,1 ^a	1,1 $\pm$ 0,1 ^b
Petunidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	Pt3GAc	0,6 $\pm$ 0,0 ^d	0,6 $\pm$ 0,0 ^e	0,6 $\pm$ 0,0 ^d	0,3 $\pm$ 0,0 ^a	0,4 $\pm$ 0,0 ^c	0,3 $\pm$ 0,0 ^b
Peonidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	Pn3GAc	1,2 $\pm$ 0,1 ^c	1,1 $\pm$ 0,1 ^c	1,3 $\pm$ 0,0 ^d	0,6 $\pm$ 0,1 ^a	0,7 $\pm$ 0,1 ^b	0,6 $\pm$ 0,1 ^a
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	M3GAc	2,3 $\pm$ 0,0 ^d	2,4 $\pm$ 0,1 ^d	2,0 $\pm$ 0,1 ^c	1,1 $\pm$ 0,1 ^a	1,3 $\pm$ 0,0 ^{ab}	1,3 $\pm$ 0,1 ^b
Acetilícos		5,4 $\pm$ 0,1 ^d	5,2 $\pm$ 0,1 ^{cd}	5,1 $\pm$ 0,2 ^c	2,9 $\pm$ 0,1 ^a	3,3 $\pm$ 0,1 ^b	3,3 $\pm$ 0,2 ^b
Delfinidin-3- <i>O</i> -(6-p-cumaroil)-glucósido	D3G6Cm	1,3 $\pm$ 0,1 ^d	1,4 $\pm$ 0,1 ^d	1,2 $\pm$ 0,1 ^c	0,5 $\pm$ 0,0 ^a	0,6 $\pm$ 0,1 ^b	0,5 $\pm$ 0,0 ^{ab}
Cianidin-3- <i>O</i> -(6-p-cumaroil)-glucósido	C3G6Cm	0,1 $\pm$ 0,0 ^c	0,2 $\pm$ 0,0 ^d	0,1 $\pm$ 0,0 ^c	0,1 $\pm$ 0,0 ^a	0,1 $\pm$ 0,0 ^b	0,1 $\pm$ 0,0 ^{ab}
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-p-cis-cumaroil)-glucósido	M3G6Cmcis	0,7 $\pm$ 0,0 ^c	0,8 $\pm$ 0,0 ^d	0,7 $\pm$ 0,0 ^{cd}	0,2 $\pm$ 0,0 ^a	0,3 $\pm$ 0,0 ^b	0,3 $\pm$ 0,0 ^b
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-p-trans-cumaroil)-glucósido	M3G6pCmtrans	4,5 $\pm$ 0,1 ^c	4,8 $\pm$ 0,2 ^d	4,4 $\pm$ 0,1 ^c	1,4 $\pm$ 0,1 ^a	1,8 $\pm$ 0,2 ^b	1,8 $\pm$ 0,1 ^b
Cumarílicos		6,7 $\pm$ 0,3 ^c	7,1 $\pm$ 0,2 ^d	6,5 $\pm$ 0,2 ^c	2,1 $\pm$ 0,1 ^a	2,8 $\pm$ 0,3 ^b	2,6 $\pm$ 0,1 ^b
Vinilfenólicos		0,9 $\pm$ 0,0 ^c	0,8 $\pm$ 0,0 ^b	0,8 $\pm$ 0,0 ^b	0,7 $\pm$ 0,0 ^a	0,8 $\pm$ 0,0 ^b	0,7 $\pm$ 0,0 ^a
Pigmentos totales		121,9 $\pm$ 1,8 ^c	127,1 $\pm$ 2,1 ^d	122,6 $\pm$ 2,5 ^{cd}	53,7 $\pm$ 2,1 ^a	64,9 $\pm$ 4,3 ^b	63,9 $\pm$ 1,4 ^b

Figura 30. Proyección de las dos primeras componentes del análisis de componentes principales (ACP) de los pigmentos tras 135 días de envejecimiento en ensayo 1.

3.1.10 Compuestos terpénicos identificados tras finalizar el envejecimiento.

Se identificaron dos compuestos terpénicos por GC-MS tras 135 días de envejecimiento. Las concentraciones detectadas de linalool y α -terpineol se muestran en la **Figura 31**. EL contenido en linalool se incrementó significativamente en los vinos sonicados (CU) respecto al control (C). Cuando el tratamiento con US fue aplicado en presencia de lías no se observó una influencia significativa sobre la concentración de linalool. Todos los vinos que han sufrido la CSL disminuyeron significativamente la concentración en linalool en comparación con los vinos envejecidos en ausencia de las mismas (C y CU). Dicha reducción de linalool tras la CSL, también ha sido observada por otros autores en la elaboración de vinos espumosos de las variedades Albariño, Verdejo, Godello, Garnacha, Garnacha Blanca y Prieto Picudo (**Pérez-Magariño *et al* 2015**).

Respecto a los contenidos de α -terpineol, los vinos tratados con US mostraron mayores concentraciones de este terpeno que los vinos no tratados. Sin embargo, dicho incremento no fue significativo cuando los vinos eran envejecidos sobre lías. Es interesante mencionar que estos resultados no son coincidentes con los obtenidos por otros autores. **Liberatore *et al*, (2010)** observaron incrementos en la concentración de compuestos terpénicos, incluyendo α -terpineol, en vinos de la variedad Chardonnay en CSL en comparación con vinos envejecidos en ausencia de lías en depósitos de acero inoxidable. Dichos autores justifican el incremento en compuestos terpénicos con la liberación de β -glucanasas durante la autólisis celular, enzimas capaces de romper el enlace glicosídico, liberando terpenos libres.

Figura 31. Linalool y α -terpineol en vinos envejecidos en el ensayo 1. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Barras con la misma letra y puntos con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.1.11 Evolución de compuestos volátiles procedentes de la fermentación durante el envejecimiento

El seguimiento de volátiles procedentes de la fermentación se realizó durante 120 días de envejecimiento. En la **Figura 32a** se expone la evolución del sumatorio de estos compuestos. En el primer periodo de 61 días, correspondiente con el tratamiento con US, los vinos CU mostraron menores concentraciones de volátiles totales respecto del vino control (C). Estas diferencias dejaron de apreciarse tras el periodo de US. Atendiendo a las muestras envejecidas en presencia de lías (CL, CLU, CLC y CLCU), se pudo apreciar mayores contenidos de volátiles totales de fermentación respecto de las muestras envejecidas en ausencia de lías (C, CU). Esto ocurrió prácticamente en todos los análisis realizados en el presente ensayo.

En cuanto a la incidencia del US sobre los volátiles totales, no se apreciaron diferencias significativas entre CL y CLU en los primeros 61 días de envejecimiento, ni tampoco entre CLC y CLCU durante este mismo periodo. Respecto del resto del envejecimiento, el contenido en volátiles totales fue mayor para vinos CLU con concentraciones de $3.276 \pm 5,6$ mg/L a los 90 días y de 3.107 ± 159 a los 105 días. En interesante destacar que tras un total de 120 días de envejecimiento, todos los vinos estudiados presentaron concentraciones similares de volátiles totales, sin diferencias significativas entre muestras.

La importancia sensorial de los ésteres de origen fermentativo ha implicado el seguimiento de la evolución de dichos compuestos en los vinos estudiados (**Figura 32b**). Los ésteres son la principal fuente de aromas frutales en los vinos (**Gürbüz *et al*, 2006**). Este tipo de compuestos están en su mayoría en concentraciones cercanas a su umbral de percepción, lo que implica que pequeños cambios de concentración podrían tener un importante efecto sensorial en los vinos (**Sumby *et al*, 2010**).

Atendiendo a la evolución de ésteres de los vinos control (C y CU), fue apreciable una pérdida de estos compuestos durante los primeros 46 días de envejecimiento. Una vez finalizado el periodo de aplicación de US, no se encontraron diferencias significativas entre C y CU, alcanzándose valores de $266,16 \pm 14,7$ y $272,41 \pm 29,9$ mg/L respectivamente. También es interesante que durante la mayor parte del periodo de seguimiento, todas las muestras en CSL, independientemente de si se envejecieron con chips de roble o fueron sonicadas, presentaron mayores concentraciones de ésteres fermentativos que los vinos en ausencia de lías (C, CU).

El efecto del tratamiento con US sobre vinos en CSL se apreció con dificultad, ya que las muestras CL y CLU alternaron concentraciones variables de ésteres a lo largo del ensayo. Finalmente, transcurridos 120 días de envejecimiento no se apreciaron diferencias significativas entre CL y CLU. Es posible que la aplicación de US aumente la liberación de ésteres por parte de las lías de levadura, pero que a su vez parte de estos compuestos se estén volatilizando debido al aumento de la temperatura que implica el fenómeno de cavitación. Cuando los vinos además de envejecer en presencia de lías, lo hacen en presencia de chips de roble (CLC y CLCU), la aplicación de US no parece tener un efecto apreciable sobre el contenido en ésteres de los vinos, ya que prácticamente durante la totalidad del envejecimiento no se apreciaron diferencias significativas entre muestras (**Figura 32b**).

La **Figura 32b** también muestra la evolución de la concentración en alcoholes superiores encontrada a lo largo del envejecimiento. En relación a los vinos control (C y CU), solo fueron observadas diferencias significativas en los 15 primeros días de envejecimiento. Por lo que el tratamiento con US no modificó la concentración de este tipo de compuestos. Del mismo modo, comparando los grupos de muestras anteriormente citados con los vinos envejecidos en presencia de lías (CL, CLU, CLC y CLCU), parece que los vinos en CSL mantuvieron mayores valores de alcoholes superiores en los primeros periodos de envejecimiento, pero en el resto del ensayo, las lías no aportaron mayores concentraciones de alcoholes superiores.

Por último, cabe destacar que la aplicación de US en vinos en CSL no dio lugar a diferencias significativas en la concentración de alcoholes superiores, tanto si los vinos se encontraban envejeciendo en presencia como en ausencia de chips de roble. Además, ninguno de los vinos analizados alcanzó una concentración excesiva de alcoholes superiores (inferior a 400 mg/L) la cual, podría provocar defectos aromáticos por la aparición de un fuerte aroma a disolvente (**Rapp y Versini, 1995; Francis y Newton, 2005**).

Figura 32. Evolución de volátiles de fermentación (mg/L) a través del envejecimiento en el ensayo 1. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.1.12 Compuestos volátiles procedentes de la fermentación al finalizar el periodo de envejecimiento

La **Tabla 4** complementa la información expuesta anteriormente, ya que desglosa los compuestos volátiles de origen fermentativo tras 120 días de envejecimiento.

De entre los compuestos directamente relacionados con la fermentación alcohólica, cabe destacar el acetaldehído. La aplicación de US dio lugar a una disminución significativa en la concentración de este compuesto en todos los casos. La mayor concentración obtenida fue de $63,30 \pm 1,0$ mg/L, la cual está por debajo del umbral de percepción del compuesto (100-125 mg/L de acuerdo con **Liu y Pilone, (2000)**).

El diacetilo se forma a partir de la acetoína y presenta un bajo umbral de percepción, 8 mg/L de acuerdo con **Styger et al, (2011)**, en este caso, la aplicación de US no disminuye su concentración, sino que se mantuvieron mayores contenidos de diacetilo en las muestras sonicadas. A excepción de las muestras CLC y CLCU que no mostraron diferencias significativas entre ellas, aunque con valores inferiores al umbral de percepción.

En cuanto a la acetoína, todos los vinos envejecidos en presencia de lías presentaron mayores concentraciones respecto de los vinos C y CU. La aplicación de US en las muestras en CSL supuso una disminución en torno al 29 % del contenido en acetoína en vinos envejecidos, tanto en presencia como en ausencia de chips de roble. En todos los casos, los niveles de acetoína se encontraron por debajo del umbral de percepción (150 mg/L de acuerdo con **Moreno-Arribas y Polo, 2009**).

También cabe destacar que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones encontradas de 2,3 butanodiol para todos los vinos estudiados.

En relación con los esteres identificados tras 120 días de envejecimiento, el acetato de etilo es el que mayores concentraciones presenta en vino, aunque sus concentraciones medias en vinos varían entre 5-63,5 mg/L (**Gómez-Miguez et al, 2007; Guth, 1997**), en los vinos estudiados se han identificado concentraciones en torno a 100 mg/L, lo que se encuentra en el límite para que dicho compuesto aporte aromas desagradables a disolvente y barniz (**Plata et al, 2003**). Puesto que estas concentraciones elevadas se encontraron en todos los vinos sin

diferencias significativas entre los mismos, es de suponer que los tratamientos aplicados no tuvieron influencia alguna sobre la concentración de este compuesto. También es importante destacar el papel del lactato de etilo, ya que dicho éster presenta una repercusión sensorial positiva con su agradable aroma afrutado y lácteo, la concentración de dicho compuesto en vinos varía entre 3,05 y 297,5 mg/L dependiendo de si el vino ha realizado la fermentación maloláctica (Aznar y Arroyo, 2007; Gomez-Miguez *et al*, 2007). Por lo que los valores obtenidos, entre 141,31 y 185,14 mg, indican que los vinos realizaron la fermentación maloláctica antes de la ejecución de este ensayo. El tratamiento con US no afectó a la concentración de lactato de etilo en los vinos. Las muestras CL y CLU presentaron las mayores concentraciones de este éster, sin embargo este incremento solo fue estadísticamente significativo en comparación con los vinos CLC.

Atendiendo a las concentraciones de alcoholes superiores encontradas en los vinos estudiados, el 2-metil-1-butanol ha sido el de mayor importancia cuantitativa. Todos los vinos presentaron concentraciones en torno a 190 mg/L, por lo que parece que este compuesto de origen fermentativo no se vio afectado en modo alguno por la aplicación de US o el proceso de CSL. No ocurrió lo mismo en relación al contenido en 3-metil-1-butanol o alcohol isoamílico, ya que las mayores concentraciones se encontraron en los vinos control (C) reduciéndose en valores de más de un 40% al aplicar US (CU). Además, esta concentración más elevada en el vino C también indicó que la CSL redujo la concentración de este alcohol. En los vinos en CSL la aplicación de US no redujo la concentración de alcohol isoamílico ya que no se identificaron diferencias significativas entre las muestras CL y CLU ni entre las muestras CLC y CLCU (Tabla 4). Por último, y debido a su repercusión positiva por su aroma a pétalos de rosa, se destaca el 2-feniletanol (Swiegers *et al*, 2005). El tratamiento con US solo dio lugar a la pérdida de este compuesto en los vinos CU respecto de los vinos C, dicha pérdida es de un 13%. Además, la presencia de lía no parece tener influencia sobre los valores encontrados de este alcohol superior.

Tabla 4. Volátiles de fermentación tras 120 días de envejecimiento (mg/L). Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Valores con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

