

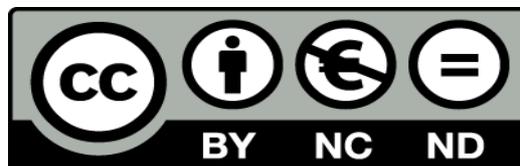


# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TESIS DOCTORAL

Título
<b>Estudio de diferentes métodos de vinificación para elaborar vinos espumosos tintos de calidad</b>
Autor/es
<b>Miriam González Lázaro</b>
Director/es
Belén Ayestarán Iturbe y Zenaida Guadalupe Mínguez
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico

Tesis presentada como compendio de publicaciones. La edición en abierto de la misma NO incluye las partes afectadas por cesión de derechos



**Estudio de diferentes métodos de vinificación para elaborar vinos espumosos tintos de calidad**, tesis doctoral de Miriam González Lázaro, dirigida por Belén Ayestarán Iturbe y Zenaida Guadalupe Mínguez (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



## **TESIS DOCTORAL**

# **ESTUDIO DE DIFERENTES MÉTODOS DE VINIFICACIÓN PARA ELABORAR VINOS ESPUMOSOS TINTOS DE CALIDAD**

**Memoria presentada por  
Miriam GONZÁLEZ LÁZARO**

**Febrero, 2020**

**Dirigida por  
Belén AYESTARÁN ITURBE  
Zenaida GUADALUPE MÍNGUEZ**





Belén AYESTARÁN ITURBE, Profesora Catedrática del Área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de La Rioja y Zenaida GUADALUPE MÍNGUEZ, profesora Titular del Área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de La Rioja e investigadoras del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino,

**CERTIFICAN:**

Que la presente Memoria, titulada: **“Estudio de diferentes métodos de vinificación para elaborar vinos espumosos tintos de calidad.”** Presentada por Miriam GONZÁLEZ LÁZARO, ha sido realizada, bajo nuestra tutela y dirección en el Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja y en el Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad de La Rioja.

Logroño, 2020

Fdo.: Belén Ayestarán Iturbe

Fdo.: Zenaida Guadalupe Mínguez



Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2012-0092-C02 del INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) y por ayudas ATUR de la Universidad de La Rioja. Asimismo, durante el desarrollo de esta tesis he disfrutado de una beca FPI-CAR-UR de la Universidad de La Rioja y Gobierno de La Rioja. Conste mi agradecimiento a dichas instituciones. También quiero agradecer expresamente a la Estación Enológica del ITACyL (Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León) por la elaboración de los vinos y los análisis realizados.



## AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis, la Doctora *Zenaida Guadalupe* por darme la oportunidad de hacer la tesis y a la Catedrática *Belén Ayestarán* por intentar sacar tiempo de donde no lo había para poder ayudarme. Gracias por vuestra confianza.

A la Doctora *Silvia Pérez-Magariño*, por su trabajo y colaboración.

A mis compañer@s de laboratorio, *Olga* que fue quien me recibió en el laboratorio y con quien comencé esta aventura, *Leti*, con quien más tiempo he compartido y a la que le agradezco toda su ayuda y por último, a *Bea* y *Diego* que llegaron en la etapa de escritura.

A mis compañeros del lab 229, con quienes empecé en la investigación hace uno cuantos años y se han convertido en mucho más que compañeros de trabajo. Gracias chicos por todos los momentos compartidos y los que aún nos quedan. En especial a *Carmencita*, *Andrea* y *Paula* que han sufrido conmigo este largo camino. A la Catedrática *Fernanda Ruiz* que fue quien me dio mi primera oportunidad de trabajar en un laboratorio.

A mis compañeros del ICVV, en especial a *Gastón*, *Bianca*, *Sandra* y *Yan*. Por compartir el día a día del doctorando. A la Doctora *Pilar Rubio* por estar siempre dispuesta a echar una mano.

A todo el personal del servicio de laboratorios del edificio Científico Tecnológico de la Universidad de La Rioja, en especial a *Ernesto* y *Nines*.

A mis compañeros del CINDEFI (La Plata, Argentina) que me acompañaron en los comienzos de esta tesis y me hicieron sentir como en casa a 10.000 km de distancia.

A mis antonias y antonios, por ser otra pieza clave durante estos años. A mis quimiquillos, algunos habéis “sufrido” esta maravilla que es hacer la tesis y en especial a *Nora*, con quien he compartido esta etapa simultáneamente y me ha ayudado en todo lo posible. A *Laura*, porque sin tu ayuda no sé qué hubiese hecho con la portada de la tesis... Gracias por vuestra amistad siempre.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia, que me ha apoyado durante todos estos años fielmente, riendo conmigo en las alegrías y levantándome en los momentos más duros. Muchas gracias papá por estar siempre ahí y gracias a mis hermanas y *Esteban* por escucharme, aunque no tuvieseis ni idea de lo que os estaba hablando.



*A mi abuela y a mi madre*



# ÍNDICE

<b>PRESENTACIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
2.1. MERCADO DE VINOS ESPUMOSOS .....	17
2.2. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS VINOS ESPUMOSOS.....	21
2.2.1. <i>Espuma</i> .....	21
2.2.2. <i>Color</i> .....	26
2.2.3. <i>Aroma</i> .....	30
2.2.4. <i>Gusto</i> .....	31
2.3. PRINCIPALES COMPUESTOS QUÍMICOS DE LOS VINOS ESPUMOSOS TINTOS .....	34
2.3.1. <i>Compuestos Fenólicos</i> .....	34
2.3.1.1. Compuestos fenólicos no flavonoides.....	36
2.3.1.1.1. Ácidos fenoles.....	36
2.3.1.1.2. Estilbenos.....	37
2.3.1.2. Compuestos fenólicos flavonoides.....	38
2.3.1.2.1. Flavonoles .....	39
2.3.1.2.2. Flavononoles y flavonas .....	40
2.3.1.2.3. Antocianos .....	40
2.3.1.2.4. Flavanoles .....	41
2.3.2. <i>Compuestos volátiles</i> .....	43
2.3.3. <i>Aminoácidos y aminos biógenas</i> .....	45
2.4. ELABORACIÓN DE VINOS ESPUMOSOS .....	48
2.4.1. <i>Elaboración del vino base tinto</i> .....	50
2.4.2. <i>Tiraje</i> .....	51
2.4.3. <i>Rima</i> .....	51
2.4.4. <i>Punta o pupitre</i> .....	52
2.4.5. <i>Degüelle</i> .....	52
2.4.6. <i>Envejecimiento en botella en ausencia de lías</i> .....	53
2.5. TÉCNICAS ENOLÓGICAS PARA LA ELABORACIÓN DEL VINO BASE .....	54
2.5.1. <i>Técnicas empleadas con uvas pre-maduras</i> .....	54
2.5.1.1. Maceración pre-fermentativa en frío.....	55
2.5.1.2. <i>Délestage</i> .....	56
2.5.1.3. Maceración carbónica .....	58
2.5.1.4. Tratamiento con enzimas pectolíticas.....	61
2.5.2. <i>Técnicas empleadas con uvas maduras</i> .....	62
2.5.2.1. Ósmosis reversa .....	64
2.5.2.2. Nanofiltración .....	65
2.6. REFERENCIAS.....	67
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>87</b>
3.1. VINIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS.....	89
3.1.1. <i>Vinificaciones en las añadas 2012 y 2013</i> .....	89
3.1.2. <i>Vinificación en la añada 2014</i> .....	94
3.2. PARÁMETROS ENOLÓGICOS Y ANÁLISIS QUÍMICOS.....	97
3.2.1. <i>Seguimiento de la maduración de las uvas</i> .....	97
3.2.2. <i>Parámetros enológicos generales</i> .....	97
3.2.3. <i>Parámetros de color</i> .....	97
3.2.4. <i>Compuestos volátiles</i> .....	98

3.2.5.	<i>Compuestos fenólicos monómeros</i> .....	98
3.2.6.	<i>Proantocianidinas</i> .....	99
3.2.7.	<i>Aminoácidos y aminos biógenas</i> .....	99
3.2.8.	<i>Medida instrumental de la espuma</i> .....	100
3.3.	ANÁLISIS SENSORIAL .....	101
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	104
3.5.	REFERENCIAS.....	105
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>107</b>
4.1.	COMPOSICIÓN VOLÁTIL, CARACTERÍSTICAS DE LA ESPUMA Y PROPIEDADES SENSORIALES DE VINOS ESPUMOSOS TINTOS DE TEMPRANILLO ELABORADOS UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS PARA OBTENER LOS VINOS DE BASE .....	109
4.2.	EFFECTO DE DIFERENTES TÉCNICAS ENOLÓGICAS EN LA ELABORACIÓN DE VINOS BASE ADECUADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE VINOS ESPUMOSOS TINTOS: COMPOSICIÓN FENÓLICA, PROPIEDADES SENSORIALES Y PARÁMETROS DE ESPUMA .....	129
4.3.	EVALUACIÓN DE LA MADUREZ DE LA UVA, LA MACERACIÓN CARBÓNICA Y LA APLICACIÓN DE ENZIMAS PECTOLÍTICAS PARA MEJORAR LA CALIDAD QUÍMICA Y SENSORIAL DE LOS VINOS ESPUMOSOS TINTOS .....	149
4.4.	EFFECTO DE DISTINTAS TÉCNICAS ENOLÓGICAS SOBRE EL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS Y DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS ESPUMOSOS TINTOS.....	201
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>211</b>

## Presentación

Esta memoria de Tesis Doctoral se presenta en forma de *compendio de publicaciones científicas* y cumple los requisitos de acuerdo con la normativa de la Universidad de La Rioja.