Compuestos	Controles			Tratamiento con US		
	C	CL	CLC	CU	CLU	CLCU
Acetaldehído	61,11 $\pm$ 4,44 ^c	61,58 $\pm$ 5,63 ^c	63,30 $\pm$ 1,00 ^c	38,42 $\pm$ 3,66 ^a	43,12 $\pm$ 3,22 ^{ab}	48,06 $\pm$ 1,92 ^b
Metanol	106,95 $\pm$ 10,78 ^{ab}	101,75 $\pm$ 10,46 ^a	111,54 $\pm$ 1,53 ^{ab}	103,60 $\pm$ 7,77 ^a	109,40 $\pm$ 8,22 ^{ab}	120,14 $\pm$ 3,99 ^b
1-propanol	54,14 $\pm$ 3,41 ^a	55,52 $\pm$ 4,03 ^a	53,01 $\pm$ 1,91 ^a	57,10 $\pm$ 4,34 ^a	56,35 $\pm$ 3,56 ^a	57,41 $\pm$ 2,00 ^a
Diacetilo	2,65 $\pm$ 0,10 ^{ab}	2,33 $\pm$ 0,02 ^a	3,17 $\pm$ 0,32 ^c	2,77 $\pm$ 0,07 ^b	2,78 $\pm$ 0,32 ^b	3,42 $\pm$ 0,21 ^c
Acetato de etilo	100,09 $\pm$ 6,06 ^a	104,74 $\pm$ 6,27 ^a	98,78 $\pm$ 10,24 ^a	99,92 $\pm$ 11,08 ^a	96,84 $\pm$ 0,49 ^a	97,16 $\pm$ 5,98 ^a
Isobutanol	34,12 $\pm$ 2,57 ^a	34,95 $\pm$ 2,59 ^a	34,31 $\pm$ 1,06 ^a	35,09 $\pm$ 2,95 ^a	35,57 $\pm$ 2,07 ^a	35,71 $\pm$ 1,39 ^a
1-butanol	6,51 $\pm$ 0,30 ^a	6,52 $\pm$ 0,28 ^a	6,31 $\pm$ 0,26 ^a	6,51 $\pm$ 0,16 ^a	6,49 $\pm$ 0,28 ^a	6,20 $\pm$ 0,09 ^a
Acetoína	22,15 $\pm$ 3,78 ^a	67,31 $\pm$ 0,26 ^c	67,41 $\pm$ 6,71 ^c	16,27 $\pm$ 0,60 ^a	47,98 $\pm$ 1,06 ^b	47,42 $\pm$ 5,42 ^b
2-metil-1-butanol	191,39 $\pm$ 16,65 ^a	194,01 $\pm$ 16,89 ^a	186,94 $\pm$ 0,43 ^a	192,65 $\pm$ 17,90 ^a	192,23 $\pm$ 17,48 ^a	196,92 $\pm$ 8,96 ^a
3-metil-1-butanol	67,66 $\pm$ 7,90 ^d	42,00 $\pm$ 0,48 ^{ab}	45,45 $\pm$ 4,16 ^{bc}	38,04 $\pm$ 0,33 ^a	42,41 $\pm$ 1,74 ^{ab}	50,11 $\pm$ 1,97 ^c
Lactato de etilo	160,65 $\pm$ 10,01 ^{ab}	185,14 $\pm$ 20,49 ^b	141,31 $\pm$ 6,56 ^a	166,62 $\pm$ 19,13 ^{ab}	184,36 $\pm$ 19,59 ^b	157,80 $\pm$ 40,40 ^{ab}
2,3-butanodiol	2.122,65 $\pm$ 157,75 ^a	2.185,15 $\pm$ 144,73 ^a	2.130,11 $\pm$ 14,80 ^a	2.305,65 $\pm$ 175,98 ^a	2.267,58 $\pm$ 117,16 ^a	2.232,05 $\pm$ 124,27 ^a
Hexanol	4,82 $\pm$ 0,16 ^a	4,86 $\pm$ 0,13 ^a	4,85 $\pm$ 0,09 ^a	4,60 $\pm$ 0,08 ^a	4,76 $\pm$ 0,24 ^a	4,83 $\pm$ 0,15 ^a
2-feniletanol	55,92 $\pm$ 1,53 ^b	55,86 $\pm$ 1,19 ^b	53,15 $\pm$ 0,58 ^{ab}	48,53 $\pm$ 5,03 ^a	52,68 $\pm$ 2,29 ^{ab}	55,27 $\pm$ 3,59 ^b
Acetato de 2-feniletilo	5,43 $\pm$ 0,06 ^a	5,96 $\pm$ 0,13 ^c	5,64 $\pm$ 0,29 ^{ab}	5,87 $\pm$ 0,14 ^{bc}	5,90 $\pm$ 0,05 ^{bc}	5,96 $\pm$ 0,13 ^c
Alcoholes superiores	409,74 $\pm$ 31,95 ^a	388,86 $\pm$ 24,75 ^a	379,17 $\pm$ 1,28 ^a	377,93 $\pm$ 29,98 ^a	385,74 $\pm$ 21,33 ^a	401,62 $\pm$ 16,88 ^a
Ésteres	266,16 $\pm$ 14,70 ^{ab}	295,85 $\pm$ 25,85 ^b	245,72 $\pm$ 15,88 ^a	272,41 $\pm$ 29,90 ^{ab}	287,10 $\pm$ 19,36 ^{ab}	260,92 $\pm$ 46,41 ^{ab}
Volátiles totales	2.996,21 $\pm$ 215,85 ^a	3.107,69 $\pm$ 209,89 ^a	3.005,26 $\pm$ 34,90 ^a	3.121,65 $\pm$ 246,32 ^a	3.148,47 $\pm$ 167,75 ^a	3.118,45 $\pm$ 174,80 ^a

3.1.13 Volátiles procedentes de la madera de roble al finalizar el periodo de envejecimiento

Es importante señalar que el vino base para la realización de este ensayo fue envejecido en barricas de roble durante los tres meses previos a la realización de este ensayo. Esta es la razón por la cual se identificaron volátiles de madera de roble en vinos envejecidos en ausencia de chips. De forma general, se pudo apreciar que los vinos con chips de roble (CLC y CLCU), presentan las mayores cantidades de volátiles procedentes de roble en la mayoría de las familias estudiadas (**Figura 33**).

Se han analizado por GC-MS dos fenoles volátiles, se trata del eugenol y el guaiacol. El tratamiento con US no produjo un impacto significativo sobre el contenido en fenoles volátiles (**Figura 33a**). Los mayores valores de esta familia de compuestos fueron encontrados en vinos envejecidos sobre lías y chips de roble (CLC), en particular, se identificaron niveles de guaiacol en torno a 20 µg/L. Dichos niveles se encuentran por debajo del umbral de percepción de dicho compuesto (25 µg/L de acuerdo con **Marín *et al*, 2005**).

La familia de compuestos volátiles denominada “compuestos furánicos” procede de la degradación de carbohidratos y es la responsable de los denominados “aromas a tostado en vinos (**Guchu *et al*, 2006**). El furfural y el alcohol furfurílico han sido los compuestos furánicos identificados y analizados. El tratamiento con US causó una reducción en el contenido de compuestos furánicos (**Figura 33b**). Sin embargo, dicha reducción solo fue significativa cuando el vino fue envejecido en ausencia de lías de levadura (CU), es posible que la presencia de biomasa de levadura permitiese la retención de este tipo de compuestos.

En relación al contenido en lactonas al finalizar el periodo de envejecimiento (**Figura 33c**), el tratamiento con US no dio lugar a variaciones en la concentración de los isómeros cis y transwhisky-lactonas. Siendo los mayores contenidos, los obtenidos en los vinos envejecidos con chips de roble (CLC y CLCU) sin diferencias significativas entre ellos.

Los aldehídos fenólicos son compuestos formados a partir de la degradación de la lignina durante el proceso de tostado (**Guchu *et al*, 2006**). Algunos de dichos compuestos son reducidos durante el proceso de envejecimiento, dando lugar a sus respectivos alcoholes fenólicos asociados. En la **Figura 33d** se ha incluido el sumatorio de los compuestos

vainillina, vainillato de etilo, acetovainillona, alcohol vainílico y siringaldehído. La aplicación de US incrementó el contenido en aldehídos fenólicos en vinos envejecidos en presencia de lías. En especial, en las muestras CLCU. Hay que señalar el interés de este resultado, ya que algunos compuestos como la vainillina y sus derivados tienen una importante repercusión sensorial sobre los vinos. El aldehído fenólico encontrado en mayores concentraciones fue el siringaldehído, presentado valores en torno a 550 µg/L en vinos CLCU.

En cuanto al contenido en etilfenoles (**Figura 33e**), se pudo apreciar que el US no afectó a la concentración de estos compuestos, y solo hubo una reducción significativa respecto del vino control (C) en los vinos en CL.

Figura 33. Compuestos volátiles procedentes de la madera de roble al finalizar el envejecimiento en el ensayo I. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Barras con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.1.14 Análisis sensorial de los vinos envejecidos

La **Figura 34** representa gráficamente las puntuaciones de los jueces sobre diferentes parámetros sensoriales evaluados. De forma general, la calidad global fue mejor puntuada en vinos sin tratamiento con US. La razón posiblemente radica en que el tratamiento con US incrementó la oxidación de los vinos, dando lugar a la aparición de aromas extraños y el consecuente desequilibrio de los vinos.

En términos de los parámetros evaluados en fase visual, los catadores identificaron una reducción significativa de la intensidad colorante de las muestras CU, dicho resultado no fue encontrado en el análisis espectrofotométrico (**Figura 25**). En el caso del parámetro tonalidad, tanto el análisis espectrofotométrico como el sensorial identificó un incremento de la tonalidad en las muestras sonicadas.

La evaluación de parámetros aromáticos por el panel de jueces dio como resultado las mayores puntuaciones en “calidad aromática” para las muestras CLC. Parece que la combinación entre lías de levadura y chips de roble incrementó la complejidad aromática de estos vinos. Hay que señalar que en estas muestras los catadores identificaron mayores notas del carácter “madera” mientras que en vinos tratados con US (CLCU) dicho carácter fue más difícilmente identificable.

No se apreciaron diferencias significativas sobre el parámetro acidez en todos los vinos estudiados. El parámetro “cuerpo” fue mayor en muestras CLC y CLCU, sin diferencias significativas entre ellas, lo que implica, que es posible que los chips de roble intensifiquen la percepción de este atributo a pesar de que el contenido en polisacáridos fue mayor en las muestras sonicadas (**Figura 22**).

Figura 34. Análisis sensorial de los vinos envejecidos efectuado por panel entrenado de 9 jueces al finalizar el envejecimiento del ensayo 1. Medias en el mismo eje con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

3.2 Ensayo 2. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala laboratorio)

La **Tabla 5** muestra de forma resumida las condiciones experimentales del ensayo 2. Se especifican en detalle en el apartado 2.1.2 del Capítulo II: Material y Métodos.

Posteriormente (epígrafes 3.2.1 a 3.2.11) se describen los resultados monitorizados durante el periodo total de envejecimiento, así como los obtenidos al finalizar dicho periodo.

Tabla 5. *Diseño experimental del ensayo 2. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala laboratorio)*

Código de muestras	Tipo de muestra	Volumen	Dosis de chips de roble	Dosis de lía de levadura húmeda	Tratamiento de US	Tiempo de envejecimiento
C	Vino tinto	1 L	-	-	-	60 días a 14 °c
CL	Vino tinto	1 L	-	6,5 g/L	-	60 días a 14 °c
CLS	Vino tinto	1 L	-	6,5 g/L	20 minutos sobre lía húmeda	60 días a 14 °c
CC	Vino tinto	1 L	2,5 g/L	-	-	60 días a 14 °c
CCL	Vino tinto	1 L	2,5 g/L	6,5 g/L	-	60 días a 14 °c
CCLS	Vino tinto	1 L	2,5 g/L	6,5 g/L	20 minutos sobre lía húmeda	60 días a 14 °c
ML	Medio modelo 14%; pH=3,8	1 L	-	6,5 g/L	-	60 días a 14 °c
MLS	Medio modelo 14%; pH=3,8	1 L	-	6,5 g/L	20 minutos sobre lía húmeda	60 días a 14 °c

Figura 35. Procedimiento experimental del ensayo 2. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala laboratorio)

3.2.1 Efectos visibles del tratamiento con US sobre lías de levadura húmeda, liberación de polisacáridos durante el envejecimiento y tiempo de decantación en muestras de medio modelo

Diferentes observaciones en microscopía óptica permitieron definir el tiempo de aplicación de US sobre lías húmedas. Tras la obtención de lías húmedas limpias (véase epígrafe 2.2 del Capítulo II: Material y Métodos), cuya apariencia al microscopio óptico puede apreciarse en la **Figura 36a**, se realizó el tratamiento con US hasta la identificación de un gran número de células lisadas (**Figura 36b**). Efectos similares pueden ser observados en preparaciones al microscopio de lías de levadura envejecidas durante largos periodos de tiempo.

El efecto de lisis celular pareció ser el responsable de un aumento en la concentración de polisacáridos parietales cedidos al vino durante el envejecimiento. Tras 15 días de envejecimiento no se encontraron diferencias significativas entre muestras (**Figura 36c**), pero a partir de 30 días, las muestras envejecidas sobre lías húmedas sonicadas (MLS)

presentaron mayores concentraciones de polisacáridos que las muestras ML. Al finalizar el periodo de envejecimiento, la concentración de polisacáridos aumentó hasta 20 mg/L en MLS, lo que supone un incremento del 20 % respecto a ML. Es interesante realizar una comparación con los resultados obtenidos en el **ensayo 1**, donde se obtuvieron mayores incrementos de polisacáridos, en torno al 50 % (**Figura 22**) pero el medio modelo se trató durante mayores periodos de tiempo (170 min), en comparación con la lías húmedas de este ensayo que se trataron tan solo durante 20 minutos.

El US también tuvo un efecto sobre el tiempo de decantación de las lías (**Figura 36d**). La medida de la absorbancia a 480 nm fue el método elegido para apreciar el tiempo de decantación. Todas las muestras fueron agitadas simulando un proceso de “bâtonnage” antes de la realización de este análisis. Tras 30 minutos de reposo, las muestras con lías sonicadas (MLS) dieron lugar a valores significativamente menores de absorbancia. Y tras 20,8 horas, dichos valores resultaron en torno a cero. Este efecto indica la especial importancia del proceso de “bâtonnage” cuando se envejece sobre lías sonicadas. Además, este interesante efecto de clarificación espontánea podría facilitar las operaciones previas al embotellado en bodega.

Figura 36 (a) Lías sin tratamiento con US. (b) lías tras 20 minutos de tratamiento con US. (c) Polisacáridos (mg/L) liberados durante la CSL en medio modelo. (d) Tiempo de decantación por medición espectrofotométrica (unidades de absorbancia). Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.2.2 Evolución del contenido en oxígeno disuelto durante el envejecimiento

Los vinos control (C y CC) mostraron los mayores contenidos en oxígeno disuelto durante todo el ensayo (**Figura 37a**). En relación a las muestras en CSL, los medios sobre lías no sonicadas (CL y CLC) mostraron concentraciones en torno a 0 mg/L tras 15 días, estos bajos valores se incrementaron hasta 0,4 mg/L tras 30 días de envejecimiento. Estas cantidades se mantuvieron estables en las muestras CL pero incrementaron significativamente en CCL hasta valores de 1 mg/L, similares a los encontrados en vinos control (C y CC).

En las muestras de vino con lías sonicadas (CLS y CCLS), se apreciaron pequeñas cantidades de oxígeno durante todo el envejecimiento. Por lo que el tratamiento con US parece que intensificó el poder antioxidante de las lías. La presencia de chips de roble no tuvo influencia sobre el contenido en oxígeno disuelto.

Comparando los valores identificados en vinos con los identificados en medios modelo (**Figura 37a y Figura 37b**), se pudo apreciar, al igual que en el **ensayo 1 (Figura 23)**, menores cantidades de oxígeno disuelto en los vinos que en los medio modelo. Esto fue debido al poder antioxidante de los polifenoles del vino (**Brenna y Pagliarini, 2001**).

La **Figura 37b** muestra las concentraciones de oxígeno disuelto encontradas en los medios modelo. Las muestras ML contenían menores cantidades de oxígeno que las MLS tras 15 días de envejecimiento. Sin embargo, trascurridos 30 días, estos valores incrementaron hasta no apreciarse diferencias significativas entre muestras. Cabe destacar que al finalizar el ensayo, las muestras MLS contenían muy poca cantidad de oxígeno, con valores en torno a 0,3 mg/L. Parece ser que determinados compuestos antioxidantes procedentes de la pared celular se liberaron más rápidamente cuando las lías fueron sonicadas, en concreto esto puede ser debido a los grupos tiol de las proteínas desnaturalizadas (**Gallardo-Chacón *et al*, 2010**). Por último, destacar que este efecto antioxidante de las lías sonicadas no fue claramente identificado en los vinos estudiados, posiblemente debido al efecto matriz del mismo, en particular, a la interacción con otros compuestos antioxidantes del vino tinto.

Figura 37. Evolución de oxígeno disuelto (mg/L) durante el envejecimiento de vinos **(a)** y medios modelo **(b)** en ensayo 2. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.2.3 Evolución de la acidez volátil durante el envejecimiento

Durante los 60 días de envejecimiento no se encontraron diferencias significativas entre los vinos control (C y CC) y los vinos en CSL tradicional (CL y CCL). En relación al tratamiento con US, señalar que las muestras envejecidas sobre lías sonicadas (CLS) presentaron mayores valores de acidez volátil que CL tras 45 días de envejecimiento. Sin embargo, estos valores no fueron estadísticamente diferentes al transcurrir los 60 días de duración del ensayo. Una vez finalizado el periodo de envejecimiento, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos aplicados sobre las diferentes muestras. Estos resultados indican que la crianza sobre lía húmeda sonicada o su combinación con chips de roble no parece tener influencia sobre los contenidos en acidez volátil de los vinos estudiados. Estos resultados se encuentran en la línea de los obtenidos por otros autores, que no encontraron diferencias significativas en acidez volátil en vinos envejecidos con lías de levadura con y sin adición de β -glucanasa y en presencia y ausencia de chips de roble (Rodríguez-Bencomo *et al*, 2010).

Figura 38. Acidez volátil (g/L) expresado como ácido acético durante el envejecimiento de vinos del ensayo 2. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.2.4 Evolución de parámetros de color durante el envejecimiento

De los datos aportados por la **Figura 39a**, se pudo observar un incremento en la intensidad colorante durante los últimos 30 días para todas las muestras analizadas. Dicho incremento fue mayor para los vinos control (C y CC), en especial para las muestras CC al final del periodo de envejecimiento. Otros autores también apreciaron menor intensidad colorante en los vinos en CSL respecto de sus controles (**Palomero *et al*, 2009**). La sonicación de lías de levadura estuvo asociada con un decrecimiento de la intensidad colorante, mientras que la presencia de chips de roble no tuvo relación con este parámetro cromático.

La **Figura 39b** representa la evolución del parámetro tonalidad a través del periodo de envejecimiento. Transcurridos los 15 primeros días, los mayores valores de tonalidad se encontraron en los vinos control (C y CC). Mientras que las muestras envejecidas con lías y chips de roble (CCL y CCLS) mostraron valores intermedios y las muestras envejecidas únicamente sobre lías (CL y CLS) dieron lugar a los menores valores de tonalidad. Resultados similares se obtuvieron al finalizar el periodo de envejecimiento, por lo tanto, la sonicación de lías no estuvo relacionada con el parámetro tonalidad, a diferencia de la presencia de chips de roble, que dio lugar a un aumento de este parámetro en las muestras envejecidas sobre lías.