El objetivo de esta tesis es estudiar diferentes métodos de vinificación, aplicados en la elaboración de los vinos base tintos, para obtener vinos espumosos tintos de calidad. Actualmente en España la producción de vinos espumosos se centra en blancos y rosados. En este sentido, el sector vitivinícola trabaja para mejorar la calidad de los vinos que se producen, y además, resulta muy atractivo para este mercado poder ampliar la oferta de productos con la producción de vinos espumosos tintos.

Para facilitar la lectura de esta memoria, el primer apartado, *Justificación y Objetivos*, centra la temática de la tesis y describe el objetivo principal de la misma. A continuación, la *Introducción* recoge los datos sobre el mercado de los vinos espumosos y las características químicas y sensoriales de estos vinos, así como las diferentes metodologías de elaboración en que se van a estudiar en esta tesis. En el capítulo de *Materiales y Métodos* se describe la metodología y el plan de trabajo desarrollado para llevar a cabo el objetivo planteado en la tesis, cuyos resultados han dado lugar a las publicaciones científicas que se adjuntan en el capítulo de *Resultados y Discusión*, donde también se incluye un resumen de cada artículo y de los resultados más relevantes obtenidos. Finalmente se incluye un capítulo con las *Conclusiones* más destacadas que pueden extraerse de esta tesis.

Las publicaciones científicas que se encuentran recogidas en esta memoria son:

Artículo 1.- *Volatile composition, foam characteristics and sensory properties of Tempranillo red sparkling wines elaborated using different techniques to obtain the base wines.*

European Food Research and Technology, 245: 4017-1059 (2019).

Artículo 2.- *Effects of different oenological techniques on the elaboration of adequate base wines for red sparkling production: phenolic composition, sensory properties and foam parameters.*

Journal of the Science of Food and Agriculture, 99: 4580-4592 (2019).

Artículo 3.- *Evaluation of grape ripeness, carbonic maceration and pectolytic enzymes to improve the chemical and sensory quality of red sparkling wines.*

Journal of the Science of Food and Agriculture, DOI: 10.1002/jsfa.10291.

Además, se incluye el siguiente artículo divulgativo:

*Artículo 4.- Efecto de distintas técnicas enológicas sobre el contenido de aminoácidos y de aminos biógenas en vinos espumosos tintos.*

La semana vitivinícola, 8 de junio de 2019, N º 3.544

## Resumen

El mercado vitivinícola es un mercado activo y dinámico que busca mejorar la calidad de los vinos que se producen, así como ampliar la oferta de productos en el mismo. En los últimos años la producción de vinos espumosos ha crecido de una manera más notable que la producción de vinos tranquilos. Aunque en España la producción de vinos espumosos se centra en vinos espumosos blancos y rosados, en otros países como Australia, Italia o Portugal se producen vinos espumosos tintos. La dificultad para elaborar vinos espumosos tintos de calidad se encuentra en la elaboración de un vino base tinto con unas características muy concretas. Los vinos base tintos deberán tener una graduación alcohólica moderada, una acidez alta, una buena intensidad de color, ser estructurados y equilibrados en boca y presentar un tanino suave. Es necesario que los vinos base tengan una graduación alcohólica moderada porque en el transcurso de la segunda fermentación esta aumenta entre 1 y 1,5 °.

Para conseguir estas características, los enólogos pueden seguir dos estrategias: i) elaborar vinos base a partir de uvas pre-maduras y emplear técnicas enológicas que mejoren la calidad de los vinos; ii) elaborar los vinos base a partir de uvas vendimiadas en su estado óptimo de madurez de la pulpa y emplear técnicas que ayuden a la reducción del contenido alcohólico en los vinos.

Las técnicas estudiadas con uvas pre-maduras fueron: i) vinificación tradicional en tinto; ii) maceración pre-fermentativa en frío con hielo seco; iii) *délestage* con eliminación parcial de semillas; iv) maceración carbónica y v) vinificación tradicional en tinto con adición de enzimas pectolíticas. Con uvas maduras se estudiaron: vi) vinificación tradicional en tinto; vii) reducción del contenido de azúcares del mosto mediante nanofiltración y viii) desalcoholización parcial del vino base mediante ósmosis inversa.

Por tanto, el objetivo de esta tesis es estudiar el efecto de estas técnicas para la producción de vinos espumosos tintos de calidad. Se analizó el efecto sobre los parámetros enológicos, la composición volátil, la composición polifenólica y el contenido de aminoácidos y aminos biógenas en los vinos base y espumosos tintos elaborados a partir de la variedad Tempranillo y siguiendo el método tradicional o *champenoise*. Además, se estudió la influencia sobre el análisis sensorial y los parámetros instrumentales de la espuma en los vinos espumosos tintos finales.

En los dos primeros artículos presentados en esta tesis se analiza el efecto del grado de madurez de las uvas; maceración pre-fermentativa en frío; *délestage* con eliminación parcial de semillas; nanofiltración y ósmosis inversa sobre los parámetros enológicos, la composición

volátil, la composición polifenólica, los parámetros instrumentales de la espuma y el análisis sensorial de los vinos espumosos tintos.

En primer lugar, se concluyó que las diferencias en la composición química de los vinos estudiados se debían fundamentalmente al efecto del grado de madurez de las uvas empleadas en la elaboración de los vinos espumosos tintos. Los tratamientos estudiados tuvieron un efecto menor en la composición química y sensorial de los vinos espumosos tintos. La aplicación de la técnica de la maceración pre-fermentativa en frío produjo vinos espumosos tintos con una composición aromática similar a la de los vinos espumosos tintos elaborados con uvas maduras, consiguió aumentar el contenido de antocianos con respecto al del vino espumoso tinto elaborado por vinificación tradicional con uvas pre-maduras pero no afectó al resto de compuestos fenólicos. Sensorialmente estos vinos se caracterizaron por mostrar una alta correlación con los descriptores de la espuma y por sensaciones de amargor en boca. El tratamiento del *délestage* con eliminación parcial de semillas no tuvo efecto sobre el contenido total de los compuestos fenólicos. Al igual que los vinos espumosos tintos obtenidos por maceración pre-fermentativa en frío, estos vinos se caracterizaron por mostrar una alta correlación con los descriptores de la espuma y gustativamente se caracterizaron por sensaciones de astringencia.

Las técnicas empleadas para la reducción parcial del contenido alcohólico de los vinos base elaborados con uvas maduras, consiguieron reducir el contenido alcohólico de los vinos base, produciendo vinos espumosos tintos con una graduación alcohólica más moderada. La aplicación de la nanofiltración y la ósmosis reversa no afectó al contenido total de antocianos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y proantocianidinas. Por el contrario, estas técnicas sí que afectaron de manera significativa a la composición volátil de los vinos base y espumosos tintos con respecto al vino elaborado por vinificación tradicional con uvas maduras, produciendo una disminución en algunas familias de compuestos volátiles. Gustativamente obtuvieron una buena valoración, caracterizándose los vinos elaborados mediante nanofiltración por los descriptores de equilibrio, acidez y frescura, aunque olfativamente se correlacionaron con notas vegetales, al igual que los vinos espumosos elaborados con uva pre-madura. Sensorialmente, la técnica de ósmosis reversa produjo vinos espumosos tintos similares a los obtenidos por vinificación tradicional con uvas maduras, obteniendo una alta correlación con los descriptores de la espuma y las sensaciones de cuerpo y persistencia.

En los dos últimos artículos presentados en esta tesis se estudió el efecto del grado de madurez de las uvas, la maceración carbónica y la vinificación tradicional en tinto con adición de enzimas pectolíticas sobre los parámetros enológicos, la composición volátil, la composición polifenólica y el contenido de aminoácidos y aminos biógenos, los parámetros instrumentales

de la espuma y el análisis sensorial de los vinos espumosos tintos. El tratamiento con enzimas pectolíticas con uvas pre-maduras no fue efectivo y los vinos espumosos tintos elaborados con adición de enzimas no incrementaron el contenido fenólico ni de aminoácidos con respecto a los vinos elaborados por vinificación tradicional con uvas pre-maduras, aunque mostraron el contenido más alto de lactonas, produciendo vinos de alta intensidad olfativa y aromas frutales. Estos vinos destacaron por presentar el mayor valor de espumabilidad y gustativamente obtuvieron las puntuaciones más altas en frescura, equilibrio y acidez. Los vinos espumosos tintos elaborados por maceración carbónica mostraron el menor contenido en polifenoles totales, y altos contenidos en alcoholes C6, por lo que se caracterizaron por notas de aroma vegetal. La maceración carbónica produjo un aumento en la concentración de aminoácidos totales debido al metabolismo anaeróbico en la uva. En el análisis sensorial de la espuma estos vinos se caracterizaron por altos valores en espuma inicial, área de la espuma y corona de la espuma.

Los vinos tintos espumosos elaborados por vinificación tradicional en tinto con uvas maduras mostraron el mayor contenido en polifenoles, esteroides etílicos, y compuestos ácidos volátiles. En el análisis sensorial obtuvieron una alta correlación con los descriptores de la espuma y las sensaciones de cuerpo y persistencia, además de mostrar buena valoración global, postulándose como una buena técnica para elaborar vinos base tintos para la producción de vinos espumosos tintos de calidad. Si el grado alcohólico del vino base fuese muy elevado, la ósmosis reversa parece la mejor técnica para elaborar vinos base tintos que produzcan vinos espumosos tintos de calidad.



# **1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---



Uno de los principales objetivos que persigue el sector vitivinícola actual, aparte de seguir mejorando la calidad de los vinos, es ampliar la oferta de vinos de calidad. En los últimos años la producción de vino espumoso a nivel mundial ha aumentado en torno a un 40 %, y en España también se está produciendo un aumento en el consumo de este tipo de vinos. El cava continúa siendo el vino espumoso de calidad que mayor porcentaje de ventas presenta en nuestro país.

En nuestro país la producción de vinos espumosos se centra en vinos blancos y rosados. Sin embargo, en otros países del mundo como Australia, Argentina, Sudáfrica, Italia o Portugal, existe una producción importante de vinos espumosos tintos que gozan de gran aceptación por parte del consumidor. Los primeros vinos tintos espumosos surgieron en Australia, y se elaboran principalmente con la variedad *syrah*. La mayoría de estos vinos espumosos tintos no se elaboran siguiendo el método tradicional o *champenoise*, cuyo resultado son vinos de mayor calidad, sino el método *charmat*, en el que la segunda fermentación se lleva a cabo en recipientes herméticamente cerrados. Además, muchos de estos vinos tienen una cantidad de CO<sub>2</sub> natural inferior a la que tienen los vinos espumosos naturales, por lo que se denominan vinos de aguja. El sector vitivinícola es un sector dinámico y competitivo que necesita de la innovación para ofrecer nuevos productos al mercado. Además, el consumo estacional de los vinos espumosos está cambiando en los últimos años, ya que al tratarse de vinos frescos y ligeros, su consumo se está volviendo más regular y menos estacional.

Este trabajo de tesis estudia distintos tipos de vinificaciones para elaborar vinos espumosos tintos de calidad que sean atractivos para el consumidor. La calidad de los vinos espumosos tintos viene definida por la espuma, el color, el aroma y las sensaciones en boca. Estos parámetros de calidad, al igual que ocurre con los vinos tranquilos, se relacionan con la composición química del vino, que dependerá tanto de la variedad y grado de madurez de las

uvas, como de las condiciones climáticas y de cultivo, así como de las prácticas enológicas que se realicen durante la vinificación.

La dificultad para elaborar vinos espumosos tintos de calidad reside en la obtención de un vino base tinto con las características adecuadas, grado alcohólico moderado y acidez alta. Para ello la uva tendrá que ser vendimiada antes de su maduración óptima, por lo que presentará baja concentración y extractabilidad de antocianos y alto contenido de taninos verdes. Por el contrario, si vendimamos la uva en su estado óptimo de maduración, producirá vinos equilibrados en boca, pero con un grado alcohólico excesivo debido a la segunda fermentación que experimentan los vinos en la botella.

En esta tesis se estudian diferentes técnicas de vinificación que puedan solventar estas dificultades y permitan obtener vinos espumosos tintos de mayor calidad.

Las técnicas estudiadas fueron:

Con uvas pre-maduras

- i) vinificación tradicional en tinto.
- ii) maceración pre-fermentativa en frío con hielo seco.
- iii) *délestage* con eliminación parcial de semillas.
- iv) maceración carbónica.
- v) vinificación tradicional en tinto con adición de enzimas pectolíticas.

Con uvas maduras:

- vi) vinificación tradicional en tinto.
- vii) reducción del contenido de azúcares del mosto mediante nanofiltración.
- viii) desalcoholización parcial del vino base mediante ósmosis reversa.

El objetivo global de esta tesis es estudiar el efecto de todas estas técnicas en los parámetros químicos y sensoriales de vinos espumosos tintos elaborados con uva *Vitis vinifera* var. Tempranillo y con el método de elaboración tradicional o *champenoise*. Concretamente, se estudia el efecto de estas técnicas sobre los parámetros enológicos, la composición volátil, la composición polifenólica y el contenido de aminoácidos y aminos biógenas en los vinos base y espumosos tintos. Además, se estudia la influencia sobre el análisis sensorial y los parámetros instrumentales de la espuma en los vinos espumosos tintos finales.

Los resultados obtenidos se presentan en cuatro artículos científicos.

En los dos primeros artículos se estudia el efecto del grado de madurez de las uvas; maceración pre-fermentativa en frío; *délestage* con eliminación parcial de semillas; nanofiltración y ósmosis reversa sobre los parámetros enológicos, la composición volátil, la

composición polifenólica, los parámetros instrumentales de la espuma y el análisis sensorial de los vinos espumosos tintos.

En los dos últimos artículos se estudia el efecto del grado de madurez de las uvas; maceración carbónica; y vinificación tradicional en tinto con adición de enzimas pectolíticas sobre los parámetros enológicos, la composición volátil, la composición polifenólica y el contenido de aminoácidos y aminos biógenas, los parámetros instrumentales de la espuma y el análisis sensorial de los vinos espumosos tintos.



## 2. INTRODUCCIÓN

---

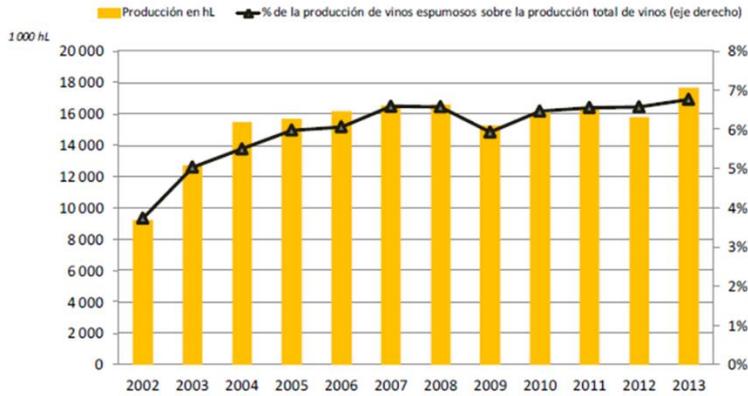


El vino es una bebida alcohólica procedente de la fermentación del mosto de uvas. Dicha bebida ha acompañado al ser humano a lo largo de toda su historia. A partir de los siglos XVII y XVIII, con la evolución de las técnicas de vinificación se comenzó su comercialización. Se trata de un producto con mucha importancia en España, cuya situación mundial actual se describe a continuación.

En el año 2018 la superficie vitícola mundial alcanzó los 7,4 millones de hectáreas, siendo dicha superficie prácticamente similar a la de 2017 (7,6 millones de hectáreas); desde el año 2014 se produjo una disminución de la superficie mundial de viñedo debido a la reducción producida en Turquía, Irán, Estados Unidos y Portugal. Por lo que respecta a la producción mundial de vino, en 2018 se alcanzaron los 29.230 millones de litros, observándose un aumento neto de 4.250 millones de litros con respecto al año 2017, año en el que la producción fue particularmente baja debido a las condiciones climáticas desfavorables en los principales países productores de Europa. El aumento neto de la producción de vino de la Unión Europea en 2018 con respecto a 2017 fue de un 28,3 %. El consumo mundial de vino presentaba desde el año 2014 una evolución prácticamente constante debido a un incremento en el consumo por parte de Estados Unidos y China y a una estabilización del consumo por parte de los principales países productores de la Unión Europea. Sin embargo, en el año 2018, la evolución del consumo mundial de vino parece que ha experimentado un parón. En el año 2018, el consumo fue de 24.600 millones de litros, lo que supuso una pequeña disminución respecto a 2017, aunque estos datos deben ser tratados con cautela debido al margen de error que conlleva el análisis del consumo mundial. Estados Unidos aparece destacado como primer consumidor (posición que ocupa desde 2011); los países europeos muestran un consumo prácticamente estable y países como China o Sudáfrica experimentan una ligera disminución en su consumo (1, 2).