Figura 39. Evolución de la intensidad colorante (unidades de absorbancia) **(a)** y la tonalidad (adimensional) **(b)** a lo largo del envejecimiento de los vinos del ensayo 2. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.2.5 Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) durante el envejecimiento

Como puede apreciarse en la **Figura 40**, no se obtuvieron grandes diferencias en valores de IPT entre los vinos estudiados, durante la mayor parte del periodo de envejecimiento. Dichos valores, oscilaron entre 50 y 55 de IPT. Como excepción se puede señalar, que las mayores diferencias que se identificaron entre las distintas muestras, se obtuvieron tras 30 días de envejecimiento. Los valores más altos estuvieron próximos a 69 de IPT para las muestras CC, posiblemente debido a la cesión de compuestos fenólicos por parte de los chips de roble.

En relación a la finalización del ensayo, hay que destacar que solo se encontraron diferencias significativas entre los vinos control (C y CC) y las muestras envejecidas sobre lías (CL y CLS). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por **Mazauric y Salmon, (2005)** que observaron un decrecimiento en el IPT tras solo una semana de envejecimiento sobre lías. Probablemente estos resultados están relacionados con una adsorción de compuestos fenólicos por parte de las lías de levadura. En el caso de las muestras CCL y CCLS, este efecto de adsorción podría haberse visto compensado por la liberación de polifenoles por parte de los chips de roble.

Figura 40. Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) a lo largo del envejecimiento en el ensayo 2. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.2.6 Evolución del contenido en antocianos y piranoantocianos durante el envejecimiento

La **Figura 41a** muestra la evolución en el contenido en pigmentos totales a lo largo del envejecimiento de los vinos estudiados. De forma general, se pudo observar una reducción progresiva de pigmentos totales a través del periodo de envejecimiento. En concreto, en los vinos CL y CCL, se apreció un destacable efecto adsorbente de pigmentos por parte de las lías de levadura. Dicho efecto y su consecuente pérdida de color también ha sido observado por otros autores (**Loira *et al*, 2013**). Se destaca que las muestras CLS y CCLS conservaron significativamente más pigmentos en comparación las muestras envejecidas en presencia de lías sin tratamiento de sonicación. Posiblemente debido a que el efecto adsorbente anteriormente citado es mayor cuando la pared celular de la levadura se encuentra intacta. La presencia de chips de roble resultó en una pérdida de pigmentos cuando las lías fueron sonicadas.

La **Figura 41b** muestra la evolución de los pigmentos estables vitisinas. Una vez finalizado el periodo de envejecimiento, todas las muestras de vino incrementaron el contenido en vitisinas. Dicho incremento fue mayor en los vinos control (C y CC) y en las muestras CL. La sonicación de lías se tradujo en una pérdida de vitisinas en muestras envejecidas en presencia de chips de roble (CCLS) así como en muestras sin chips (CLS). Además se observó que la presencia de chips de roble (CC, CCL, CCLS) dio lugar a menores valores en el contenido en vitisinas en comparación con las muestras envejecidas en ausencia de los mismos (C, CL, CLS).

Respecto del contenido en piranoantocianos vinilfenólicos (**Figura 41b**), en general las muestras de vino solo variaron en pequeñas cantidades de estos compuestos a través del periodo de envejecimiento, con valores entre 0,2 y 0,3 mg/L. Sin embargo, tras 60 días, todas las muestras presentaron diferencias significativas entre ellas. Los vinos control (C y CC) mostraron los mayores contenidos en piranoantocianos vinilfenólicos. Cuando los vinos fueron envejecidos sobre lías sonicadas, hubo una pérdida de estos pigmentos estables en comparación con CL y CCL. Del mismo modo, la presencia de chips de roble pareció aumentar dicha pérdida.

Comparando los resultados obtenidos por los publicados por otros autores en investigación sobre CSL, destacar que **Palomero *et al*, (2009)** no observó cambios en el

contenido en antocianos totales ni en los pigmentos estables (vitisinas y piranoantocianos vinilfenólicos) tras envejecer durante 100 días vinos de la variedad Garnacha sobre lías de levaduras pertenecientes a los géneros *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes* y *Pichia*. Puede que los resultados no sean coincidentes debido a la diferente arquitectura molecular y composición química de la pared celular de las levaduras que utilizaron dichos autores en comparación con la *Saccharomyces* utilizada en este ensayo.

Figura 41. Evolución del contenido en antocianos y piranoantocianos a lo largo del envejecimiento en el ensayo 2. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.2.7 Contenido en antocianos y piranoantocianos al finalizar el periodo de envejecimiento

La **Tabla 6** muestra el desglose de los pigmentos identificados tras 60 días de envejecimiento. En dicha tabla, se destacan algunos aspectos ya identificados en el estudio de la evolución de pigmentos (**Figura 41**). Entre los cuales, el aspecto más destacable es la pérdida de antocianos totales cuando se envejece en presencia de lías (CL y CCL) respecto a los controles envejecidos en ausencia de lías (C y CC). Dicha pérdida, fue de un 12% en el caso de las muestras CL y de un 13% cuando los vinos además envejecieron en presencia de chips de roble (CCL). En el caso de las muestras envejecidas sobre muestras sonicadas la pérdida en pigmentos totales es mucho menor, de solo un 2,5% en muestras CLS y de un 5,6% en CCLS en comparación con los vinos control (C y CC).

La fracción de antocianos monoméricos fue la mayoritaria de las identificadas por lo que siguió el mismo comportamiento que la fracción en antocianos totales. Además las fracciones de antocianos acetílicos y cumarílicos también se perdieron con la CSL tradicional y se mantuvieron mayores concentraciones en CSL sonicadas.

En relación a los pigmentos estables vitisinas, se destaca que no existieron pérdidas significativas de estos pigmentos tras el envejecimiento tradicional en CSL (CL y CCL) respecto a los vinos control. Sin embargo, si se obtuvieron menores concentraciones de estos pigmentos estables tras envejecer vinos en presencia de lías sonicadas (CLS y CCLS) en comparación con sus respectivos controles en CSL (CL y CCL).

Los piranoantocianos vinilfenólicos se encontraron en concentraciones muy pequeñas, entre 0,19 y 0,28 mg/L. La crianza sobre lías CL y CCL supuso una pérdida significativa respecto a sus controles C y CC. En este caso, dicha pérdida se vio intensificada con el tratamiento con US (CLS y CCLS).

Se realizó un análisis de componentes principales para los 6 grupos de pigmentos identificados al finalizar el periodo de envejecimiento (**Figura 42**). La distribución se explica en la citada figura para las dos primeras componentes. La componente principal 1(CP1) se vio contribuida positivamente por el contenido en antocianos monoméricos, cumarílicos, acetílicos y los pigmentos estables vitisina A y los piranoantocianos

vinilfenólicos. Mientras que la vitisina B contribuyó negativamente a dicha componente. Los compuestos cumarílicos, acetílicos, y los pigmentos estables vitisinas y piranoantocianos vinilfenólicos contribuyeron positivamente a la componente principal 2 (CP2) mientras que los antocianos monoméricos contribuyeron negativamente a dicha componente.

El ACP permitió la diferenciación de tres clusters (**Figura 42**). En relación a la CP1, los vinos control con y sin adición de chips de roble (C y CC) son agrupados con mayores concentraciones de antocianos monoméricos, cumarílicos, acetilados y la vitisina A. La CP2 se explicó fundamentalmente por las variables vitisina B y piranoantocianos vinilfenólicos, agrupando los vinos envejecidos en CSL tradicional (CL y CCL) y siendo las muestras que a su vez presentaron las menores concentraciones de pigmentos totales. Por último, se destaca la agrupación de vinos en CSL sonicadas que presentaron menores contenidos en vitisina B pero también menores pérdidas en relación en el contenido total de pigmentos.

Tabla 6. Pigmentos identificados tras 60 días de envejecimiento en ensayo 2. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Valores con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

Pigmentos	Abreviación	Controles				Tratamiento con US sobre lía húmeda	
		C	CC	CL	CCL	CLS	CCLS
Delfinidin-3- <i>O</i> -glucósido	D3G	15,38 $\pm$ 0,95bc	15,98 $\pm$ 0,17c	13,53 $\pm$ 0,37a	13,18 $\pm$ 0,26a	15,60 $\pm$ 0,21c	14,76 $\pm$ 0,19b
Cianidin-3- <i>O</i> -glucósido	Cy3G	0,56 $\pm$ 0,03bc	0,58 $\pm$ 0,03c	0,40 $\pm$ 0,02a	0,40 $\pm$ 0,02a	0,55 $\pm$ 0,02bc	0,53 $\pm$ 0,02b
Petunidin-3- <i>O</i> -glucósido	Pt3G	15,55 $\pm$ 0,43c	15,80 $\pm$ 0,14c	13,92 $\pm$ 0,32a	13,76 $\pm$ 0,25a	15,52 $\pm$ 0,12c	14,95 $\pm$ 0,16b
Peonidin-3- <i>O</i> -glucósido	Pn3G	4,19 $\pm$ 0,09d	3,81 $\pm$ 0,04bc	3,18 $\pm$ 0,08a	3,12 $\pm$ 0,08a	3,87 $\pm$ 0,02c	3,69 $\pm$ 0,06b
Malvidin-3- <i>O</i> -glucósido	M3G	70,11 $\pm$ 1,20d	68,50 $\pm$ 0,43c	63,00 $\pm$ 1,06a	61,42 $\pm$ 1,23a	68,89 $\pm$ 0,32cd	65,78 $\pm$ 0,72b
Antocianos monoméricos		105,79 $\pm$ 2,52c	104,66 $\pm$ 0,80c	94,03 $\pm$ 1,82a	91,87 $\pm$ 1,80a	104,44 $\pm$ 0,52c	99,71 $\pm$ 1,11b
Vitisina B	VitB	0,42 $\pm$ 0,01b	0,38 $\pm$ 0,02a	0,55 $\pm$ 0,02d	0,46 $\pm$ 0,03c	0,40 $\pm$ 0,02ab	0,37 $\pm$ 0,01a
Vitisina A	VitA	1,49 $\pm$ 0,01c	1,47 $\pm$ 0,03c	1,35 $\pm$ 0,02a	1,36 $\pm$ 0,03ab	1,39 $\pm$ 0,01bc	1,36 $\pm$ 0,02ab
Vitisinas		1,90 $\pm$ 0,01d	1,85 $\pm$ 0,05c	1,90 $\pm$ 0,01d	1,82 $\pm$ 0,03bc	1,79 $\pm$ 0,02b	1,72 $\pm$ 0,02a
Delfinidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	D3GAc	0,62 $\pm$ 0,02c	0,62 $\pm$ 0,01c	0,61 $\pm$ 0,01c	0,57 $\pm$ 0,01ab	0,58 $\pm$ 0,01b	0,55 $\pm$ 0,01a
Cianidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	Cy3GAc	0,18 $\pm$ 0,02bc	0,17 $\pm$ 0,01bc	0,16 $\pm$ 0,01ab	0,13 $\pm$ 0,01a	0,19 $\pm$ 0,02c	0,16 $\pm$ 0,02ab
Petunidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	Pt3GAc	0,34 $\pm$ 0,01b	0,33 $\pm$ 0,01ab	0,36 $\pm$ 0,00c	0,33 $\pm$ 0,00ab	0,32 $\pm$ 0,02a	0,31 $\pm$ 0,01a
Peonidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	Pn3GAc	0,77 $\pm$ 0,02d	0,69 $\pm$ 0,07 c	0,60 $\pm$ 0,02a	0,63 $\pm$ 0,02abc	0,67 $\pm$ 0,02bc	0,61 $\pm$ 0,03ab
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	M3GAc	5,60 $\pm$ 0,08d	5,27 $\pm$ 0,03c	4,66 $\pm$ 0,12b	4,48 $\pm$ 0,14a	5,14 $\pm$ 0,05c	4,77 $\pm$ 0,06b
Acetíflicos		7,50 $\pm$ 0,11e	7,09 $\pm$ 0,06d	6,40 $\pm$ 0,12b	6,15 $\pm$ 0,13a	6,90 $\pm$ 0,06c	6,41 $\pm$ 0,10b
Peonidin-3- <i>O</i> -(6-p-cumaroil)-glucósido	Pn3GCm	0,64 $\pm$ 0,01e	0,61 $\pm$ 0,01d	0,53 $\pm$ 0,02b	0,49 $\pm$ 0,01a	0,57 $\pm$ 0,01c	0,53 $\pm$ 0,00b
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-p-cis-cumaroil)-glucósido	M3G6pCmcis	1,39 $\pm$ 0,03e	1,29 $\pm$ 0,01d	1,07 $\pm$ 0,03ab	1,02 $\pm$ 0,05a	1,19 $\pm$ 0,01c	1,09 $\pm$ 0,01b
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-p-trans-cumaroil)-glucósido	M3G6pCmtrans	7,78 $\pm$ 0,15e	7,33 $\pm$ 0,04d	6,25 $\pm$ 0,19ab	6,06 $\pm$ 0,25a	6,95 $\pm$ 0,09c	6,50 $\pm$ 0,08b
Cumaríflicos		9,81 $\pm$ 0,19e	9,23 $\pm$ 0,06d	7,85 $\pm$ 0,24ab	7,57 $\pm$ 0,31a	8,71 $\pm$ 0,11c	8,12 $\pm$ 0,10b
Vinilfenólicos		0,28 $\pm$ 0,01e	0,26 $\pm$ 0,00d	0,24 $\pm$ 0,01c	0,22 $\pm$ 0,00b	0,20 $\pm$ 0,01a	0,19 $\pm$ 0,00a
Pigmentos totales		125,01 $\pm$ 2,77c	122,83 $\pm$ 0,79c	110,17 $\pm$ 2,16a	107,41 $\pm$ 2,24a	121,83 $\pm$ 0,69c	115,97 $\pm$ 1,27b

Figura 42. Proyección de las dos primeras componentes del análisis de componentes principales (ACP) de los pigmentos tras 60 días de envejecimiento.

3.2.8 Evolución de compuestos volátiles procedentes de la fermentación durante el envejecimiento

De forma general, se pudo observar una reducción de volátiles totales de origen fermentativo a lo largo de los 60 días de envejecimiento del ensayo 2. Durante los primeros 30 días de envejecimiento, los vinos control (C y CC) mostraron contenidos significativamente mayores en volátiles de fermentación que las muestras CL y CCL (ver **Figura 43a**). Sin embargo, en los últimos días de envejecimiento no se encontraron diferencias significativas entre las muestras C y CL. Pero se apreció una reducción significativa en volátiles en las muestras CC, mientras que las CCL dieron lugar a las mayores concentraciones de estos compuestos al finalizar el envejecimiento ($2.123,06 \pm 6,07$ mg/L véase **Tabla 7**).

En relación al efecto de la adición de lías sonicadas sobre la evolución de volátiles totales, se apreció un comportamiento diferente cuando los vinos además de con lías de levadura envejecieron con chips de roble. Los vinos CLS mantuvieron mayores concentraciones de volátiles de fermentación que las CL en la mayor parte del envejecimiento, pero en los últimos días no se encontraron diferencias significativas entre estas muestras. En el caso de los vinos que también envejecieron con chips de roble, los CCLS presentaron mayores concentraciones en volátiles totales que CCL, al principio del envejecimiento. Sin embargo, durante los últimos treinta días, las muestras CCL dieron lugar a mayores contenidos de estos compuestos. Las diferentes variaciones de compuestos volátiles con los tratamientos con US pueden deberse a la pérdida por vaporización de parte de estos compuestos, como consecuencia del aumento de temperatura durante el tratamiento con US. Ya que otros autores sí han obtenido un aumento de la concentración de volátiles tras la CSL en autólisis inducida por preparados enzimáticos (**Masino et al, 2008**).

En relación a la evolución en el contenido de alcoholes superiores (**Figura 43b**), indicar que en general, se observó un aumento significativo en la concentración de estos compuestos para todas las muestras al final del ensayo. En este último análisis solo se encontraron diferencias significativas entre CCLS y CL respecto del resto de muestras. Estos resultados no son suficientes para concluir en la influencia de la CSL y el tratamiento con US sobre el perfil de alcoholes superiores. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por otros autores (**Kulkarni et al, 2015**) que tampoco

identificaron diferencias significativas en contenidos en alcoholes superiores tras asistir la crianza sobre lías con US.

La evolución de ésteres durante la crianza de los vinos estudiados se muestra en la **Figura 43b**. Comparando los vinos control en ausencia y presencia de chips (C y CC) con los vinos en CSL tradicional (CL y CCL), no se apreciaron diferencias significativas en la concentración de ésteres durante todo el periodo de envejecimiento, a excepción de las muestras CC y CCL tras 30 días de crianza. Respecto a esto, es interesante indicar que existen diferencias entre los resultados obtenidos por varios autores que investigaron la evolución de ésteres en vinos durante la CSL. **Mauricio *et al*, (1993)** revelaron que la concentración de ésteres en vinos disminuye cuando el tiempo de envejecimiento en presencia de lías de levadura aumenta. Posiblemente debido a la actividad de las esterasas, las cuales son liberadas por la levadura en los primeros días tras la fermentación alcohólica. Sin embargo, otros autores (**Bueno *et al*, 2006**) observaron un incremento significativo de la fracción de ésteres en vinos de la variedad Airén tras la CSL.