## **2.1. MERCADO DE VINOS ESPUMOSOS**

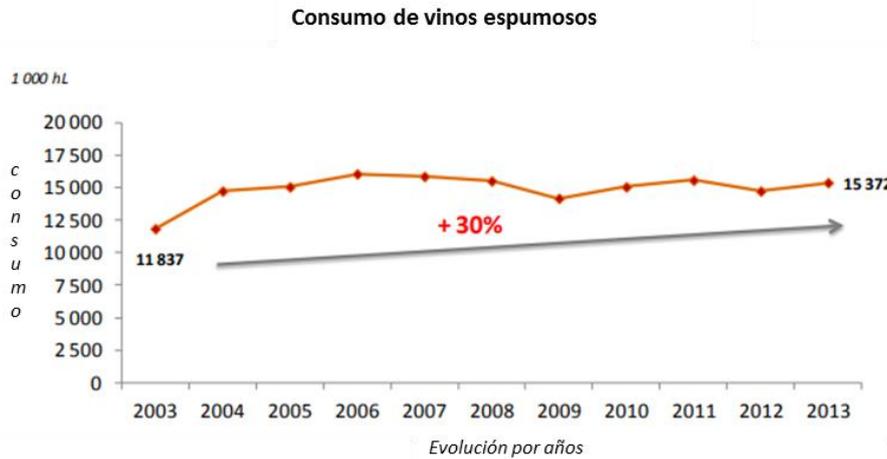
Dentro de los sectores del vino, el de los vinos espumosos es uno de los que más ha aumentado en los últimos años. De acuerdo con los informes presentados por la Organización Internacional de la Viña y el Vino, OIV (3, 4), la producción de los vinos espumosos desde el año 2003 hasta el 2013 ha aumentado en más de un 40 % (Figura 1), mientras que la de vinos tranquilos aumentó sólo un 7 % en este periodo.



**Figura 1.** Evolución anual de la producción mundial de vinos espumosos (3)

En el año 2000 tan sólo 4 países, Francia, Italia, Alemania y España, concentraban el 74 % de la producción de vinos espumosos. Poco a poco esta producción se está diversificando, y en el 2013 la producción de estos países representó el 63 %. Algunos de los países que están incrementando la producción de vinos espumosos son Rusia, Estados Unidos, Australia, Argentina o Brasil (3).

Por lo que respecta al consumo de los vinos espumosos, éste ha aumentado alrededor de un 30 % (Figura 2) en este mismo periodo de tiempo mientras que el consumo de vinos tranquilos aumentó sólo un 4 %.



**Figura 2.** Evolución del consumo mundial de vinos espumosos (3)

Una de las características claves del consumo de los vinos espumosos es la estacionalidad. Se trata de un producto cuyo consumo se asocia con celebraciones, sobre todo con las de final de año, y es por lo que la mayor parte de su consumo se concentra en la segunda mitad del año. Sin embargo, al tratarse de vinos frescos y ligeros, esta tendencia está cambiando últimamente.

El consumo se está volviendo más regular y menos puntual; se consume en aperitivos, cócteles y otro tipo de celebraciones. Tras una disminución en el consumo debido a la crisis, éste está subiendo en los últimos años (3).

En cuanto a la cantidad de vino espumoso que se comercializa mundialmente, en 2017 se alcanzaron los 860 millones de litros exportados. Por tanto, los vinos espumosos continúan siendo el producto que más aumenta en el comercio internacional. En el año 2018, el comercio internacional de los vinos espumosos alcanzó un 9 % de los intercambios en volumen total exportado, representando los vinos espumosos el 20 % del mercado internacional. Italia y Francia representan una gran parte de la cuota de exportación (20 % y 13 %, respectivamente). Estados Unidos y China han incrementado las importaciones de vinos espumosos; en el caso de Estados Unidos, un 8 %, mientras que en China el aumento ha sido de un 5 % (1, 2).

En 2018 España continuó siendo el país con mayor superficie de viñedo del mundo y se situó entre los tres primeros países productores y comercializadores de vino (1). En nuestro país, el sector de los vinos espumosos naturales y del cava es hoy uno de los sectores vitivinícolas más dinámicos y prósperos de la viticultura ya que cada vez aparecen nuevas técnicas para la creación de vinos espumosos naturales más modernos, a pesar de que estos vinos se caracterizan por su gran tradicionalidad. Los primeros vinos espumosos naturales blancos se caracterizaban por su color claro, brillante y transparente. Poco a poco el consumo de estos vinos ha ido cambiando y en la actualidad encontramos en el mercado vinos espumosos naturales rosados. Todo esto hace pensar que la elaboración y comercialización de un nuevo producto, vinos espumosos naturales tintos, podría ser interesante dentro de un mercado tan dinámico como es el del vino en España. Además, en 2017, según un informe del Observatorio Español del Mercado del Vino (OeMv) (5), el cava español superó en exportaciones al champán francés, 117 millones de litros frente a 112; aunque ambos continúan por detrás del *prosecco* italiano que lidera el mercado mundial con 205 millones de litros exportados.

Durante 2015, el 20,4 % del consumo total de vino fuera del hogar fueron vinos espumosos, incluidos el cava y los vinos gasificados (6). El perfil del consumidor de estos vinos corresponde en un 65 % a mujeres, en su mayoría mayores de 50 años (7). En el primer semestre de 2016 se observó un incremento del 4,5 % en el valor de las ventas de los vinos espumosos (5). Además, la producción de cava en los últimos 10 años ha registrado un crecimiento medio del 9 % (8). Estos datos muestran que el mercado de los vinos espumosos en España se encuentra en un buen momento. Dentro de este mercado hay que destacar que el cava sigue manteniendo el mayor porcentaje de ventas. En el año 2017, el Consejo Regulador del Cava informó de un récord de producción, alcanzándose la producción de 252,5 millones de botellas.

Además, existe una tendencia por parte de las bodegas españolas a elaborar vino espumoso natural, siguiendo también el método tradicional o *champenoise*.

En España, la elaboración de vinos espumosos está centrada en blancos y rosados. En otros países del mundo como Italia, Australia, Sudáfrica o Portugal, sí existe producción de vinos espumosos tintos. Aunque se está incrementando la elaboración de vinos espumosos tintos y éstos están ganando visibilidad en el mercado, es muy difícil encontrar bibliografía científica sobre las características químicas y sensoriales de los vinos espumosos tintos.

Los vinos espumosos tintos más conocidos son:

**Shiraz de Australia.** El mercado australiano de vinos espumosos es diverso; comprende estilos que van desde el *Moscato* a vinos espumosos blancos, rosados y tintos; siendo la producción de vinos espumosos blancos la mayoritaria (9). Destacan los vinos espumosos tintos elaborados siguiendo el método tradicional y empleando la variedad de uva *Syrah*. Estos vinos alcanzan una graduación alcohólica en torno a 12,5 % (v/v), pudiendo llegar a 14 % (v/v); y presentan una acidez y un contenido de taninos intermedio. Los vinos jóvenes son de color rojo carmesí, de carácter frutal, ricos y complejos en boca.

**Lambrusco.** Probablemente sea el vino espumoso tinto más conocido. Se elabora en la región de Emilia Romagna de Italia a partir de la uva *Lambrusco*. Existen una gran variedad de lambruscos con características muy diversas, pudiendo encontrar desde vinos dulces a semi-secos o secos. Poseen una graduación alcohólica entre 10,5 y 11 % (v/v) y se caracterizan por tener una acidez discreta y presentar color rojo o rosado (10).

**Brachetto d'Acqui.** Este vino espumoso tinto se elabora en la región del Piamonte en Italia a partir de la variedad aromática de uva *Brachetto*. Se trata de un vino dulce con un contenido alcohólico mínimo de 12 % (v/v) y una acidez media. Se caracteriza por un color rojo rubí de intensidad media, con tendencia al granate, un perfume a musgo delicado con aroma de rosa y una espuma fina y persistente (10).

El creciente consumo de vinos espumosos y vinos tipo *lambrusco* en España hace pensar que los vinos espumosos tintos puedan tener una buena aceptación en determinados grupos de consumidores. Además, un estudio reciente (11) evaluó diferentes factores que influyen en la aceptación de un nuevo producto, como es el vino espumoso tinto, mostrando el interés que despertaría para distribuidores y consumidores. Sin embargo, la dificultad de elaborar un vino base con las características adecuadas para producir un vino espumoso tinto de calidad, graduación alcohólica moderada y acidez relativamente alta, ha retrasado la producción de este nuevo producto en nuestro país.

## 2.2. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS VINOS ESPUMOSOS

La calidad de un vino espumoso tinto viene definida por la espuma, el color, el aroma y las sensaciones en boca. Estos parámetros de calidad se relacionan con la composición química del vino; que dependerá tanto de la variedad y grado de madurez de las uvas, como de las condiciones climáticas y de cultivo, y de las prácticas enológicas que se lleven a cabo durante la vinificación. En un análisis sensorial del vino se evalúa en primer lugar su aspecto; en el caso de los vinos espumosos tintos las características estudiadas son el color y la espuma. A continuación se realiza la evaluación del aroma del vino, primero en copa sin agitar y posteriormente agitando para favorecer que se desprendan los compuestos aromáticos. Después la atención se centra en el gusto y la sensación táctil en boca a través de la cata de una pequeña muestra de vino, y para terminar, los catadores suelen aspirar el vino para potenciar la detección en boca de aromas. Después de haber estudiado individualmente los aspectos sensoriales generales, se trata de integrar todas las sensaciones para poder evaluar la calidad global de los vinos (12).

Los vinos espumosos poseen una matriz única que hace que no sean directamente comparables con los vinos tranquilos debido al dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) disuelto, responsable de la efervescencia típica de estos vinos. Así, la evaluación sensorial de los vinos espumosos o los atributos que se analizan para evaluar su calidad, difieren de los que son referencia para los vinos tranquilos (13).

### 2.2.1. Espuma

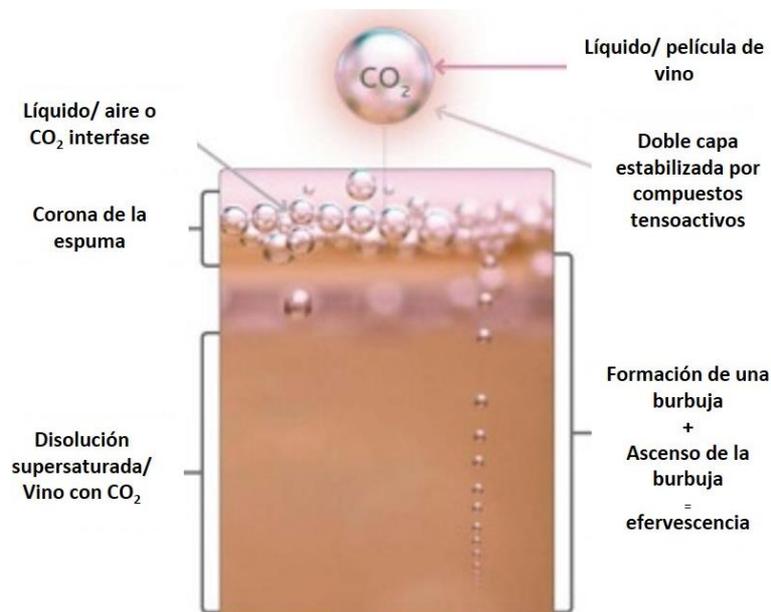
La espuma es la característica que diferencia a los vinos espumosos de los vinos tranquilos, siendo el primer atributo sensorial que catadores y consumidores perciben una vez se ha producido el descorche de la botella. Son por tanto las propiedades visuales de los vinos espumosos, espuma y efervescencia, de suma importancia para la calidad de estos (14-16).

La espuma se produce por el rápido desprendimiento del anhídrido carbónico contenido en los vinos en estado de sobresaturación. La duración del desprendimiento del anhídrido carbónico se denomina permanencia de la espuma y se trata de un estado estacionario en el que la velocidad de desaparición de las burbujas en la superficie del vino se iguala a la incorporación de nuevas burbujas (17). Una espuma de calidad se puede definir como aquella que causa una liberación lenta de  $\text{CO}_2$  desde lo profundo del líquido, con pequeñas burbujas o cadenas de burbujas denominadas rosarios que ascienden por el vino hasta la superficie de este,

donde contribuyen a la formación de un círculo de espuma también denominado corona, cubriendo dicha superficie por completo con burbujas de dos o tres filas de profundidad (18-19).

La evaluación visual de la espuma ha incluido una serie de atributos para la valoración de la efervescencia y la espuma que requiere un entrenamiento específico por parte de los catadores, aunque hay una falta de definiciones universalmente aceptadas para estos atributos (16). Además del impacto visual, el  $\text{CO}_2$  disuelto en los vinos espumosos influye tanto en su percepción aromática como en la gustativa y en su color (20). La efervescencia de la espuma influye en la percepción aromática de los vinos espumosos ya que cuando las burbujas alcanzan la interfaz aire-líquido se rompen provocando una multitud de diminutas gotas en el aire. Este aerosol contiene la esencia organoléptica de los vinos espumosos, es decir, las gotas llevan un concentrado de aromas (21).

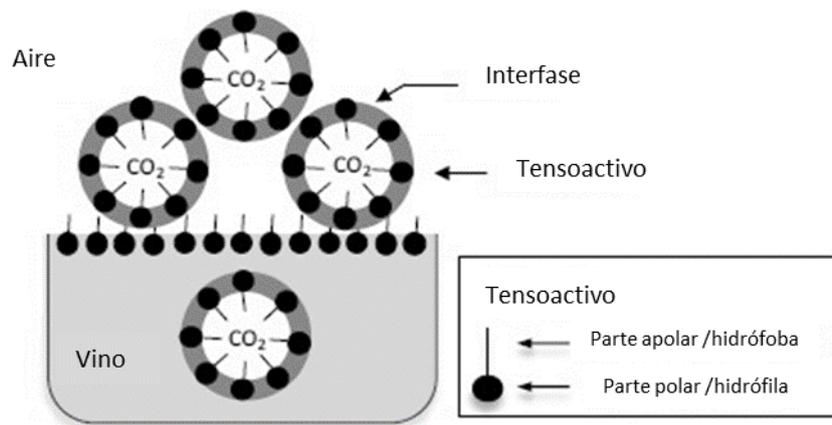
La efervescencia de un vino se define como el desprendimiento de burbujas producido por la liberación del  $\text{CO}_2$  disuelto en el vino (Figura 3). La espuma y su efervescencia son consecuencia del proceso natural que realizan las levaduras en la botella durante la segunda fermentación mediante la cual transforman los azúcares en alcohol y  $\text{CO}_2$ .



**Figura 3.** Representación visual de la efervescencia y la terminología de la espuma (16)

Para la formación de la espuma y su estabilidad es necesaria la presencia de moléculas tensoactivas que reducen la tensión superficial del vino permitiendo la ascensión de las burbujas hasta la superficie y su acumulación creando espuma. Para que la espuma sea estable debe haber en el interior de la botella una sobrepresión de  $\text{CO}_2$ , que junto con los compuestos

tensoactivos, dé a la burbuja su forma casi esférica (Figura 4). Las moléculas tensoactivas se caracterizan por tener un grupo polar que se disuelve tanto en la fase acuosa del vino como en la película que rodea las burbujas, y un grupo hidrofóbico que necesita estar en la fase gaseosa de las burbujas. La disposición de los tensoactivos favorece la entrada de gas en las burbujas y previene que el  $\text{CO}_2$  se disuelva en la masa líquida. Debido a esto muchas burbujas aumentan de tamaño cuando suben hacia la superficie del vino (15, 22).



**Figura 4.** Esquema de la interfase líquido-gas. Adaptado de Buxaderas & López-Tamames (22)

La formación de burbujas en los vinos espumosos se produce principalmente por dos mecanismos. Puede producirse por nucleación directa a partir del gas disuelto en el vino, aunque, por lo general, la formación de burbujas se hace a partir del gas adsorbido en una partícula sólida o en una microcavidad, proceso llamado nucleación inducida o heterogénea (23). La diferencia entre estos dos procesos es que en el primero se va a producir una sola burbuja mientras que en la nucleación heterogénea la microcavidad puede producir burbujas constante y repetidamente; esta cadena de burbujas es lo que genera su efervescencia. Cuando vertemos el vino espumoso en un vaso observamos dos fases para la espuma. La primera fase consiste en una espuma tumultuosa que se eleva varios centímetros a lo largo de la pared de vidrio debido a la rápida descompresión que tiene lugar tras descorchar la botella. A continuación, la espuma se reduce a unos pocos milímetros y comienza la segunda fase de espuma más duradera. Inicialmente se observan una o varias capas de burbujas distribuidas en la superficie del vidrio. Estas capas son generadas por varios rosarios de burbujas que se originan en las microcavidades. Las microcavidades pueden ser partículas de polvo de corcho, residuos de levaduras, fibras de tela, macromoléculas como la bentonita o incluso los mismos poros que haya en el cristal de la copa donde servimos el vino. El  $\text{CO}_2$  es capaz de entrar en estas cavidades debido a la capilaridad; cuando la burbuja alcanza cierto volumen se desprende y sube hasta la

superficie. La intensidad de la espuma disminuye gradualmente a medida que el vino pierde el CO<sub>2</sub> que se ha disuelto debido al aumento en la temperatura del vino y el efecto físico del arrastre causado por la efervescencia (15).

Debido a la importancia que tiene la espuma en la calidad de los vinos espumosos, se han realizado diversos estudios científicos para detectar cuáles son los componentes que originan su aparición, así como los factores que afectan a la composición y las propiedades espumantes de los vinos espumosos.

El método Mosalux, diseñado por Maujean en 1990 (24), es un método instrumental objetivo y normalizado que permite determinar las propiedades de la espuma. Este método se basa en inyectar gas carbónico en el vino previamente desgasificado para provocar la formación de espuma.