La influencia en la concentración de ésteres entre muestras en presencia de lías y muestras en presencia de lías sonicadas fue difícil de determinar. Se apreciaron mayores concentraciones de ésteres en muestras CLS en comparación con CL a los 30 días de crianza, pero no hubo diferencias significativas en el resto del envejecimiento. Cuando además, se envejeció el vino en presencia de chips, comparando los vinos CCL y los vinos CCLS, se observaron mayores concentraciones de ésteres tras 30 días de envejecimiento en las muestras CCLS. Pero al finalizar el envejecimiento, estas concentraciones disminuyeron, hasta valores significativamente inferiores a las existentes en los vinos CCL.

Figura 43. Evolución de volátiles de fermentación a través del envejecimiento (mg/L) en el ensayo 2. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.2.9 Compuestos volátiles procedentes de la fermentación al finalizar el periodo de envejecimiento

La **Tabla 7** muestra la concentración de compuestos volátiles de origen fermentativo identificados tras 60 días de envejecimiento.

En relación a los compuestos directamente relacionados con la fermentación alcohólica, hay que destacar las diferencias en concentraciones de acetaldehído. La crianza sobre lías tradicional, en presencia y ausencia de chips de roble (CL y CCL) supuso incrementos en la concentración de acetaldehído de 41 y 40 % respectivamente, en comparación con los vinos controles envejecidos en ausencia de lías de levadura húmeda (C y CC). Estos resultados no son coincidentes con los obtenidos por otros autores, **Hidaldo *et al*, (2004)** identificaron un reducción significativa en contenidos de acetaldehído, tras envejecer durante 9 meses sobre lías, vinos espumosos de la variedad Garnacha. Cuando el envejecimiento en este ensayo se produjo sobre lías sonicadas, se observó el mismo efecto. Sin diferencias significativas entre CL y CLS. Aunque la presencia de chips de roble sí pareció tener influencia en la concentración de acetaldehído en CSL sonicadas. Ya que las concentraciones identificadas de este compuesto fueron un 25% menores en las muestras CCLS en comparación con CCL.

Resultados diferentes se obtuvieron en relación a otros compuestos producto de la fermentación. No se apreciaron diferencias significativas en la concentración de diacetilo entre vino control (C) y las muestras CL. Cuando estos vinos, además, se envejecieron en presencia de chips de roble (CCL), se produjo una disminución de la concentración de este compuesto en comparación con las muestras CC. La adición de lías sonicadas, no tuvo influencia en la concentración de diacetilo, comparando CCL y CCLS, pero sí se apreció una disminución en ausencia de chips de roble (CL respecto de CLS). En el caso del estudio de los contenidos en acetoína, la presencia de lías dio lugar a un incremento significativo de la concentración de este compuesto, que además fue mayor cuando las lías estaban sonicadas (**Tabla 7**). En el caso de los valores observados de 2,3 butanodiol, se apreció un comportamiento similar, a excepción de las muestras CCLS con valores significativamente inferiores de este compuesto en comparación con CCL.

El 2-metil-1-butanol fue el alcohol superior identificado en mayores concentraciones. De forma general, los vinos control (C) son lo que presentaron mayores concentraciones de este compuesto. El envejecimiento sobre lías sonicadas supuso un aumento de la concentración de este alcohol del 7% en comparación con CL. Mientras que en muestras con chips de roble los vinos CCLS presentaron una disminución del 9,5% en comparación con CCL. El 2-feniletanol es un alcohol superior de repercusión sensorial positiva debido a su aroma a pétalos de rosa (**Swiegers *et al*, 2005**). La presencia de lías aumenta los contenidos de este compuesto tanto en presencia como ausencia de chips de roble, y a su vez, estos contenidos son mayores si las lías se encuentran sonicadas.

En relación a los ésteres identificados en el ensayo, el acetato de etilo es el de mayor importancia cuantitativa. Se produjo una reducción de este compuesto en envejecimiento sobre lías, sin diferencias significativas cuando dichas lías se encuentran sonicadas. En cuanto a las concentraciones observadas en lactato de etilo, no se observaron diferencias significativas entre muestras. A excepción de menores concentraciones en las muestras CCLS en comparación con CCL. Por lo que los tratamientos aplicados no parecen tener relación con variaciones en la concentración del éster. En comparación con los resultados obtenidos por otros autores, destacar que **Hidalgo *et al*, (2004)** observaron apreciables aumentos de lactato de etilo durante la CSL de vinos espumosos.

Se realizó un análisis de componentes principales (**Figura 44**) para los 15 volátiles de origen fermentativo identificados en el análisis final, realizado tras 60 días de envejecimiento. La distribución se explicó por las dos primeras componentes. Los compuestos 2,3 butanodiol, acetaldehído, acetoina y 2-feniletanol contribuyeron positivamente a la componente principal 1 (CP1). Se pudo identificar un clúster que incluye los vinos criados sobre lías en el valor positivo de la CP1 ya que la concentración de volátiles fue mayor en estas muestras. En los valores negativos de la CP1 se identificó un clúster que incluye los vinos control. Es interesante destacar que el estudio de estas dos componentes principales no pudo separar los vinos envejecidos sobre lías de los vinos envejecidos sobre lías sonicadas.

Tabla 7. Volátiles de fermentación tras 60 días de envejecimiento (mg/L) en el ensayo 2. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Valores con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

Compuestos	Controles				Tratamiento con US sobre lías húmedas	
	C	CC	CL	CCL	CLS	CCLS
Acetaldehído	21,69 $\pm$ 3,07a	22,43 $\pm$ 1,31a	35,81 $\pm$ 3,23c	39,00 $\pm$ 0,56c	39,51 $\pm$ 0,52c	30,82 $\pm$ 2,13b
Metanol	173,08 $\pm$ 10,93b	159,96 $\pm$ 6,48ab	145,00 $\pm$ 7,67a	166,14 $\pm$ 4,48b	157,86 $\pm$ 12,29ab	148,62 $\pm$ 8,36a
1-propanol	42,92 $\pm$ 2,03c	41,11 $\pm$ 2,24bc	35,88 $\pm$ 0,74a	40,80 $\pm$ 1,34bc	38,62 $\pm$ 0,35bc	37,78 $\pm$ 1,13ab
Diacetilo	3,56 $\pm$ 0,08b	4,14 $\pm$ 0,44c	3,69 $\pm$ 0,20b	2,26 $\pm$ 0,07a	2,48 $\pm$ 0,11a	2,22 $\pm$ 0,01a
Acetato de etilo	99,46 $\pm$ 0,48b	98,04 $\pm$ 1,19b	87,06 $\pm$ 3,75a	90,40 $\pm$ 1,91a	89,60 $\pm$ 3,34ab	85,45 $\pm$ 4,58a
2-butanol	2,89 $\pm$ 0,08b	2,86 $\pm$ 0,08b	0,00 $\pm$ 0,00a	0,00 $\pm$ 0,00a	0,00 $\pm$ 0,00a	0,00 $\pm$ 0,00a
Isobutanol	56,55 $\pm$ 1,39e	54,95 $\pm$ 0,28de	50,05 $\pm$ 2,93ab	53,30 $\pm$ 0,80cd	52,08 $\pm$ 1,97bc	48,78 $\pm$ 0,47a
1-butanol	4,23 $\pm$ 0,07a	4,35 $\pm$ 0,17a	4,35 $\pm$ 0,17a	4,27 $\pm$ 0,15a	4,14 $\pm$ 0,10a	4,24 $\pm$ 0,05a
Acetoína	10,78 $\pm$ 0,06a	11,54 $\pm$ 0,45a	21,20 $\pm$ 0,72b	25,02 $\pm$ 1,96c	34,13 $\pm$ 2,42e	29,10 $\pm$ 2,93d
2-metil-1-butanol	266,04 $\pm$ 5,33c	259,52 $\pm$ 0,04bc	232,92 $\pm$ 14,17a	249,25 $\pm$ 2,40b	250,24 $\pm$ 4,57b	225,57 $\pm$ 3,69a
3-metil-1-butanol	64,89 $\pm$ 2,07c	62,79 $\pm$ 0,18bc	53,45 $\pm$ 3,74a	60,84 $\pm$ 2,02bc	58,81 $\pm$ 3,61b	59,68 $\pm$ 2,76b
Lactato de etilo	128,64 $\pm$ 6,54b	128,42 $\pm$ 1,94b	131,27 $\pm$ 10,12b	137,36 $\pm$ 12,28b	138,64 $\pm$ 12,28b	106,28 $\pm$ 6,44a
2,3-butanodiol	974,28 $\pm$ 31,82ab	954,23 $\pm$ 13,04a	1.078,94 $\pm$ 56,32c	1.192,23 $\pm$ 17,59d	1.117,71 $\pm$ 114,04cd	1.060,05 $\pm$ 15,88bc
Acetato de isoamilo	2,98 $\pm$ 0,02cd	3,08 $\pm$ 0,07d	2,57 $\pm$ 0,01a	2,88 $\pm$ 0,10bc	2,81 $\pm$ 0,17b	2,76 $\pm$ 0,06b
Hexanol	5,70 $\pm$ 0,67d	5,09 $\pm$ 0,29cd	5,29 $\pm$ 0,19cd	0,00 $\pm$ 0,00a	4,13 $\pm$ 0,52b	4,91 $\pm$ 0,37c
2-feniletanol	45,49 $\pm$ 1,95a	45,83 $\pm$ 2,13a	54,66 $\pm$ 2,24bc	53,84 $\pm$ 2,88b	58,12 $\pm$ 3,17c	55,29 $\pm$ 0,03bc
Acetato de 2-feniletilo	6,17 $\pm$ 0,02a	5,86 $\pm$ 0,34b	5,32 $\pm$ 0,12a	5,47 $\pm$ 0,08a	5,51 $\pm$ 0,28a	5,33 $\pm$ 0,04a
Alcoholes superiores	483,02 $\pm$ 12,80b	471,40 $\pm$ 1,20b	431,31 $\pm$ 22,13a	462,30 $\pm$ 8,51b	462,02 $\pm$ 11,41b	431,35 $\pm$ 2,56a
Ésteres	237,24 $\pm$ 6,95b	235,40 $\pm$ 2,58b	226,22 $\pm$ 12,06b	236,11 $\pm$ 11,64b	236,56 $\pm$ 15,08b	199,81 $\pm$ 10,93a
Volátiles totales	1.909,34 $\pm$ 58,08a	1.864,20 $\pm$ 19,03a	1.947,47 $\pm$ 82,87ab	2.123,06 $\pm$ 6,07c	2.054,40 $\pm$ 141,64bc	1.906,89 $\pm$ 25,08a

Figura 44. Proyección de las dos primeras componentes del análisis de componentes principales (ACP) de los volátiles de fermentación tras 60 días de envejecimiento en el ensayo

3.2.10 Volátiles procedentes de la madera de roble al finalizar el periodo de envejecimiento

Los fenoles volátiles identificados tras 60 días de envejecimiento fueron el eugenol y el guaiacol, la suma de la concentración de ambos compuestos se expone en la **Figura 45**. De forma general, se apreció un incremento de estos compuestos cuando el vino se envejeció en presencia de chips de roble. La presencia de lías (CL) no varió la concentración de fenoles volátiles en comparación con los vinos control (C). Del mismo modo, el tratamiento con US no pareció afectar a la concentración de estos compuestos (CLS) en comparación con CL. Sin embargo, en muestras envejecidas con chips de roble, la CSL supuso una reducción significativa de en torno al 23% en fenoles volátiles, dicha reducción fue aún mayor cuando las lías estaban sonciadas. El guaicol fue el fenol volátil identificado en mayores concentraciones, en concreto en las muestras CC con valores medios de $26,06 \pm 2,93 \mu\text{g/L}$. Estos valores están por debajo del umbral de percepción de este compuesto ($75 \mu\text{g/L}$ de acuerdo con **Boidron et al, 1988**) y son similares a los obtenidos por otros autores tras envejecer vino tinto en barricas nuevas durante 6 meses (**Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2006**).

En relación a los compuestos furánicos, también se apreció un evidente incremento de estos compuestos cuando el vino se envejeció en presencia de chips de roble. La presencia de lías de levadura en CSL tradicional no tuvo influencia significativa sobre la concentración de estos compuestos tanto en presencia como en ausencia de chips, CL y CCL en comparación con sus controles C y CC. En cambio, la presencia de lías sonicadas dio lugar a una pérdida significativa de compuestos furánicos en comparación con los vinos en CSL tradicional. La fracción de compuestos furánicos identificada incluye los compuestos furfural, alcohol furfurílico y 5-metilfurfural. De los cuales el alcohol furfurílico fue el encontrado en mayores concentraciones, en concreto los mayores contenidos medios fueron de $1.105,86 \pm 28,18 \mu\text{g/L}$ en las muestras CCL. Estos valores se encuentran por debajo de su umbral de percepción ($4.500 \mu\text{g/L}$ de acuerdo con **Boidron et al, 1988**). En relación al contenido en furfural, decir que las mayores concentraciones identificadas, esta vez en muestras CC fueron de $19,90 \pm 2,10 \mu\text{g/L}$, concentraciones muy inferiores a los $326 \mu\text{g/L}$ obtenidos por **Bautista-Ortín et al, (2008)** tras 3 meses de envejecimiento, también con chips de roble de tostado medio.

Las muestras envejecidas con chips también presentaron mayores contenidos en lactonas, en concreto en las muestras CC con valores de $95,53 \pm 5,99 \mu\text{g/L}$ para la suma de los dos isómeros. En este caso, la presencia de lías supuso una pérdida en estos compuestos tanto en presencia como en ausencia de chips (CC y CCL). Sin embargo, dicha pérdida fue mucho menor cuando los vinos envejecieron sobre lías sonicadas (CLS y CCLS). Estos resultados indican una posible capacidad de adsorción por parte de las lías que se ve disminuida cuando las células se encuentran lisadas.

En la **Figura 45** se aprecia una gran cesión de aldehídos y alcoholes fenólicos por parte de los chips de roble, en las muestras envejecidas en presencia de los mismos. Esta fracción incluye la vainillina, el vainillato de etilo, la acetovainillona, el alcohol vainílico y el siringaldehído. Este último se encontró en altas concentraciones, pero por debajo de los 50 mg/L de su umbral de percepción de acuerdo con **Boidron *et al*, (1988)**. Esta gran cantidad identificada del compuesto puede deberse al tratamiento previo aplicado en tonelería sobre los chips utilizados. Ya que el siringaldehído procede de la degradación térmica de la lignina durante el tostado (**Cerdán *et al*, 2002**). Los vinos envejecidos con chips y lías (CCL y CCLS) mostraron valores de aldehídos fenólicos significativamente superiores a sus controles (CC). Puede que la presencia de lías incremente la extracción de estos compuestos, lo cual parece reducirse cuando la célula se encuentra lisada tras el tratamiento con US.

Se identificaron contenidos en 4-etilfenol, este compuesto tiene origen microbiano y es debido a la presencia de levadura del género *Brettanomyces/Dekkera* (**Chatonnet *et al*, 1992**). Todas las muestras en presencia de lías de levadura presentaron menores concentraciones que sus respectivos controles (C y CC). El tratamiento con US sobre las lías húmedas no tuvo un efecto significativo.

Figura 45. Compuestos volátiles procedentes de la madera de roble al finalizar el envejecimiento en el ensayo 2. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Barras con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.2.11 Análisis sensorial de los vinos envejecidos

Los vinos envejecidos con chips de roble y lías de levadura, obtuvieron las mayores puntuaciones sobre la calidad global (**Figura 46**). Posiblemente debido a la calidad aromática que aportó la combinación de ambos sistemas de envejecimiento. Del mismo modo, el vino control fue el peor puntuado por el panel de cata.

Respecto a los parámetros de la fase visual, el vino CL presentó puntuaciones significativamente menores en el parámetro intensidad colorante. Esta diferencia en el parámetro no fue identificada en el análisis espectrofotométrico (**Figura 39a**). Las muestras CC y CCLS dieron lugar a los mayores valores en el parámetro tonalidad.

En cuanto a los parámetros evaluados en la fase aromática, los vinos envejecidos con chips de roble obtuvieron las mayores puntuaciones en intensidad aromática. Además, también fueron los mejores puntuados en el parámetro calidad aromática. Los catadores valoraron positivamente la complejidad aportada por los volátiles de madera de roble por lo que además, el parámetro “madera” se identificó claramente. Es interesante destacar que no se identificaron aromas asociados con defectos como la oxidación o la reducción. Aunque tampoco fue perceptible el aroma a levadura.

Los vinos CC fueron identificados significativamente como más ácidos. Las muestras control (C y CC) obtuvieron altas puntuaciones en astringencia, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en IPT (**Figura 40**). El parámetro cuerpo fue puntuado con valores significativamente superiores en los vinos CCL y CCLS.

Figura 46. Análisis sensorial de los vinos envejecidos efectuado por panel entrenado de 9 jueces para el ensayo 2. Medias en el mismo eje con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

3.3 Ensayo 3. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala semi-industrial)

La **Tabla 8** muestra de forma resumida las condiciones experimentales del ensayo 3. Se especifican en detalle en el apartado 2.1.3 del Capítulo II: Material y Métodos.

Posteriormente (epígrafes 3.3.1 a 3.3.9) se describen los resultados monitorizados durante el periodo total de envejecimiento, así como los obtenidos al finalizar dicho periodo.

Tabla 8. Diseño experimental del ensayo 3. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala semi-industrial)

Código de muestras	Tipo de muestra	Volumen	Dosis de levadura húmeda sonicada	Tratamiento de US	Tiempo de envejecimiento
C	Vino tinto	120 L	-	-	354 días a 16 °c
CLS	Vino tinto	120 L	6 g /L	30 minutos sobre lía húmeda	354 días a 16 °c

CLS con adición de lías previamente sonicadas
(escala semi-industrial)

Ensayo 3

CTPL22 *Saccharomyces cerevisiae*

Sonicación de biomasa de levadura húmeda

400W; 24 kHz A=100%
30 min

Adición a vinos

Envejecimiento en CSL en sala de barricas
14°C durante 354 días

Monitorización

Antocianos y piranoantocianos
(HPLC-DAD)

Parámetros enológicos básicos

Volátiles de fermentación
(GC-FID)

Análisis
espectrofotométricos

Oxígeno disuelto

Intensidad
colorante

Tonalidad

IPT

Figura 47. Procedimiento experimental del ensayo 3. CSL con adición de lías previamente sonicadas (escala semi-industrial).

3.3.1 Efectos visibles del tratamiento con US sobre lías de levadura húmeda

Observaciones sucesivas mediante microscopía óptica y durante el tratamiento con US definieron el tiempo de aplicación de dicho tratamiento sobre un volumen de 2L de lías húmedas. Las lías húmedas limpias se obtuvieron mediante el uso de un fermentador (**Figura 11**) situado en Bodegas Comenge (véase epígrafe 2.2 del Capítulo II: Material y Métodos).

En este caso, la apreciación visual de un gran número de células lisadas se produjo tras 30 minutos de tratamiento con US (400 W; 24 kHz; 100% A) (véase **Figura 48**). Se destaca que el tiempo de tratamiento fue mayor que en el ensayo 2, debido al mayor volumen de muestra a sonicar, en este caso 2L de levadura húmeda.

Figura 48 (a) Lías sin tratamiento con US. (b) lías tras 30 minutos de tratamiento con US.

3.3.2 Evolución del contenido en oxígeno disuelto durante el envejecimiento

La **Figura 49** muestra la evolución del oxígeno disuelto de los vinos envejecidos en las barricas de acero inoxidable. De forma general, se observó para todos los vinos una reducción de oxígeno disuelto a lo largo de la realización de este ensayo. Tras 354 días, los vinos C redujeron su concentración en oxígeno en torno al 69%, mientras que los vinos CLS redujeron su concentración a valores en torno al 93%.

El primer día de envejecimiento se observaron las mayores concentraciones con valores medios de 3,24 mg/L en CLS y 2,83 mg/L en C, se trata de valores inferiores a 8 mg/L, considerado el valor de saturación del oxígeno en vino (**Singleton, 1987**). Posiblemente, estas mayores concentraciones se deban a la oxigenación derivada de los trasiegos durante el llenado de las barricas. Tras 211 días, se obtuvieron contenidos significativamente mayores en CLS que en C. Una posible explicación es que solo se realizó el “bâtonnage” en las muestras que envejecían en presencia de lías y dicho proceso conlleva una incorporación de oxígeno en la muestra.

A diferencia de lo ocurrido en el ensayo a escala laboratorio (**ensayo 2**), los resultados obtenidos no indican un evidente poder reductor de las lías. Una posible explicación es que el efecto reductor de las lías se viera compensado por la incorporación de oxígeno durante el “bâtonnage”.

Figura 49. Evolución de oxígeno disuelto (mg/L) durante el envejecimiento de vinos en el ensayo 3. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.3.3 Evolución de la acidez volátil durante el envejecimiento

En relación a los parámetros básicos medidos, cabe destacar la evolución del contenido en acidez volátil (**Figura 50**). Al igual que en los resultados obtenidos en el ensayo a escala laboratorio (**ensayo 2**), no se apreciaron diferencias significativas en el contenido en acidez volátil entre los vinos envejecidos en presencia de lías sonicadas (CLS) y los vinos control (C).

Durante todo el periodo de envejecimiento, todas las muestras mostraron bajos valores, entre 0,25-0,3 mg/L de acidez volátil expresado como ácido acético. Se tratan de valores similares a los obtenidos en un vino seco recién fermentado con levadura seleccionada (Zoecklein *et al*, 1995).

Figura 50. Acidez volátil (g/L) expresado como ácido acético durante el envejecimiento de vinos del ensayo 3. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.3.4 Evolución de parámetros de color durante el envejecimiento

A partir de los datos aportados por la **Figura 51a**, se pudo apreciar un incremento en la intensidad colorante a lo largo de 289 días de envejecimiento para todos los vinos estudiados, sin diferencias significativas entre ellos. Solo se apreció un decrecimiento de la intensidad colorante en las muestras CLS al final del periodo de envejecimiento. La disminución de la intensidad colorante tras periodos de contacto con las lías ya ha sido observada por otros autores (**Loira et al, 2013**). Dicho decrecimiento, por parte de las muestras envejecidas en presencia de lías fue más notable en el **ensayo 2** que en los mayores volúmenes de muestra del presente ensayo.

La **Figura 51b** muestra la evolución de la tonalidad a través de la ejecución del presente ensayo. De forma general, se observó un incremento de este parámetro en todos los vinos estudiados y durante todo el envejecimiento. Solo se apreciaron valores de tonalidad significativamente superiores en los vinos CLS durante los primeros 168 días. A partir de este momento, el incremento de tonalidad fue similar en todas las muestras, y aunque los valores presentes en vinos CLS fueron mayores, no existió una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los vinos control.

Figura 51. Evolución de la intensidad colorante (unidades de absorbancia) **(a)** y la tonalidad (adimensional) **(b)** a lo largo del envejecimiento en ensayo 3. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.3.5 Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) durante el envejecimiento

Los valores de evolución de IPT (**Figura 52**) se mantuvieron entre 53 y 58 durante todo el ensayo. Las ligeras variaciones entre tratamientos aplicados no fueron estadísticamente significativas.

Comparando estos resultados con los obtenidos en el **ensayo 2**, y por otros autores (**Mazauric y Salmon, 2005**), en el presente ensayo no se apreció un poder adsorbente de los compuestos fenólicos por parte de las lías de levaduras, o al menos dicho poder no fue identificable con la medida espectrofotométrica de la absorbancia a 280 nm.

Figura 52. Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) a lo largo del envejecimiento en el ensayo 3. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.3.6 Evolución del contenido en antocianos y piranoantocianos durante el envejecimiento

Atendiendo al contenido en pigmentos totales a lo largo de la ejecución de este ensayo, la **Figura 53a** muestra una pérdida significativa de antocianos totales en torno al 56% para todas las muestras al finalizar el envejecimiento. Solo se apreciaron diferencias significativas tras 211 días, con contenidos superiores en las muestras control. En el resto del envejecimiento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Por lo que no se apreció un efecto adsorbente de pigmentos por parte de las lías, en contraposición con los resultados obtenidos por otros autores (**Loira *et al*, 2013**). Existe una concordancia con los resultados obtenidos en el **ensayo 2**, ya que en dicho ensayo la pérdida de pigmentos cuando las lías se encuentran sonicadas es mucho menor que cuando las células se encuentran intactas.

En el periodo comprendido entre 43 y 289 días de envejecimiento, los pigmentos estables vitisinas (**Figura 53b**) fueron identificados en valores comprendidos entre 2,5 y 3 mg/L, sin diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (CLS y C). Se destaca que al final del envejecimiento las concentraciones en vitisinas encontradas en las muestras CLS se mantuvieron en torno a 2,6 mg/L, mientras que los vinos control redujeron el contenido a 1,5 mg/L tras 354 días de envejecimiento.

Atendiendo a los contenidos identificados de piranoantocianos vinifenólicos, en la **Figura 53b** se aprecia que durante todo el ensayo, se obtuvieron bajas concentraciones de estos pigmentos estables, dichas concentraciones variaron entre 0,15 y 0,26 mg/L y se mantuvieron estables durante todo el ensayo. No se encontraron diferencias significativas entre C y CLS en ninguno de los análisis realizados.

Figura 53. Evolución del contenido en antocianos totales (a) y piranoantocianos (b) a lo largo del envejecimiento en el ensayo 3. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.3.7 Contenido en antocianos y piranoantocianos al finalizar el periodo de envejecimiento

Las concentraciones de los pigmentos identificados tras 354 días de envejecimiento se aprecian en la **Tabla 9**. La fracción de antocianos monoméricos fue claramente la mayoritaria, por lo tanto, siguió la misma tendencia que el contenido en pigmentos totales, esto es sin diferencias significativas entre C y CLS. Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas en los vinos estudiados para las concentraciones de antocianos acetílicos, cumarílicos y pirantocianos vinilfenólicos. Sin embargo, se destaca que a pesar de que las concentraciones en vitisina A y vitisina B no mostraron diferencias significativas para los vinos C y CLS, el contenido en vitisinas totales sí fue mayor y significativo en vinos CLS, en torno a 1mg/L por encima de los vinos control.

Tabla 9. Pigmentos identificados tras 354 días de envejecimiento en el ensayo 3. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Valores con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

Pigmentos	Abreviación	C	CLS
Delfinidin-3- <i>O</i> -glucósido	D3G	11,62 $\pm$ 0,47a	10,80 $\pm$ 1,38a
Cianidin-3- <i>O</i> -glucósido	Cs3G	0,10 $\pm$ 0,01a	0,09 $\pm$ 0,01a
Petunidin-3- <i>O</i> -glucósido	Pt3G	12,43 $\pm$ 0,78a	11,87 $\pm$ 1,24a
Peonidin-3- <i>O</i> -glucósido	Pn3G	3,65 $\pm$ 0,89a	3,25 $\pm$ 0,49a
Malvidin-3- <i>O</i> -glucósido	M3G	50,31 $\pm$ 3,27a	49,54 $\pm$ 5,83a
Antocianos monoméricos		78,12 $\pm$ 5,09a	75,55 $\pm$ 8,92a
Vitisina B	VitB	0,44 $\pm$ 0,58a	1,11 $\pm$ 0,02a
Vitisina A	VitA	1,48 $\pm$ 0,14a	1,49 $\pm$ 0,04a
Vitisinas		1,59 $\pm$ 0,17a	2,60 $\pm$ 0,05b
Delfinidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	D3GAc	0,17 $\pm$ 0,01a	0,14 $\pm$ 0,03a
Petunidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	Pt3GAc	0,14 $\pm$ 0,02a	0,13 $\pm$ 0,01a
Peonidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	Pn3GAc	0,39 $\pm$ 0,00a	0,39 $\pm$ 0,03a
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-acetil)-glucósido	M3GAc	4,16 $\pm$ 0,31a	4,04 $\pm$ 0,44a
Acetílicos		4,86 $\pm$ 0,30a	4,70 $\pm$ 0,42a
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-p-ciscumaroil)-glucósido	M3G6pCmcis	0,47 $\pm$ 0,06a	0,41 $\pm$ 0,08a
Malvidin-3- <i>O</i> -(6-p-transcumaroil)-glucósido	M3G6pCmtrans	4,73 $\pm$ 0,50a	5,05 $\pm$ 0,07a
Cumarílicos		5,21 $\pm$ 0,56a	5,46 $\pm$ 0,10a
Vinilfenólicos		0,18 $\pm$ 0,01a	0,16 $\pm$ 0,02a
Pigmentos totales		89,96 $\pm$ 6,04a	88,47 $\pm$ 9,43a

3.3.8 Evolución de compuestos volátiles procedentes de la fermentación durante el envejecimiento

En la **Figura 54a** se expone la evolución de volátiles totales de fermentación durante los 354 días de envejecimiento del presente ensayo. Durante todo este periodo los contenidos en volátiles totales fermentativos se mantuvieron entre 1.400-1.800 mg/L, sin diferencias significativas entre los vinos estudiados. En este caso, no se apreció una cesión de este tipo de compuestos por parte de las lías, ni la pérdida generalizada de volátiles que se observó en el ensayo a escala semi-industrial.

Las concentraciones de ésteres se mantuvieron estables en valores entre 57 y 70 mg/L a lo largo de todo el ensayo y para todos los vinos (**Figura 54b**). Por tanto, no se apreció una cesión de este tipo de compuestos por parte de las lías de levadura, ni tampoco se produjo una disminución de ésteres a lo largo de la CSL como en los resultados obtenidos por otros autores (**Mauricio *et al*, 1993**).

La concentración en alcoholes superiores siguió la misma tendencia que el contenido en volátiles totales de fermentación (**Figura 54b**). Las menores concentraciones se obtuvieron tras 60 días de envejecimiento, pero durante el resto del ensayo, los valores en todos los vinos se situaron entre 280 y 350 mg/L sin diferencias significativas entre ellos. Contenidos siempre inferiores a 400 mg/L, límite a partir del cual se considera que este tipo de compuestos suponen una repercusión sensorial negativa (**Rapp y Versini, 1995**).

Figura 54. Evolución de volátiles de fermentación a través del envejecimiento (mg/L) en el ensayo 3. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.3.9 Compuestos volátiles procedentes de la fermentación al finalizar el periodo de envejecimiento

Los compuestos volátiles de origen fermentativo identificados en la finalización del ensayo se muestran en la **Tabla 10**. Atendiendo a aquellos compuestos directamente relacionados con la fermentación alcohólica, la concentración de acetaldehído fue de $34,59 \pm 5,80$ mg/L en las muestras control y de $31,23 \pm 4,59$ mg/L en las muestras en crianza sobre lías sonicadas (CLS). Tampoco se identificaron diferencias significativas en los compuestos diacetilo, acetoína o 2,3 butanodiol.

La misma tendencia se observó en los alcoholes superiores, encontrándose en mayores concentraciones el 2-metil-1-butanol. El único éster donde se encontraron diferencias fue en el lactato de etilo, donde la crianza sobre lías sonicadas supuso una reducción en la concentración de este compuesto de un 21%. En relación a estos resultados se puede concluir que la presencia de lías no supuso una variación en la concentración de compuestos volátiles de origen fermentativo.

Tabla 10. Volátiles de fermentación al finalizar el periodo de envejecimiento (mg/L) en el ensayo 3. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Valores con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

Compuestos	C	CLS
Acetaldehído	34,59 $\pm$ 5,80a	31,23 $\pm$ 4,59a
Metanol	117,25 $\pm$ 4,45a	111,15 $\pm$ 1,38a
1-propanol	23,96 $\pm$ 0,81a	23,43 $\pm$ 0,54a
Diacetilo	8,79 $\pm$ 1,15a	10,33 $\pm$ 0,42a
Acetato de etilo	48,41 $\pm$ 5,75a	48,61 $\pm$ 1,60a
Isobutanol	27,24 $\pm$ 0,72a	27,06 $\pm$ 0,55a
Ácido acético	180,77 $\pm$ 15,45a	175,47 $\pm$ 13,19a
1-butanol	4,09 $\pm$ 0,05a	4,12 $\pm$ 0,07a
Acetoina	11,45 $\pm$ 1,20a	12,01 $\pm$ 0,60a
2-metil-1-butanol	167,60 $\pm$ 5,15a	162,66 $\pm$ 2,27a
3-metil-1-butanol	45,45 $\pm$ 4,81a	40,58 $\pm$ 0,77a
Lactato de etilo	141,93 $\pm$ 4,90b	111,94 $\pm$ 7,25a
2-3 butanodiol	684,96 $\pm$ 43,47a	682,89 $\pm$ 22,49a
Acetato de isoamilo	3,37 $\pm$ 0,25a	3,27 $\pm$ 0,33a
Hexanol	4,75 $\pm$ 0,12a	4,58 $\pm$ 0,20a
Alcohol 2-feniletílico	50,53 $\pm$ 3,12a	51,25 $\pm$ 1,07a
Acetato de 2-feniletilo	5,87 $\pm$ 0,13a	5,96 $\pm$ 0,01a
A. Superiores	287,54 $\pm$ 7,81a	277,93 $\pm$ 4,02a
Esteres	57,64 $\pm$ 6,06a	57,83 $\pm$ 1,77a
Volátiles totales	1.560,99 $\pm$ 57,80a	1.506,53 $\pm$ 34,53a

3.4 Ensayo 4. Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares

La **Tabla 11** muestra de forma resumida las condiciones experimentales del ensayo 4. Se especifican en detalle en el apartado 2.1.4 del Capítulo II: Material y Métodos.

Posteriormente (epígrafes 3.4.1 a 3.4.8) se describen los resultados monitorizados durante el periodo total de crianza en barrica, así como los volátiles de madera de roble al finalizar dicho periodo.