Este método mide tres parámetros: HM, HS y TS. HM (*maximum height*) es la altura máxima de espuma, expresada en milímetros, alcanzada por la espuma después de la inyección de CO<sub>2</sub>; representa la capacidad de la disolución para producir espuma. HS (*stability height*) es la altura a la cual se estabiliza la espuma durante la inyección de CO<sub>2</sub>, expresado en milímetros; representa la capacidad de la disolución para producir una espuma estable. TS (*stability time*) es el tiempo de estabilidad de la espuma, expresado en segundos; es el tiempo que transcurre desde la interrupción del flujo de gas y la desaparición total de la espuma.

Las medidas obtenidas por el método Mosalux han sido relacionadas con las características espumantes de los vinos espumosos, siendo útiles a su vez para el análisis sensorial de la espuma (14). Además, estas medidas también se han relacionado con algunos compuestos del vino (22, 25, 26).

Como se ha mencionado anteriormente, la calidad de la espuma está relacionada con sus propiedades espumantes. La cantidad de espuma producida o espumabilidad y la persistencia de la espuma o su tiempo de estabilidad son factores claves para evaluar la calidad de un vino espumoso. La formación de la espuma dependerá del anhídrido carbónico, así como de la presencia de moléculas tensoactivas. Sin embargo, hay una falta de técnicas capaces de cuantificar objetivamente la efervescencia, como las mediciones del tamaño de la burbuja y la velocidad de ascenso de la burbuja.

En los últimos años se ha desarrollado otra técnica para estudiar la espuma (27). El método se basa en la visión y el análisis de imágenes mediante ordenador y relaciona la composición y las puntuaciones sensoriales con la morfología de la espuma, al mismo tiempo que se miden otros parámetros como son la duración, la velocidad y la altura de la espuma.

En la actualidad carecemos de conocimientos sobre el impacto de las prácticas enológicas en las características de la efervescencia. Se sabe que la calidad de la espuma depende

fundamentalmente de la composición del vino, pero no hay certeza de que el proceso de elaboración afecte a la efervescencia de los vinos espumosos.

La estabilidad de la espuma depende de los factores que afectan al espesor de la película que rodea a las burbujas. Hay factores que afectan negativamente a la estabilidad de la espuma, como es la fusión entre burbujas o coalescencia, y el tamaño de éstas (mayor tamaño de burbuja, mayor inestabilidad). También influyen las características físicas del medio líquido, en especial la viscosidad, que depende de la composición del vino y la tensión superficial, la cual disminuye con la presencia de moléculas tensoactivas. En los vinos espumosos podemos encontrar diversos compuestos con propiedades tensoactivas, entre los que destacan el glicerol, el etanol y el ácido tartárico. Estos compuestos muestran una actividad sinérgica que disminuye la tensión superficial del vino incrementando la estabilidad de la espuma, pero el etanol a partir de 12 % (v/v) no puede adoptar la estructura micelar y se disuelve en el vino actuando como disolvente para los grupos hidrofóbicos de otras moléculas. Sin embargo, también existen otras moléculas que actúan como coloides que aumentan la vida media de las burbujas y aumentan la estabilidad de la espuma; estos compuestos son proteínas, polisacáridos y ácidos grasos (15, 16).

Las proteínas son biomoléculas que se encuentran en el vino y son uno de los compuestos tensoactivos que han sido ampliamente estudiados en relación con las propiedades espumantes de los vinos espumosos (17, 26, 28- 32). Dichos estudios han mostrado una correlación positiva entre la concentración de proteínas y la espumabilidad o altura máxima de la espuma (HM). Los aminoácidos, junto con los antocianos monómeros, han mostrado una contribución también positiva en la espumabilidad (25, 33). Los efectos positivos de los polifenoles monómeros sobre la espuma del vino pueden atribuirse a su bajo peso molecular y a su estructura plana, que modula su polaridad, lo que conduce a interacciones moleculares hidrofóbicas a través del apilamiento vertical (16). Los polisacáridos ayudan a estabilizar el vino. Son compuestos que han sido ampliamente estudiados y correlacionados con la espuma en los vinos espumosos, aunque con resultados contradictorios en ocasiones (25, 33, 34). Esto parece indicar que no todos los polisacáridos tienen el mismo comportamiento. Martínez-Lapuente y col. (25) describieron que los polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa son pobres formadores de espuma, pero buenos estabilizadores de ésta. A su vez, las manoproteínas (polisacáridos procedentes de las levaduras) parecen contribuir a la estabilidad de la espuma. Estos compuestos se liberan durante la fermentación y durante el envejecimiento sobre lías debido a la autólisis de las levaduras. Para solventar el gasto económico que supone la crianza sobre lías se pueden emplear derivados de levaduras durante la vinificación para enriquecer el vino en manoproteínas (35, 36). Los ácidos grasos y su influencia en las propiedades espumantes de los vinos espumosos también han sido

estudiados, aunque mostrando resultados no concluyentes por lo que su estudio continúa siendo necesario (26, 36, 37). Gallart y col.(38) describieron que los ácidos grasos libres C8, C10 y C12 se correlacionaban negativamente con HM mientras que los ácidos grasos que se encuentran como ésteres etílicos se relacionaron positivamente con HM. Medina-Trujillo y col. (26) describieron que el vino con mejores propiedades espumantes tenía una menor concentración de factores negativos, como son el etanol y los ácidos grasos, y una mayor concentración de proteínas que actúan como compuestos tensoactivos.

El grado de madurez de las uvas es otro factor importante para la calidad de la espuma ya que afecta a la acidez, la concentración de azúcares, polifenoles y otras sustancias. Esteruelas y col. (30) estudiaron en dos vendimias el efecto de la madurez de las uvas en la elaboración de vinos espumosos, y observaron que las vendimias menos maduras generaban vinos base con mayor espumabilidad. Sin embargo, Liu y col. (32) obtuvieron un resultado contrario; las propiedades espumantes de los vinos base fueron más altas cuando las uvas estaban más maduras. Además, encontraron correlaciones positivas entre el grado de madurez de las uvas *chardonnay* y la espumabilidad de los vinos base en las dos añadas del estudio.

### 2.2.2. Color

La primera sensación que percibimos en una copa es el aspecto visual del vino. El color es la carta de presentación de un vino tanto en vinos espumosos como en vinos tranquilos. Es uno de los aspectos organolépticos más importantes ya que se trata de la primera característica sensorial que recibe el consumidor, junto a la espuma en el caso de los vinos espumosos, y además, es indicador de otros aspectos del vino como son la edad, el estado de conservación y el cuerpo o gusto.

El color de un vino espumoso tinto viene determinado por la composición fenólica del vino base, que dependerá tanto de las propias uvas (variedad y grado de madurez) como de las condiciones climáticas y de cultivo, y de las prácticas enológicas que se lleven a cabo durante la vinificación para elaborar el vino base. La extracción de los compuestos fenólicos de la uva al mosto-vino se produce de manera selectiva durante el estrujado y la posterior maceración-fermentación. La capacidad de extracción de los compuestos fenólicos y su concentración al final del proceso de maceración depende en gran medida de su localización en la baya y de las características de las diferentes variedades de uva. Las distintas variedades de uva poseen diferencias en su pared celular en cuanto a estructura y composición, y por eso no todas las variedades de uva muestran la misma rigidez. Bautista-Ortín y col. (39) concluyeron que es importante conocer cómo se comporta cada variedad durante la maceración para elegir el

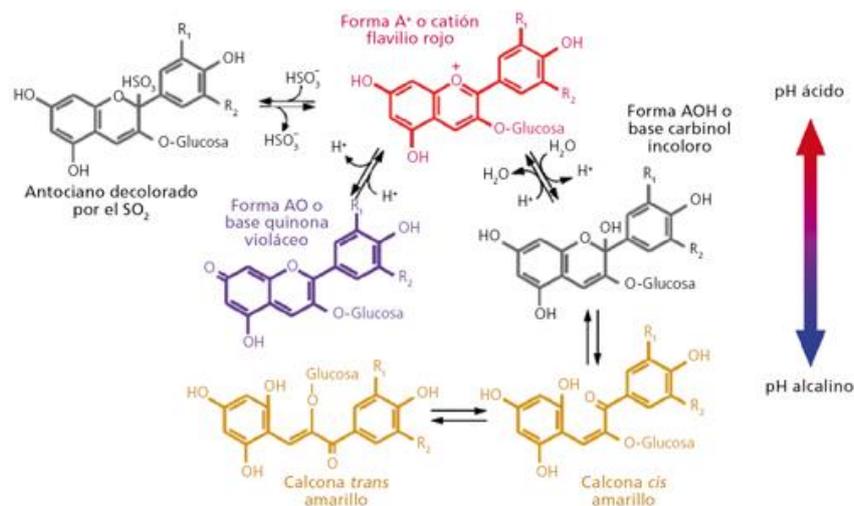
tiempo de maceración adecuado según el tipo de vino que se quiera elaborar. Rizzolo y col. (40) llevaron a cabo un estudio sobre las características físico-químicas y sensoriales de vinos espumosos tintos de Brasil con diferentes tiempos de maceración (24- 48 horas), y observaron que ambos tiempos de maceración eran adecuados para obtener vinos espumosos tintos con frescura, alta calidad y sin defectos. Desde que comienza la vinificación, los antocianos se liberan desde los hollejos de la uva al mosto debido a la ruptura de las células y las vacuolas; también se extraen flavonoles de las pieles y ácidos hidroxicinámicos de la pulpa que participarán en la estabilidad del color. Los taninos contenidos en las vacuolas se comportan de manera similar, pero requieren una mayor concentración de etanol para solubilizar. Existen diversas técnicas que podemos aplicar, ya sean pre-fermentativas o fermentativas, durante la vinificación para aumentar la extracción de los compuestos fenólicos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Técnicas empleadas para aumentar la extracción de los compuestos fenólicos

Prefermentativas	Fermentativas
Campos eléctricos pulsados (PEF) (41, 42, 43).	Temperatura y duración de la maceración-fermentación (44, 50, 51)
Variación de la temperatura antes de la fermentación: Maceración pre-fermentativa en frío y termovinificación (44- 46).	Tratamientos mecánicos del sombrero: bazuqueos, remontados, ganímedes, delestage, sombrero sumergido, etc. (52- 55).
Adición de enzimas pectolíticas (44, 47- 49).	