Tabla 11. Diseño experimental del ensayo 4. Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares

Código de muestras	Barrica	Origen	Tostado	Edad	Volumen	Tiempo de envejecimiento
STP	Surtep Top Premium	Roble francés	Medio	Nuevo uso	225 L	14°C durante 240 días
SP	Surtep Premium	Roble francés	Medio	Nuevo uso	225 L	14°C durante 240 días
SR	Sylvain Réserve	Roble francés	Medio	Nuevo uso	225 L	14°C durante 240 días
BC	Boutes Coeur	Roble francés	Medio plus	Nuevo uso	225 L	14°C durante 240 días
AF	Alain Fouquet St. Emilion Style	Roble francés	Medio bajo	Nuevo uso	225 L	14°C durante 240 días
TB	Treuil Tonnellerie de Brive	Roble francés	Medio bajo	Nuevo uso	225 L	14°C durante 240 días

Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares

Ensayo 4

Envejecimiento en barricas de roble francés
Denominación comercial: Tostado medio
14°C durante 240 días

Monitorización

Figura 55. Procedimiento experimental del ensayo 4. Comparación de vinos tintos envejecidos en barricas con denominaciones comerciales similares

3.4.1 Evolución de los parámetros de color e índice de polifenoles totales (IPT) durante el envejecimiento

A partir de los datos de la **Figura 56a**, pudimos observar un decrecimiento generalizado de la intensidad colorante a lo largo del envejecimiento en barrica de roble. Esto difiere de los resultados obtenidos por otros autores, **Del Alamo Sanza et al, (2004)** no observaron variación en la intensidad colorante, tras envejecer vinos tintos durante 5 meses en barricas de roble francés, roble americano y roble húngaro. Durante los primeros 180 días de envejecimiento, los vinos de las barricas STP y SP mostraron los mayores valores de intensidad colorante. Esto cambió a los 240 días, ya que estos vinos no mostraron diferencias significativas respecto de los envejecidos en los demás tipos de barricas. Estos resultados indican que no parece haber una relación entre el tipo de tostado aplicado en la tonelería y la intensidad colorante que adquiere el vino durante la crianza en barrica.

La tonalidad mide la importancia de la componente amarilla (absorbancia a 420 nm) sobre la componente roja (absorbancia a 520nm). Se apreció un ligero incremento de este parámetro tras los 240 días de crianza (**Figura 56b**). Este típico incremento de tonalidad

en vinos envejecidos es debido a un aumento de la absorbancia a 420 nm y una reducción de la absorbancia a 520 nm, siguiéndose esta tendencia durante el envejecimiento del vino. En el primer análisis efectuado, a los 60 días de crianza, se pudieron apreciar diferencias significativas en los vinos de las barricas BC, TB, STP en comparación con los vinos de SP. Esto cambió tras 240 días de crianza, ya que todos los vinos mostraron tonalidades entre 65 y 67 sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

En relación al IPT, se pudo apreciar un incremento progresivo de este valor a lo largo de la crianza. Esto es debido a la transferencia al vino de taninos por parte de la madera de roble. Se trata de taninos elágicos o taninos hidrolizables, los cuales son derivados de unidades de ácido gálico esterificadas a un núcleo de azúcar (**Saucier *et al*, 2006**). Una vez finalizada la crianza de los vinos, se encontraron diferencias significativas entre las barricas AF, TB, SR y las barricas STP. Por tanto, la denominación de “tipo de tostado” aportada por la tonelería no tuvo relación con el IPT.

Figura 56. Evolución de la intensidad colorante (unidades de absorbancia) **(a)**, de la tonalidad (adimensional) y el índice de polifenoles totales (IPT) **(b)** a lo largo del envejecimiento de los vinos del ensayo 4. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.4.2 Evolución del contenido en antocianos y piranoantocianos durante el envejecimiento

El color característico de los vinos tintos se debe a la presencia de antocianos y sus derivados. La **Figura 57a** muestra la evolución del contenido total de pigmentos a lo largo del envejecimiento. Incluyendo como fracción mayoritaria los antocianos monoméricos así como los antocianos acilados, procedentes de antocianos libres con ácido acético, *p*-cumárico y cafeico. En general, el contenido total de pigmentos disminuyó significativamente a lo largo de la crianza. Dicha disminución, fue detectada en todos los vinos estudiados. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores. **Sanza y Dominguez, (2006)** observaron un decrecimiento progresivo de antocianos a lo largo de 15 meses de envejecimiento en botella. Estas disminuciones son debidas a la reacción de los antocianos monoméricos extraídos del hollejo de uva con otros compuestos del vino como ácido pirúvico, vinilfenol, vinilcatecol y monómeros y trímeros de procianidinas (**Alcalde-Eon *et al*, 2006**). Es interesante destacar que los vinos envejecidos en las barricas BC (tostado medio plus) mostraron valores en antocianos totales significativamente superiores a los encontrados en el resto de vinos y durante toda la crianza de los mismos. En relación a los valores encontrados al finalizar el envejecimiento, los vinos envejecidos en AF y SR mostraron significativamente mayores contenidos que los vinos de STP. Este hecho indica que el tipo de tostado, aportado por la tonelería, no estuvo relacionado con el contenido total de pigmentos en los vinos envejecidos.

Las piranoantocianinas son pigmentos que solo están presentes en los vinos y no en el mosto de uva, ya que estos compuestos se forman por diferentes reacciones de condensación durante el proceso de vinificación. (**Morata *et al*, 2006**). Entre estos pigmentos caben destacar las vitisinas, la evolución de la concentración de estos pigmentos estables en los vinos envejecidos se muestran en la **Figura 57b**. Apreciándose que los niveles de vitisinas se mantuvieron estables entre 3-4 mg/L para todos los vinos y durante toda la crianza. Los vinos de las barricas BC presentaron los mayores contenidos en vitisinas durante los 240 días que duró la crianza. Además, estos vinos también presentaron las mayores concentraciones en antocianos totales (**Figura 57a**) y por tanto, las barricas BC mantuvieron las mayores cantidades de ambos pigmentos.

Los piranoantocianos vinilfenólicos son moléculas de gran estabilidad colorante. Se forman por la condensación entre vinilfenoles y los antonianos de la uva. La formación de vinilfenoles es debida a la acción enzimática de levaduras con actividad hidroxycinamato descarboxilasa.

La **Figura 57b** muestra el contenido en piranoantocianos vinilfenólicos a través de la crianza. Todos los vinos estudiados mostraron un progresivo decrecimiento de estos compuestos. En concreto los vinos envejecidos en las barricas AF y TB (tostado medio bajo) que dieron lugar a los menores contenidos en piranoantocianos vinilfenólicos durante los primeros 180 días de crianza, por lo que es posible que exista algún tipo de relación con el tipo de tostado aplicado en la tonelería. Sin embargo, al final del ensayo, no se encontraron diferencias significativas entre los vinos estudiados.

Figura 57. Evolución del contenido en antocianos totales **(a)** y piranoantocianos **(b)** a lo largo del envejecimiento en el ensayo 4. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

3.4.3 Evolución de fenoles volátiles

Se han identificado dos fenoles volátiles en los vinos estudiados. El guaicol y el eugenol, ambos compuestos se forman a partir de la degradación de la lignina durante el tostado de las barricas en tonelería (**Arapitsas *et al*, 2004**). El descriptor sensorial del guaicol es el aroma a ahumado (**Fernández de Simón *et al*, 2003**) mientras que el eugenol normalmente es descrito como un volátil de aroma especiado, a clavo y humo (**Arapitsas *et al*, 2004**).

En un primer periodo de la crianza, los 120 primeros días, se identificaron mayores concentraciones de fenoles volátiles en los vinos envejecidos en STP, BC y SP que en el resto de los vinos (**Figura 58**). Estos altos contenidos de en torno a 80 µg/L pudieron ser debidos al tostado de estas barricas, medio y medio plus (ver **Tabla 11**). Al finalizar el ensayo, los menores valores se identificaron en los vinos de las barricas AF y FB, que fueron tratadas en tonelería con un tostado medio y medio bajo respectivamente. En concreto, los vinos de TB mostraron valores medios de 7,7 µg /L, estos contenidos son inferiores al umbral de percepción del eugenol, 15 µg/L de acuerdo con **Arapitsas *et al*, (2004)**.

Los resultados en evolución de fenoles volátiles durante la crianza sugieren que la concentración de estos compuestos está directamente relacionada con la intensidad de tostado aplicado en tonelería. Y están en la línea de los resultados obtenidos por otros autores que envejecieron vinos en barricas de roble francés durante periodos similares de tiempo (**Fernández de Simón *et al*, 2003**).

Figura 58. Evolución del contenido en fenoles volátiles a lo largo del envejecimiento en el ensayo 4. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

¹(Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2006); ²(Arapitsas *et al*, 2004).

3.4.4 Evolución de compuestos furánicos

Los derivados furánicos encontrados en los vinos fueron el furfural, el 5-metilfurfural y el alcohol furfurílico. Estos compuestos se describen por su aroma a almendra, almendra tostada y heno húmedo respectivamente (Boidron *et al*, 1988). Estos volátiles, a excepción del alcohol furfurílico, se forman por la degradación de la hemicelulosa durante el tostado de las duelas (García *et al*, 2012). El alcohol furfurílico procede de la reducción del furfural (Boidron *et al*, 1988).

Los vinos envejecidos en las barricas BC mostraron los menores contenidos en compuestos furánicos durante toda la crianza, por debajo de 2.000 $\mu\text{g/L}$ (Figura 59).

Estos resultados, aparentemente podrían estar relacionados con el tipo de tostado aplicado en la tonelería, pero las barricas BC presentan la denominación “tostado medio plus” (Tabla 11). Tras 120 días de envejecimiento, se apreció un crecimiento generalizado de compuestos furánicos para todos los vinos, en especial para los envejecidos en las barricas STP, estos vinos también mostraron las mayores concentraciones durante todo el envejecimiento. Es interesante destacar que en todos los análisis efectuados el alcohol furfurílico fue el compuesto encontrado en mayores concentraciones. Los resultados obtenidos están en la línea de ensayos realizados por otros autores al envejecer vinos durante periodos muy similares de tiempo (Cerdán *et al*, 2002).

Figura 59. Evolución del contenido en compuestos furánicos a lo largo del envejecimiento en el ensayo 4. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

¹ (Díaz-Plaza *et al*, 2002).

3.4.5 Evolución del contenido en lactonas

La evolución de lactonas (**Figura 60**) incluye los isómeros cis y trans de whisky-lactona. De los cuales el isómero cis es el más potente aromáticamente, relacionándose con el aroma a coco (**Pollnitz *et al*, 1999**). Las mayores concentraciones identificadas de estos compuestos se produjeron a los 120 días, para todos los vinos estudiados. De los cuales, el vino envejecido en STP mostró los mayores niveles en lactonas, mientras que los vinos de SP los menores. Puesto que ambas barricas recibieron la misma denominación comercial en cuanto al tipo de tostado (**Tabla 11**). Se sugiere que el contenido en lactonas no presenta relación con la intensidad de tostado aplicado sobre las barricas sino con otros posibles factores, como por ejemplo el origen de la madera de roble.

Se destaca que el contenido en lactonas sobrepasó el umbral de percepción del isómero cis (92 µg /L) durante toda la crianza. Mientras que el umbral de percepción del isómero trans solo se superó a los 120 días de envejecimiento, momento de máxima extracción de lactonas. A excepción de los vinos envejecidos en SP cuya concentración máxima en todo el ensayo solo fue de 227 µg /L.

Figura 60. Evolución del contenido en lactonas a lo largo del envejecimiento en el ensayo 4. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

¹(Pérez-Prieto *et al*, 2002); ²(Chatonnet *et al*, 1990).

3.4.6 Evolución de aldehídos y alcoholes fenólicos

Las **Figura 61** muestra los aldehídos fenólicos vainillina y siringaldehído y sus derivados vainillato de etilo, acetovainillona y alcohol vainílico. La vainillina y el siringaldehído tienen su origen en la degradación de la lignina durante el tostado de las barricas de roble (Chatonnet *et al*, 1999). La vainillina se caracteriza por su aroma a vainilla y café, presentando un bajo umbral de percepción (320 µg /L de acuerdo con Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2006). Mientras que el siringaldehído no suele considerarse en el perfil aromático del vino, debido a su alto umbral de percepción (50 mg/L de acuerdo con López *et al*, 2004).

En general, se apreció un incremento progresivo de la concentración de estos compuestos a lo largo de la realización del ensayo. Las barricas BC liberaron menores cantidades de aldehídos fenólicos que el resto de barricas, lo cual indica que el denominación “tostado medio plus” no provocó mayores cesiones de estos compuestos en el vino. Los vinos envejecidos en STP y SR mostraron las mayores concentraciones de aldehídos fenólicos al finalizar el ensayo. En todos los análisis efectuados, el siringaldehído fue el compuesto identificado en mayores concentraciones, con valores por encima de 800 µg/L en los vinos de las barricas STP y SR.

Figura 61. Evolución del contenido en aldehídos y alcoholes fenólicos a lo largo del envejecimiento en el ensayo 4. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

¹(Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2006); ²(López *et al*, 2004).

3.4.7 Evolución del contenido en 4-etilfenol

Los etilfenoles son compuestos aromáticos de origen microbiano y repercusión sensorial negativa. Dichos compuestos son el 4-etilfenol y el 4-etilguaiaicol, ambos son producidos por *Brettanomyces*. De los cuales, en este ensayo solo se ha analizado la presencia de 4-etilfenol en los vinos estudiados. Este compuesto se relaciona con un desagradable aroma medicinal, a establo y el denominado “gusto a caballo” (**Pollnitz *et al*, 2000**).

La **Figura 62** muestra las concentraciones de 4-etilfenol obtenidas durante el envejecimiento de los vinos. Se pudo apreciar una clara diferencia en las concentraciones de este compuesto dependiendo de la barrica utilizada, con valores entre 10 y 400 µg/L. Los mayores valores se identificaron en los vinos STP, los cuales se situaron en torno a 108 µg /L al final del envejecimiento, muy por debajo del umbral de percepción de este compuesto (620 µg/L de acuerdo con **Chatonnet *et al*, (1992)**). Los vinos envejecidos en las barricas AF mostraron los menores valores de 4-etilfenol durante todo el ensayo.

En relación a resultados obtenidos por otros autores. **Díaz-Plaza *et al*, (2002)**; **Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, (2006)** identificaron mayores concentraciones en etilfenoles cuando usaron barricas de varios usos que cuando usaron barricas nuevas para el envejecimiento de los vinos. Puesto que para la realización de este ensayo, además de partir del mismo vino base, se eligieron solo barricas nuevas, podemos suponer que otros factores, propios de la barrica utilizada, determinan en gran medida la aparición de etilfenoles en vinos.

Figura 62. Evolución del contenido en etilfenoles a lo largo del envejecimiento en el ensayo 4. Medias $\pm$ desviación estándar para triplicados. Puntos situados en el mismo día con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

¹ (Chatonnet *et al*, 1992).

3.4.8 Compuestos volátiles de la madera de roble al finalizar el envejecimiento

Con el objetivo de obtener más información sobre la cesión de volátiles de la madera de roble al vino tinto se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para los resultados obtenidos al finalizar el envejecimiento (**Figura 63**). El ACP incluye los 5 grupos de compuestos de volátiles en los que también se siguió su evolución a lo largo de la crianza.

La distribución se explicó para las dos primeras componentes (CP1 y CP2). La CP1 se vio contribuida positivamente por el contenido en todos los volátiles del roble estudiados.

Mientras que la CP2 se vio contribuida positivamente por el contenido en fenoles volátiles y el 4-etilfenol y negativamente por el contenido en lactonas, aldehídos y alcoholes fenólicos y compuestos furánicos.

El ACP permitió diferencias cinco clúster. Las barricas STP y SR fueron agrupadas con los mayores contenidos en la totalidad de los compuestos volátiles. Ambas barricas tienen la denominación “tostado medio” y pertenecen a la misma tonelería. En la parte positiva de la CP1 se agruparon en un clúster los vinos de las barricas AF de tostado medio bajo con menores niveles en fenoles volátiles y 4-etilfenol. Del mismo modo, se agruparon los vinos de las barricas SP pero con mayores contenidos tanto en fenoles volátiles como en 4-etilfenol.

En los valores negativos de la CP1 se identificaron dos clúster. Las barricas BC (tostado medio plus) quedaron agrupadas en los valores positivos de CP2, mostrando altos contenidos en fenoles volátiles y 4-etilfenol pero menores contenidos en el resto de compuestos. Las barricas TB de tostado medio bajo se situaron en los valores negativos de ambas componentes por lo que además presentaron bajos contenidos en fenoles volátiles y 4-etilfenol.

Estos resultados indican que a pesar de que todas las barricas objeto de estudio tienen denominaciones comerciales similares (roble francés y tostado medio) dieron lugar a vinos tintos de crianza de perfil aromático diferente. De hecho, las dos únicas barricas que se pudieron agrupar en el mismo cluster fueron STP y SR, ambas pertenecientes a la tonelería Surtep. Es posible que el perfil de volátiles de madera dependa en mayor medida de otros factores que del tipo de tostado.

Figura 63. Proyección de las dos primeras componentes del análisis de componentes principales (ACP) de los volátiles procedentes de la madera de roble tras 240 días de envejecimiento en barrica del ensayo 4.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

4.1 Los ultrasonidos (US) aceleran los procesos de lisis celular de las levaduras y reducen significativamente la duración de la crianza sobre lías (CSL), tanto con lías de levadura liofilizada, como con lías frescas.

4.2 La aplicación de US en medio modelo con lías aproximadamente duplica el contenido de polisacáridos con respecto al control.

4.3 La sonicación directa del vino no afecta a la acidez volátil, intensidad colorante, IPT o contenido en proantocianidinas. Sin embargo, reduce los antocianos totales, piranoantocianos, compuestos furánicos y aumenta la tonalidad y los aldehídos fenólicos de la madera de roble. Además, el contenido de oxígeno disuelto y el análisis sensorial muestran que el tratamiento directo de US reduce la calidad del vino.

4.4 La adición de lías húmedas sonicadas produce vinos de alta calidad organoléptica en periodos cortos de tiempo y con parámetros químicos similares a los de CSL tradicional. Además, la lisis sucede con tratamientos de US breves (20-30 minutos).

4.5 La aplicación de US en lías frescas acelera la lisis, aumentando la cesión de polisacáridos en un 20%. Además, provoca un aumento de la capacidad antioxidante y de la velocidad de decantación. Tratamientos de 20 min con US son suficientes.

4.6 Los vinos envejecidos sobre lías frescas sonicadas en comparación con los de CSL tradicional, tienen menor intensidad colorante, pero mantienen una mayor concentración de pigmentos, excepto de vitisina B.

4.7 La combinación de lías sonicadas con chips de roble produce una menor extracción de fenoles volátiles, compuestos furánicos y aldehídos y alcoholes fenólicos, pero aumenta la cesión de lactonas.

4.8 El análisis sensorial de los vinos envejecidos con lías sonicadas y chips de roble muestra una gran calidad global, intensificada por la complejidad de los aromas de madera. Es un método de fácil aplicación industrial, que produce vinos de CSL de calidad en periodos de tiempo cortos.

4.9 Los vinos envejecidos sobre lías frescas sonicadas a escala semi-industrial mostraron que un aumento del volumen de la muestra y un cambio del material del depósito hace que los vinos obtenidos tengan pocas diferencias en su composición respecto del vino control. Solo se apreciaron ligeras diferencias en intensidad colorante, volátiles fermentativos, IPT y contenido en pigmentos. Estos vinos mantuvieron un mayor contenido en vitisinas. La actividad antioxidante de las lías se vio anulada por la oxigenación del “bâtonnage”.

4.10 El estudio comparativo de barricas de roble francés mostró que los vinos tintos obtenidos tras la crianza tenían similar intensidad colorante, tonalidad e IPT. Sin embargo, produjeron vinos de perfil aromático diferente, con gran variación en los volátiles de madera, independientemente del tostado aplicado. El enólogo deberá elegir la barrica a utilizar en CSL considerando los volátiles que la madera de roble aporta, para de esta forma, obtener vinos tintos de calidad diferenciada.

4. CONCLUSIONS

4.1 The ultrasound (US) accelerate the yeast cell lysis and it reduces significantly the ageing on lees (AOL) period.

4.2 The sonication of model media with lees duplicates approximately the polysaccharides content with respect to the control.

4.3 The sonication of wines does not affect the volatile acidity, colour intensity, TPI or the proanthocyanidins content. However, this method decreases the total anthocyanins, the pyranoanthocyanins content, the furanic compounds, and it increases the tonality and the phenolic aldehydes from the oak wood. In addition, the results of the dissolved oxygen content and the sensory analysis show that the US treatment decreases the wine quality.

4.4 The addition of sonicated wet lees results in high organoleptic quality wines in short periods of time and with similar chemical parameters with respect to the traditional AOL wines. In addition, the cell lysis is achieved in short treatments (20-30 minutes).

4.5 The application of US in wet lees accelerates the cell lysis and it increases 20 % the content of polysaccharides. In addition, it causes an increase in the antioxidant capacity as well as the decantation speed. 20 minutes of US treatment is enough.

4.6 The wines aged on sonicated wet lees have less colour intensity than the traditional AOL wines, but retain a higher concentration of pigments, with the exception of vitisin B.

4.7 The combination of sonicated lees with oak chips causes less extraction of volatile phenols, furanic compounds and aldehydes and phenolic alcohols. Nevertheless, it increases the amount of lactones.

4.8 The sensory analysis of wines aged with sonicated lees and oak chips show a great global quality intensified by the complexity of wood aromas. It has an easy implementation at semi-industrial level and can produce quality AOL red wines in short periods of time.

4.9 The wines aged on sonicated lees at semi-industrial scale showed that an increase in the volume of the sample and a change in the tank's material make the wines have few chemical differences with respect to the control wine. Only slight differences in colour intensity, fermentative volatile compounds, TPI, and pigments content were obtained. These wines kept more vitisins content. The antioxidant activity of the lees was overridden by the incorporation of oxygen during the “batonnage” process.

4.10 The comparative study of similar commercial brands of oak barrels showed that the wines obtained after ageing had similar colour intensity, tonality and TPI. However, the wines showed different aromatic profile, with a great variation of wood aromatic compounds regardless of the toasting applied. The winemaker must choose the barrel for AOL taking into account the volatiles compounds from the wood, in order to obtain differentiated quality red wines.

CAPÍTULO V: REFERENCIAS

1. Abalos, D., Vejarano, R., Morata, A., González, C., and Suárez-Lepe, J. A. (2011). The use of furfural as a metabolic inhibitor for reducing the alcohol content of model wines. *European Food Research and Technology*, 232(4), 663-669.
2. Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., and Mason, T. J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(3-4), 261-265.
3. Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., and Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: a comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 238-254.
4. Alexandre, H., and Guilloux-Benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine – a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 119-127.
5. Arapitsas, P., Antonopoulos, A., Stefanou, E., and Dourtoglou, V. G. (2004). Artificial aging of wines using oak chips. *Food Chemistry*, 86(4), 563-570.
6. Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., and Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410-427.
7. Aznar, M., and Arroyo, T. (2007). Analysis of wine volatile profile by purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry: Application to the analysis of red and white wines from different Spanish regions. *Journal of Chromatography A*, 1165(1-2), 151-157.
8. Babayan, T. L., and Bezrukov, M. G. (1985). Autolysis in yeasts. *Acta Biotechnologica*, 5(2), 129-136.
9. Balachandran, S., Kentish, S. E., Mawson, R., and Ashokkumar, M. (2006). Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(6), 471-479.
10. Bautista-Ortín, A. B., Lencina, A. G., Cano-López, M., Pardo-Mínguez, F., López-Roca, J. M., and Gómez-Plaza, E. (2008). The use of oak chips during the ageing of a red wine in stainless steel tanks or used barrels: effect of the contact time and size of the oak chips on aroma compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14(2), 63-70.
11. Benito, S., Morata, A., Palomero, F., González, M. C., and Suárez-Lepe, J. A. (2011). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. *Food Chemistry*, 124(1), 15-23.
12. Blouin, J., and Peynaud, E. (2004). *Enología práctica: conocimiento y elaboración del vino*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, Spain.
13. Boidron, J. N., Chatonnet, P., and Pons, M. (1988). Effects of wood on aroma compounds of wine. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 22(4), 275-294.
14. Boidron, J. N., Chatonnet, P., and Pons, M. (1988). Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *OENO One*, 22(4), 275-294.

15. Brenna, O. V., and Pagliarini, E. (2001). Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4841–4844.
16. Bueno, J. E., Peinado, R. A., Medina, M., and Moreno, J. (2006). Effect of a short contact time with lees on volatile composition of Airen and Macabeo wines. *Biotechnology Letters*, 28(13), 1007-1011.
17. Cabredo-Pinillos, S., Cedrón-Fernández, T., González-Briongos, M., Puente-Pascual, L., and Sáenz-Barrio, C. (2006). Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: Optimisation of the method. *Talanta*, 69(5), 1123–1129.
18. Cacciola, V., Batllò, I. F., Ferraretto, P., Vincenzi, S., and Celotti, E. (2013). Study of the ultrasound effects on yeast lees lysis in winemaking. *European Food Research and Technology*, 236(2), 311–317.
19. Câmara, J.S, Herbert, P., Marques, J.C., and Alves, M.A. (2004). Varietal flavour compounds of four grape varieties producing Madeira wines. *Analytica Chimica Acta*, 513, 203–207.
20. Cárcel, J. A., Benedito, J., Bon, J., and Mulet, A. (2007). High intensity ultrasound effects on meat brining. *Meat Science*, 76(4), 611–619.
21. Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., and Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100–104.
22. Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., and Barroso, C.G (2015). Ultrasound-assisted extraction of amino acids from grapes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 499-505.
23. Cebollero, E., Gonzalez-Ramos, D., and Gonzalez, R. (2009). Construction of a recombinant autolytic wine yeast strain overexpressing the *csc1-1* allele. *Biotechnology Progress*, 25(6), 1598-1604.
24. Cerdán, T. G., and Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Effect of oak barrel type on the volatile composition of wine: Storage time optimization. *LWT-Food Science and Technology*, 39(3), 199-205.
25. Cerdán, T. G., Goñi, D. T., and Azpilicueta, C. A. (2002). Changes in the concentration of volatile oak compounds and esters in red wine stored for 18 months in re-used French oak barrels. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8(2), 140-145.
26. Cerdán, T. G., Mozaz, S. R., and Azpilicueta, C. A. (2002). Volatile composition of aged wine in used barrels of French oak and of American oak. *Food Research International*, 35(7), 603-610.
27. Cetó, X., Gutiérrez, J. M., Gutiérrez, M., Céspedes, F., Capdevila, J., Mínguez, S., Jiménez-Jorquera, C., and del Valle, M. (2012). Determination of total polyphenol index in wines employing a voltammetric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, 732, 172-179.
28. Chang, A. C., and Chen, F. C. (2002). The application of 20 kHz ultrasonic waves to accelerate the aging of different wines. *Food Chemistry*, 79(4), 501–506.
29. Charpentier, C., and Freyssinet, M. (1989). The mechanism of yeast autolysis in wine. *Yeast*, 5, 181-186.

30. Charpentier, C., Aussenac, J., Charpentier, M., Prome, J. C., Duteurtre, B., and Feuillat, M. (2005). Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: kinetics and potential impact on flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3000-3007.
31. Chatonnet, P., Boidron, J. N., and Pons, M. (1990). Maturation of red wines in oak barrels: evolution of some volatile compounds and their aromatic impact. *Sciences des Aliments (France)*.
32. Chatonnet, P., Cutzach, I., Pons, M., and Dubourdieu, D. (1999). Monitoring toasting intensity of barrels by chromatographic analysis of volatile compounds from toasted oak wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4310-4318.
33. Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J. N., and Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(2), 165-178.
34. Chemat, F., and Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.
35. Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., and Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 298-305.
36. Cocito, C., Gaetano, G., and Delfini, C. (1995). Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasound. *Food Chemistry*, 52(3), 311-320.
37. Comuzzo, P., Calligaris, S., Iacumin, L., Ginaldi, F., Palacios Paz, A. E., and Zironi, R. (2015). Potential of high pressure homogenization to induce autolysis of wine yeasts. *Food Chemistry*, 185, 340-348.
38. Dallas, C., Ricardo-da-Silva, J. M., and Laureano, O. (1995). Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation. *Vitis*, 34(1), 51-56.
39. De Freitas, V., and Mateus, N. (2001). Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 940-945.
40. De Simón, B. F., Martínez, J., Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., and Muñoz, A. M. (2014). Volatile compounds and sensorial characterisation of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels. *Food Chemistry*, 147, 346-356.
41. Del Alamo Sanza, M., Escudero, J. F., and De Castro Torío, R. (2004). Changes in phenolic compounds and colour parameters of red wine aged with oak chips and in oak barrels. *Food Science and Technology International*, 10(4), 233-241.
42. Del Barrio-Galán, R., Pérez-Magariño, S., and Ortega-Heras, M. (2011). Techniques for improving or replacing ageing on lees of oak aged red wines: the effects on polysaccharides and the phenolic composition. *Food Chemistry*, 127(2), 528-540.
43. Demirdöven, A., and Baysal, T. (2008). The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. *Food Reviews International*, 25(1), 1-11.
44. Díaz-Plaza, E. M., Reyero, J. R., Pardo, F., Alonso, G. L., and Salinas, M. R. (2002). Influence of oak wood on the aromatic composition and quality of wines with different tannin contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2622-2626.

45. Diaz-Plaza, E. M., Reyero, J. R., Pardo, F., and Salinas, M. R. (2002). Comparison of wine aromas with different tannic content aged in French oak barrels. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 139-145.
46. Fernández de Simón, B., Cadahía, E., and Jalocho, J. (2003). Volatile Compounds in a Spanish Red Wine Aged in Barrels Made of Spanish, French, and American Oak Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7671–7678.
47. Fernández, O., Martínez, O., Hernández, Z., Guadalupe, Z., and Ayestarán, B. (2011). Effect of the presence of lysated lees on polysaccharides, color and main phenolic compounds of red wine during barrel ageing. *Food Research International*, 44(1), 84-9.
48. Fornairon-Bonnefond, C., and Salmon, J. M. (2003). Impact of oxygen consumption by yeast lees on the autolysis phenomenon during simulation of wine aging on lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2584-2590.
49. Fornairon-Bonnefond, C., Camarasa, C., Moutounet, M., and Salmon, J. M. (2002). New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: a bibliographic review. *OENO One*, 36(2), 49-69
50. Francis, I. L., and Newton, J. L. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 114-126.
51. Gallardo-Chacón, J. J., Vichi, S., Urpí, P., López-Tamames, E., and Buxaderas, S. (2010). Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine sur lie aging. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1–2), 48–53.
52. Gallart, M., López-Tamames, E., Suberbiola, G., and Buxaderas, S. (2002). Influence of fatty acids on wine foaming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 7042-7045.
53. García Martín, J. F., and Sun, D.W. (2013). Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends in Food Science & Technology*, 33(1), 40–53.
54. Garcia, R., Soares, B., Dias, C. B., Freitas, A. M. C., and Cabrita, M. J. (2012). Phenolic and furanic compounds of Portuguese chestnut and French, American and Portuguese oak wood chips. *European Food Research and Technology*, 235(3), 457–467.
55. Garde-Cerdán, T., and Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends in Food Science & Technology*, 17(8), 438–447.
56. Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., and Jo, I. H. (2009). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988–4994.
57. Giovani, G., Rosi, I., and Bertuccioli, M. (2012). Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-*Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), 113-118.
58. Glories, Y. (1984a). La couleur des vins rouges I. Connaissance de la Vigne et du Vin, 18: 195–217.
59. Glories, Y. (1984b). La couleur des vins rouges II. Connaissance de la Vigne et du Vin, 18: 253–271

60. Gomez-Miguez, M. J., Cacho, J. F., Ferreira, V., Vicario, I. M., and Heredia, F. J. (2007). Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100(4), 1464-1473.
61. González-Marco, A., and Ancin-Azpilicueta, C. (2006). Influence of lees contact on evolution of amines in Chardonnay wine. *Journal of Food Science*, 71(9), C544-C548.
62. Gracin, L., Jambrak, A. R., Juretić, H., Dobrović, S., Barukčić, I., Grozdanović, M., and Smoljanić, G. (2016). Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Applied Acoustics*, 103, 143–147.
63. Guchu, E., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., González-Viñas, M. A., and Ibáñez, M. C. (2006). Volatile composition and sensory characteristics of Chardonnay wines treated with American and Hungarian oak chips. *Food Chemistry*, 99(2), 350-359.
64. Guilloux-Benatier, M., Pageault, O., Man, A., and Feuillat, M. (2000). Lysis of yeast cells by *Oenococcus oeni* enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 193–197.
65. Gürbüz, O., Rouseff, J. M., and Rouseff, R. L. (2006). Comparison of Aroma Volatiles in Commercial Merlot and Cabernet Sauvignon Wines Using Gas Chromatography–Olfactometry and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3990–3996.
66. Guth, H. (1997). Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3027–3032.
67. Hidalgo, P., Pueyo, E., Pozo-Bayón, M. A., Martínez-Rodríguez, A. J., Martín-Alvarez, P., and Polo, M. C. (2004). Sensory and analytical study of rosé sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6640-6645.
68. König, H., Unden, G., and Fröhlich, J. (2009). Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Segunda edición. Ed. Springer. Berlín. Alemania.
69. Kulkarni, P., Loira, I., Morata, A., Tesfaye, W., González, M. C., and Suárez-Lepe, J. A. (2015). Use of non-*Saccharomyces* yeast strains coupled with ultrasound treatment as a novel technique to accelerate ageing on lees of red wines and its repercussion in sensorial parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1255–1262.
70. Lamberti, N., Ardia, L., Albanese, D., and Di Matteo, M. (2009). An ultrasound technique for monitoring the alcoholic wine fermentation. *Ultrasonics*, 49(1), 94–97.
71. Lea, A. G. H., and Arnold, G. M. (1978). The phenolics of ciders: Bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(5), 478–483.
72. Liberatore, M. T., Pati, S., Del Nobile, M. A., and La Notte, E. (2010). Aroma quality improvement of Chardonnay white wine by fermentation and ageing in barrique on lees. *Food Research International*, 43(4), 996-1002.
73. Liu, L., Loira, I., Morata, A., Suárez-Lepe, J. A., González, M. C., and Rauhut, D. (2016). Shortening the ageing on lees process in wines by using ultrasound and microwave treatments both combined with stirring and abrasion techniques. *European Food Research and Technology*, 242(4), 559-569.