Sin embargo, una excesiva extracción de compuestos fenólicos puede complicar el inicio de la de la segunda fermentación en botella o en depósito para la elaboración de vinos espumosos.

Los antocianos y sus pigmentos derivados son por tanto los responsables directos del color en los vinos espumosos tintos y rosados. Durante el proceso de vinificación y envejecimiento, los antocianos sufren una serie de transformaciones como son las reacciones de copigmentación, polimerización y cicloadición que confieren estabilidad al color. También hay que tener en cuenta que el color de los antocianos varía en función del pH debido a que hay un equilibrio entre sus distintas formas coloreadas, azul, roja, amarilla e incolora (Figura 5).

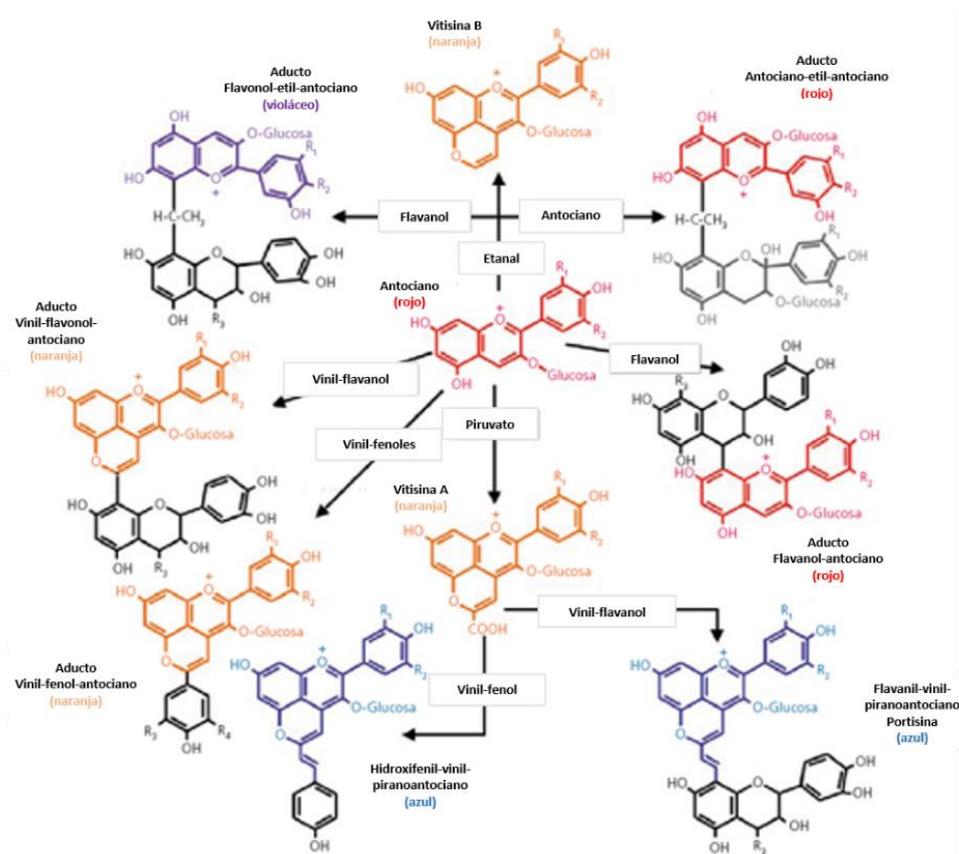


**Figura 5.** Equilibrio entre las distintas formas químicas de los antocianos en función del pH (56)

A pH muy ácido, la forma mayoritaria es el catión flavilio, de color rojo. Cuando el pH del medio aumenta, la forma flavilio se transforma en la base quinona de color violáceo y en la forma carbinol que es incolora. Esta última reacción implica la entrada de una molécula de agua, la liberación de un protón y el ataque nucleófilo del hidroxilo del agua, el cual neutraliza la carga y provoca la desaparición del color rojo. Por tanto, la hidratación del catión flavilio es la responsable de su pérdida de color. El carbinol puede transformarse en las calconas *cis* y *trans* que presentan un ligero color amarillo. Dicha transformación se ve favorecida por temperaturas elevadas. Además, los antocianos en presencia del SO<sub>2</sub> muestran una pérdida temporal de color. Por lo tanto, de acuerdo a estos equilibrios entre las formas rojas, incoloras y azules de los antocianos, el vino tinto a su pH habitual, entre 3,5 y 3,9, debería tener muy poco color rojo y ser azulado, pero esto no es así debido a la gran importancia que tienen la copigmentación y las reacciones en las que se forman nuevos pigmentos (56, 57).

El fenómeno de la copigmentación se produce debido a la capacidad de los antocianos monómeros, en su forma de catión flavilio, para formar asociaciones entre ellos o con copigmentos mediante interacciones débiles. Las moléculas de antocianos son planas y pueden formar asociaciones no covalentes entre ellas o con otras moléculas, dando lugar a estructuras de tipo sándwich con un número de capas variable entre 2 y 10. La unión se realiza a través de enlaces de baja energía que se establecen mediante interacciones entre los anillos aromáticos de las moléculas que participan. Estas estructuras generan un entorno hidrofóbico que va a impedir el acceso de moléculas de agua que potenciarían la formación de bases hidratadas incoloras (carbinol) (58, 59). Asimismo, la copigmentación va acompañada de dos efectos. Por un lado, da lugar a un incremento de la intensidad de color (efecto hiperocrómico) y por otro, se produce un viraje hacia tonalidades más azuladas (efecto batocrómico).

Además de la copigmentación, los antocianos pueden reaccionar con otras moléculas y originar nuevos pigmentos. A continuación, se muestra un esquema con las posibles reacciones de los antocianos, así como los nuevos pigmentos que se forman (Figura 6).



**Figura 6.** Principales reacciones químicas de los antocianos. Adaptado de Zamora-Marín (56)

Durante el envejecimiento y la maduración, el color de los vinos cambia de rojo/violeta a rojo/naranja debido a varias reacciones químicas (oxidación, reducción y polimerización) en las que participan antocianos, siendo así los precursores de nuevos compuestos. Como se puede observar (Figura 6), en las primeras etapas de la evolución del vino, las antocianinas pueden reaccionar con los flavan-3-oles de forma directa formando un nuevo pigmento más estable y de color rojo, o indirectamente a través de aldehídos, produciendo nuevos pigmentos púrpura. El acetaldehído es particularmente importante para las reacciones de transformación química de las antocianinas (57, 60). De igual manera, estos compuestos generan polímeros de antocianos unidos mediante puentes etilo que mantendrían su color rojo, o podrían formar un nuevo pigmento denominado vitisina B, de color anaranjado. A su vez, los antocianos pueden reaccionar con el ácido pirúvico generando la vitisina A, también de color anaranjado. Por último, la vitisina A también puede reaccionar con un vinil-fenol o con un vinil-flanoviol y originar nuevos pigmentos de color azul (56). En general, los pigmentos derivados de las antocianinas

son más resistentes a los cambios de pH y al blanqueo por bisulfito que las antocianinas precursoras. Esto explica la estabilización del color que experimenta el vino durante un correcto proceso de envejecimiento. En esta etapa el oxígeno juega un papel importante en la formación de compuestos derivados de antocianinas y, por lo tanto, decisivo en la estabilidad del color del vino (60). En resumen, el vino posee muchos pigmentos que contribuyen a su color. En función de su composición inicial estarán potenciadas unas u otras reacciones.

### 2.2.3. Aroma

El aroma del vino posee una gran complejidad, debido a su origen, pues es consecuencia de múltiples transformaciones biológicas, bioquímicas y tecnológicas, y también debido al gran número de compuestos volátiles que existen en el vino en diversas concentraciones. La mayoría de los constituyentes químicos del vino generan más sensaciones gustativas que olfativas. Sin embargo, los constituyentes minoritarios son los que producen las características aromáticas distintivas de un vino (12).