74. Liu, S.-Q., and Pilone, G. J. (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science & Technology*, 35(1), 49–61.
75. Lloret, A., Boido, E., Lorenzo, D., Medina, K., Carrau, E., Dellacassa, E., and Versini, G. (2002). Aroma variation in tannat wines: effect of malolactic fermentation on ethyl lactate level and its enantiomeric distribution. *Italian journal of food science*, 14(2).
76. Loira, I. (2014). Optimización de parámetros fermentativos de calidad en vinos tintos de zonas cálidas. Universidad Politécnica de Madrid. Tesis Doctoral.
77. Loira, I., Vejarano, R., Morata, A., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O., González, M. C., and Suárez-Lepe, J. A. (2013). Effect of *Saccharomyces* strains on the quality of red wines aged on lees. *Food Chemistry*, 139(1–4), 1044–1051.
78. López, R., Ezpeleta, E., Sánchez, I., Cacho, J. and Ferreira, V. (2004). Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry*, 88, 95–103.
79. Lubbers, S., Charpentier, C., Feuillat, M., and Voilley, A. (1994). Influence of yeast walls on the behavior of aroma compounds in a model wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(1), 29-33.
80. Marín, J., Zalacain, A., De Miguel, C., Alonso, G. L., and Salinas, M. R. (2005). Stir bar sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines. *Journal of Chromatography A*, 1098(1-2), 1-6.
81. Martínez, J. M., Cebrián, G., Álvarez, I., and Raso, J. (2016). Release of Mannoproteins during *Saccharomyces cerevisiae* Autolysis Induced by Pulsed Electric Field. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1435.
82. Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., and Pérez-Magariño, S. (2015). Role of major wine constituents in the foam properties of white and rosé sparkling wines. *Food Chemistry*, 174, 330–338.
83. Martinez-Rodriguez, A. J., Polo, M. C., and Carrascosa, A. V. (2001). Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 45-51.
84. Masino, F., Montevecchi, G., Arfelli, G., and Antonelli, A. (2008). Evaluation of the combined effects of enzymatic treatment and aging on lees on the aroma of wine from Bombino bianco Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9495-9501.
85. Mateo, J. J., and Jiménez, M. (2000). Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 557-567.
86. Mateus, N., and de Freitas, V. (2001). Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during port wine aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5217-5222.
87. Mauricio, J. C., Moreno, J. J., Valero, E. M., Zea, L., Medina, M., and Ortega, J. M. (1993). Ester formation and specific activities of in vitro alcohol acetyltransferase and esterase by

- Saccharomyces cerevisiae* during grape must fermentation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41(11), 2086-2091.
88. Mazauric, J. P., and Salmon, J. M. (2005). Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: I. Analysis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(14), 5647-5653.
89. Mazza, G., and Francis, F. J. (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35(4), 341-371.
90. Mekoue Nguela, J., Sieczkowski, N., Roi, S., and Vernhet, A. (2015). Sorption of Grape Proanthocyanidins and Wine Polyphenols by Yeasts, Inactivated Yeasts, and Yeast Cell Walls. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(2), 660-670.
91. Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., and Ricardo da Silva, J. M. (2003). Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(22), 6475-6481
92. Morata, A. (2004). Influencia de la maduración antociánica de la uva y de la biotecnología fermentativa en color, aroma y estructura de vinos tintos. Universidad Politécnica de Madrid. Tesis Doctoral.
93. Morata, A., Benito, S., Loira, I., Palomero, F., González, M. C., and Suárez-Lepe, J. A. (2012). Formation of pyranoanthocyanins by *Schizosaccharomyces pombe* during the fermentation of red must. International Journal of Food Microbiology, 159(1), 47-53.
94. Morata, A., Calderón, F., González, M. C., Colomo, B., and Suárez, J. A. (2005). Crianza sobre lías, chips y microoxigenación, utilización conjunta en el envejecimiento de vinos tintos. Ventajas del uso de levaduras seleccionadas. Enólogos, 34, 52-56.
95. Morata, A., Calderón, F., González, M. C., Gómez-Cordovés, M. C., and Suárez, J. A. (2007a). Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. Food Chemistry, 100(3), 1144-1152.
96. Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Calderón, F., and Suárez, J. A. (2006). Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. International Journal of Food Microbiology, 106(2), 123-129.
97. Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., and Suárez-Lepe, J. A. (2003). Adsorption of Anthocyanins by Yeast Cell Walls during the Fermentation of Red Wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4084-4088.
98. Morata, A., González, C., and Suárez-Lepe, J. A. (2007b). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. International Journal of Food Microbiology, 116(1), 144-152.
99. Morata, A., Loira, I., Vejarano, R., González, C., Callejo, M. J., and Suárez-Lepe, J. A. (2017). Emerging preservation technologies in grapes for winemaking. Trends in Food Science & Technology, 67, 36-43.

100. Moreno-Arribas, M. V., and Polo, M. C. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. Ed. Springer. New York. USA.
101. Moruno, E. G., Sanlorenzo, C., Boccaccino, B., and Di Stefano, R. (2005). Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(1), 73-76.
102. Nevares, I., and Del Alamo, M. (2008). Measurement of dissolved oxygen during red wines tank aging with chips and micro-oxygenation. *Analytica Chimica Acta*, 621(1), 68-78.
103. Nieto-Rojo, R., Ancín-Azpilicueta, C., and Garrido, J. J. (2014). Sorption of 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol on yeast cell walls, using a synthetic wine. *Food Chemistry*, 152, 399–406.
104. Palomero, F., Morata, A., Benito, S., Calderón, F., and Suárez-Lepe, J. A. (2009). New genera of yeasts for over-lees aging of red wine. *Food Chemistry*, 112(2), 432–441.
105. Palomero, F., Morata, A., Benito, S., González, M. C., and Suárez-Lepe, J. A. (2007). Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and on wine monomeric anthocyanin content. *Food Chemistry*, 105(2), 838-846.
106. Patist, A., and Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 147–154.
107. Pedersen, D. S., Capone, D. L., Skouroumounis, G. K., Pollnitz, A. P., and Sefton, M. A. (2003). Quantitative analysis of geraniol, nerol, linalool, and α -terpineol in wine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(4), 517–522.
108. Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A., and Mauricio, J. C. (2004a). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, 84(4), 585-590.
109. Peinado, R. A., Moreno, J., Medina, M., and Mauricio, J. C. (2004b). Changes in volatile compounds and aromatic series in sherry wine with high gluconic acid levels subjected to aging by submerged flor yeast cultures. *Biotechnology Letters*, 26(9), 757–762.
110. Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Bueno-Herrera, M., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., and Ayestarán, B. (2015). Grape variety, aging on lees and aging in bottle after disgorging influence on volatile composition and foamability of sparkling wines. *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 47-55.
111. Pérez-Prieto, L. J., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., Pardo Mínguez, F., and Gómez-Plaza, E. (2002). Maturing Wines in Oak Barrels. Effects of Origin, Volume, and Age of the Barrel on the Wine Volatile Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3272–3276.
112. Pérez-Serradilla, J. A., and De Castro, M. L. (2008). Role of lees in wine production: a review. *Food Chemistry*, 111(2), 447-456.
113. Peyrot des Gachons, C., and Kennedy, J. A. (2003). Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 5877-5881.

114. Piyasena, P., Mohareb, E., and McKellar, R. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207–216.
115. Plata, C., Millan, C., Mauricio, J. C., and Ortega, J. M. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*, 20(2), 217-224.
116. Pollnitz, A. P., Jones, G. P., and Sefton, M. A. (1999). Determination of oak lactones in barrel-aged wines and in oak extracts by stable isotope dilution analysis. *Journal of Chromatography A*, 857(1-2), 239-246.
117. Pollnitz, A. P., Pardon, K. H., and Sefton, M. A. (2000). Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine. *Journal of Chromatography A*, 874(1), 101-109.
118. Povey, M. J. W., and McClements, D. J. (1988). Ultrasonics in food engineering. Part I: Introduction and experimental methods. *Journal of Food Engineering*, 8(4), 217-245.
119. Pradelles, R., Alexandre, H., Ortiz-Julien, A., and Chassagne, D. (2008). Effects of Yeast Cell-Wall Characteristics on 4-Ethylphenol Sorption Capacity in Model Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11854–11861.
120. Rapp, A., and Versini, G. (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. In *Developments in Food Science*, 37, 1659-1694.
121. Ricardo-Da-Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J.-M., Moutounet, M., Cabanis, J.C., and Bourzeix, M. (1991). Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57(1), 111–125.
122. Rodríguez-Bencomo, J. J., Ortega-Heras, M., and Pérez-Magariño, S. (2010). Effect of alternative techniques to ageing on lees and use of non-toasted oak chips in alcoholic fermentation on the aromatic composition of red wine. *European Food Research and Technology*, 230(3), 485.
123. Sanza, M. D. A., and Domínguez, I. N. (2006). Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods: Anthocyanin composition. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 255-263.
124. Saucier, C., Jourdes, M., Glories, Y., and Quideau, S. (2006). Extraction, Detection, and Quantification of Flavano-Ellagitannins and Ethylvescalagin in a Bordeaux Red Wine Aged in Oak Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7349–7354.
125. Saucier, C., Little, D., and Glories, Y. (1997). First evidence of acetaldehyde-flavanol condensation products in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3), 370-373.
126. Singleton, V. L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 69-77.
127. Singleton, V. L., and Draper, D. E. (1963). Ultrasonic treatment with gas purging as a quick aging treatment for wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 14(1), 23-35.
128. Strauss, C. R., Wilson, B., Gooley, P. R., and Williams, P. J. (1986). Role of monoterpenes in grape and wine flavor. In *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)*.
129. Styger, G., Prior, B., and Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1145.

130. Suárez-Lepe, J. A., y Morata, A. (2015). Levaduras para vinificación en tinto. Ed. AMV Ediciones. Madrid. España.
131. Suárez-Lepe, J.A. and Morata, A. (2006). New method for over lees aging in red wines. Spanish patent n_ P200602423.
132. Sumby, K. M., Grbin, P. R., and Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121(1), 1–16.
133. Sun, B., Leandro, C., Ricardo da Silva, J. M., y Spranger, I. (1998). Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1390-1396.
134. Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., and Pretorius, I. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139-173.
135. Tan, S., Li, L., Xiao, Z., Wu, Y., and Zhang, Z. (2005). Pervaporation of alcoholic beverages—the coupling effects between ethanol and aroma compounds. *Journal of Membrane Science*, 264(1–2), 129–136.
136. Tao, Y. S., and Li, H. (2009). Active volatiles of cabernet sauvignon wine from Changli County. *Health*, 1(03), 176.
137. Tao, Y., García, J. F., and Sun, D.W. (2014). Advances in Wine Aging Technologies for Enhancing Wine Quality and Accelerating Wine Aging Process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(6), 817–835.
138. Todd, B. E., Fleet, G. H., and Henschke, P. A. (2000). Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(1), 65-72.
139. Torresi, S., Frangipane, M. T., Garzillo, A. M. V., Massantini, R., and Contini, M. (2014). Effects of a β -glucanase enzymatic preparation on yeast lysis during aging of traditional sparkling wines. *Food Research International*, 55, 83–92.
140. Towey, J. P., and Waterhouse, A. L. (1996). The extraction of volatile compounds from French and American oak barrels in Chardonnay during three successive vintages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(2), 163-172.
141. Villettaz, J. C., Amado, R., Neukom, H., Horisberger, M., and Horman, I. (1980). Comparative structural studies of the D-mannans from a rosé wine and *Saccharomyces uvarum*. *Carbohydrate Research*, 81, 341-344.
142. Wilkinson, K. L., Elsey, G. M., Prager, R. H., Tanaka, T., and Sefton, M. A. (2004). Precursors to oak lactone. Part 2: Synthesis, separation and cleavage of several β -D-glucopyranosides of 3-methyl-4-hydroxyoctanoic acid. *Tetrahedron*, 60(29), 6091-6100.
143. Wu, X., Joyce, E. M., and Mason, T. J. (2012). Evaluation of the mechanisms of the effect of ultrasound on *Microcystis aeruginosa* at different ultrasonic frequencies. *Water research*, 46(9), 2851-2858.

144. Yap, A., and Bagnall, W. (2009). High power ultrasonics: a new and powerful tool for removing tartrate deposits and killing viable *Brettanomyces* cells in barrels. *Wine Industry Journal*, 25, 29-39.
145. Yap, A., Jiranek, V., Grbin, P., Barnes, M., and Bates, D. (2007). Studies on the application of high-power ultrasonics for barrel and plank cleaning and disinfection. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 22(3), 96-104.
146. Zalacain, A., Marín, J., Alonso, G. L., and Salinas, M. R. (2007). Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta*, 71(4), 1610-1615.
147. Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., and Nury, F. S. (1995). Volatile acidity. In *Wine analysis and production*, 192-198. Ed Springer, Boston, USA.

ANEXO I: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Artículos en revistas SCI

1. Mylona, A. E., **Del Fresno, J. M.**, Palomero, F., Loira, I., Bañuelos, M. A., Morata, A., Calderón, F., Benito, S., and Suárez-Lepe, J. A. (2016). Use of *Schizosaccharomyces* strains for wine fermentation—effect on the wine composition and food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 63-72.
2. Bañuelos, M. A., Loira, I., Escott, C., **Del Fresno, J. M.**, Morata, A., Sanz, P. D., Otero, L., and Suárez-Lepe, J. A. (2016). Grape processing by high hydrostatic pressure: effect on use of non-*Saccharomyces* in must fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, 9(10), 1769-1778.
3. Chen, K., Escott, C., Loira, I., **Del Fresno, J. M.**, Morata, A., Tesfaye, W., Calderón, F., and Suárez-Lepe, J. A. (2016). The effects of pre-fermentative addition of oenological tannins on wine components and sensorial qualities of red wine. *Molecules*, 21(11), 1445.
4. **Del Fresno, J. M.**, Morata, A., Loira, I., Bañuelos, M. A., Escott, C., Benito, S., and Suárez-Lepe, J. A. (2017). Use of non-*Saccharomyces* in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality. *European Food Research and Technology*, 243(12), 2175-2185.
5. Escott, C., Vaquero, C., **Del Fresno, J. M.**, Bañuelos, M. A., Loira, I., Han, S. Y., Bi, Y., and Suárez-Lepe, J. A. (2017). Pulsed light effect in red grape quality and fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, 10(8), 1540-1547.
6. Chen, K., Escott, C., Loira, I., **Del Fresno, J. M.**, Morata, A., Tesfaye, W., Calderón, F., Suárez-Lepe, J.A., Han, S., and Benito, S. (2018). Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiology*, 69, 51-63.
7. **Del Fresno, J. M.**, Loira, I., Morata, A., González, C., Suárez-Lepe, J. A., and Cuerda, R. (2018). Application of ultrasound to improve lees ageing processes in red wines. *Food Chemistry*, 261, 157-163.
8. Escott, C., **Del Fresno, J. M.**, Loira, I., Morata, A., Tesfaye, W., Carmen González, M., and Suárez-Lepe, J. A. (2018). Formation of polymeric pigments

- in red wines through sequential fermentation of flavanol-enriched musts with non-*Saccharomyces* yeasts. Food Chemistry, 239, 975-983.
9. Escott, C., **Del Fresno, J.M.**, Loira, I., Morata, A., and Suárez-Lepe, J.A. (2018). *Zygosaccharomyces rouxii*: Control Strategies and Applications in Food and Winemaking. Fermentation, 4(3), 69.
 10. Escott, C., Morata, A., Zamora, F., Loira, I., **Del Fresno, J. M.**, and Suárez-Lepe, J. A. (2018). Study of the Interaction of Anthocyanins with Phenolic Aldehydes in a Model Wine Solution. ACS Omega, 3(11), 15575-15581.

Contribuciones a Congresos Internacionales

1. **Del Fresno, J.M.**, Morata, A., Loira, I., Escott, C., Calderón, F., and Suarez-Lepe, J. A. (2017). Acceleration of ageing on lees in red wines by application of ultrasounds. 40th World Congress of Vine and Wine (OIV 2017). 29 de mayo de 2017. Sofía, Bulgaria. Póster.
2. Escott, C., Loira, I., **Del Fresno, J.M.**, Morata, A., Tesfaye, W., and Suarez-Lepe, J. A. (2017). Polymeric pigments formed in sequential fermentation of red fresh musts by adding flavan-3-ols. 40th World Congress of Vine and Wine (OIV 2017). 29 de mayo de 2017. Sofía, Bulgaria. Póster.
3. **Del Fresno, J.M.**, Morata, A., Loira, I., Escott, C., Cuerda, R., and Suarez-Lepe, J. A. (2018). Evolution of oenological parameters through Ageing on lees process assisted with ultrasound treatment. 9º Congreso Internacional de Química de la ANQUE. 17 de junio de 2018. Murcia, España. Póster. **Poster Award**.
4. **Del Fresno, J.M.**, Morata, A., Loira, I., Escott, C., Cuerda, R., and Suarez-Lepe, J. A. (2018). Addition of sonicated yeast biomass for the acceleration of ageing on lees. 41th World Congress of Vine and Wine (OIV 2018). 19 de noviembre de 2018. Punta del Este, Uruguay. Póster.

Contribuciones a Congresos Nacionales

1. Benito, S., **Del Fresno, J.M.**, Palomero, F., and Loira, I. (2016). Gestión de aminas biógenas en vinos. 31 Reunión del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología. 12 de abril de 2016. Madrid, España. Comunicación Oral (Santiago Benito).

Estancias en centros Extranjeros

1. Instituto Superior de Agronomía. 12 semanas. Lisboa, Portugal. Supervisor:
Jorge M. Ricardo da Silva.