Las sustancias volátiles de los vinos espumosos se pueden clasificar en diferentes familias: terpenos, aldehídos y compuestos carbonilos, alcoholes, ácidos volátiles y ésteres. Los terpenos proceden principalmente de la uva y aportan fragancias características de muchas flores, frutas, semillas, hojas, maderas y raíces; pero sólo en su forma libre contribuyen al aroma del vino. El aldehído mayoritario en el vino es el acetaldehído, que por encima de sus valores de umbral olfativo es considerado un defecto olfativo. La mayoría de las cetonas se originan durante la fermentación y son poco significativas sensorialmente, aunque cabe destacar el diacetilo o 2,3-butanodiona, que en bajas concentraciones aporta notas aromáticas de mantequilla o frutos secos. Los alcoholes aromáticos más significativos son los alcoholes superiores que están relacionados químicamente con el etanol pero poseen cadenas de 3 a 6 átomos de carbono. Estos compuestos poseen cierto olor acre y en bajas concentraciones aportan complejidad al buqué del vino. Dentro de los ácidos volátiles destaca el ácido acético por ser el más común; otros ácidos volátiles que se encuentran en el vino son el ácido fórmico, el ácido propanoico o los ácidos carboxílicos  $C_6$  y  $C_{10}$ . Generalmente estos ácidos volátiles poseen un aroma muy marcado que se asocia a defectos olfativos, pero habitualmente se encuentran por debajo de los niveles de detección. En el vino se han identificado más de un centenar de ésteres, aunque la mayoría se encuentran en cantidades muy bajas para influir en el aroma de los mismos. Los ésteres que poseen aromaticidad presentan características frutales que influyen en el buqué de los vinos jóvenes. Durante el envejecimiento pierden influencia aromática debido a que algunos ésteres se hidrolizan (12).

Los compuestos volátiles pueden clasificarse según su origen. Los compuestos varietales o aromas primarios están en la uva en forma libre (pirazinas y terpenoles) o como precursores inodoros. Los constituyentes pre-fermentativos son aldehídos y alcoholes de seis átomos de carbono y son los responsables de aromas verdes y herbáceos. Los compuestos fermentativos que provienen del metabolismo de las levaduras son alcoholes superiores, ácidos grasos y ésteres, y por último, hay compuestos terciarios o post-fermentativos que variarán en función del tipo y la duración de la conservación del vino (61). Los compuestos volátiles producidos durante el envejecimiento en presencia de lías se producen mediante reacciones químicas y/o enzimáticas, y son los que proporcionan al vino espumoso unas características aromáticas propias y distinguibles del resto de vinos tranquilos (62). La influencia de los compuestos aromáticos sobre la espuma no está clara. Gallart y col. (38) observaron que los vinos espumosos estaban enriquecidos en ácidos grasos aunque demostraron una correlación negativa con el parámetro HM, tras estudiar la relación de esterificación de los ácidos grasos concluyeron que los esteres etílicos de ácidos grasos contribuyen a la espumabilidad. Sin embargo, otros autores (26) describieron un efecto negativo de los ácidos grasos en la espuma debido a que los vinos espumosos mostraron una disminución en el contenido de ácidos grasos, sobre todo en los de cadena larga. Ubeda y col. (63) describieron una pérdida significativa de ésteres durante la segunda fermentación y el envejecimiento que podría estar relacionada con la adsorción de las lías, la volatilidad de los ésteres y la hidrólisis química.

#### **2.2.4. Gusto**

La calidad de un vino está fuertemente relacionada con la armonía del equilibrio del gusto del mismo, que tiene un papel clave en la complejidad del vino. En los vinos tranquilos, el equilibrio del gusto se debe principalmente a las interacciones que se producen entre los sabores dulces, ácidos y amargos. Las variaciones en la intensidad de la acidez pueden influir en la percepción de otros atributos como la astringencia. La astringencia es una sensación táctil relacionada principalmente con los compuestos fenólicos. Recientemente se ha sugerido que existen efectos sinérgicos entre los compuestos fenólicos debido al comportamiento cooperativo que tienen estos compuestos al unirse a las proteínas, lo que podría explicar que la astringencia este más influenciada por la composición polifenólica cualitativa que por la concentración total (64). En el vino tinto la astringencia es un atributo importante que está directamente relacionado con la calidad general de los vinos (65). En el caso de los vinos espumosos, durante el envejecimiento sobre lías se produce la autólisis de las levaduras, lo que parece modular la astringencia de los vinos debido a la liberación de polisacáridos que

interaccionan con los compuestos fenólicos (66). Además, las proteínas que son liberadas durante el proceso de autólisis se han relacionado con la percepción de “cuerpo más completo”; y los ácidos nucleicos de las levaduras que son liberados durante la autólisis han sido relacionados con el sabor de los vinos espumosos (13).

Tras la evaluación inicial del aroma, los catadores estudian las sensaciones en boca que los vinos les producen. Las primeras sensaciones en boca potencialmente reconocidas son los sabores dulce y ácido. El sabor dulce es percibido en la punta de la lengua mientras que la acidez es más evidente en los lados de la lengua y en el interior de la boca a la altura de los carrillos. Generalmente la sensación punzante de la acidez es más persistente que la sensación dulce. Puesto que la sensación amarga se detecta más tarde, el incremento de su percepción suele coincidir con el descenso de la percepción del dulzor. El amargor normalmente es percibido en la parte central posterior de la lengua. A continuación, el catador debe centrarse en las sensaciones táctiles en boca, como son la sequedad, la astringencia, las percepciones de ardor o las sensaciones picantes asociadas al dióxido de carbono, en el caso de los vinos espumosos. Aunque todavía se está lejos de dilucidar los mecanismos por los cuales se desarrolla la astringencia, la interacción entre los compuestos fenólicos y las proteínas salivares parece ser lo más importante (64, 67). Los taninos reaccionan con las proteínas que contiene la saliva, generando la sensación de astringencia (65, 68). La primera vez que se prueba el vino suele resultar menos astringente y amargo que en las veces sucesivas. Las percepciones gustativas (dulce, ácido, amargo y salado) y las percepciones táctiles (astringencia, tacto, sequedad, cuerpo...), en combinación con las sensaciones que se generan en nariz, producen la percepción denominada como *flavor* (12).

Algunos de los compuestos químicos con mayor implicación en el sabor de los vinos son los azúcares, los alcoholes, los ácidos y los fenoles. El dulzor en un vino se debe principalmente a los azúcares, en especial a la glucosa y a la fructosa, que en concentraciones superiores a 0,2 % muestran sabor dulce y contribuyen de manera creciente a la sensación de cuerpo. En el caso de los alcoholes, sólo el etanol se encuentra en concentración suficiente para producir sensaciones gustativas detectables. El etanol potencia el sabor dulce de los azúcares, reduce la percepción de acidez haciendo que los vinos parezcan menos ácidos y más equilibrados, incrementa la intensidad percibida de amargor de los compuestos fenólicos y disminuye la sensación astringente de los taninos. Además, el etanol influye en la intensidad del sabor ya que aumenta la volatilidad de los compuestos aromáticos e induce propiedades texturales como el calor en el paladar (69). Cuando el contenido de alcohol aumenta, la sensación de astringencia de los vinos disminuye debido a la interferencia del etanol entre la unión de las proteínas de la saliva y los polifenoles del vino y a la mayor percepción de la viscosidad (67). Los compuestos

ácidos son claves para la estabilidad de color, pero además generan una sensación refrescante o de acidez si se encuentran en exceso. Dentro de los compuestos fenólicos destacan los taninos. En el vino producen un sabor amargo y la sensación de astringencia, además de contribuir al color, cuerpo y *flavor*. La catequina y sus polímeros (taninos condensados) generan la mayor parte del sabor amargo y astringente de los vinos tintos, aunque los ácidos hidroxicinámicos también pueden conferir notas amargas (12).

En el caso de los vinos espumosos, las características deseadas en boca son: i) burbujas que explotan en la boca produciendo una sensación de cosquilleo picante en la lengua; ii) una acidez vigorosa sin aspereza; iii) que presente un retrogusto limpio y persistente; iv) bien equilibrado; v) ausencia de perceptible astringencia o amargor (12).

Dos de los atributos más importantes para conseguir estas características de boca en los vinos espumosos son la acidez que presenta el vino y la sensación punzante que producen las burbujas de CO<sub>2</sub>. Los vinos espumosos de calidad deben presentar una acidez alta que se transformará en la percepción de frescura al catar el vino. En cata, el sabor ácido del vino es uno de los cuatro sabores elementales. La acidez tendrá un carácter metálico y duro, si el principal constituyente de la acidez es el ácido tartárico, de verdor, si domina el ácido málico, o acidulado, si es el ácido cítrico el mayoritario. Los ácidos originados por la fermentación alcohólica presentan un papel secundario. El ácido acético presenta un sabor agrio, aunque es el acetato de etilo el que se percibe en la cata (70).

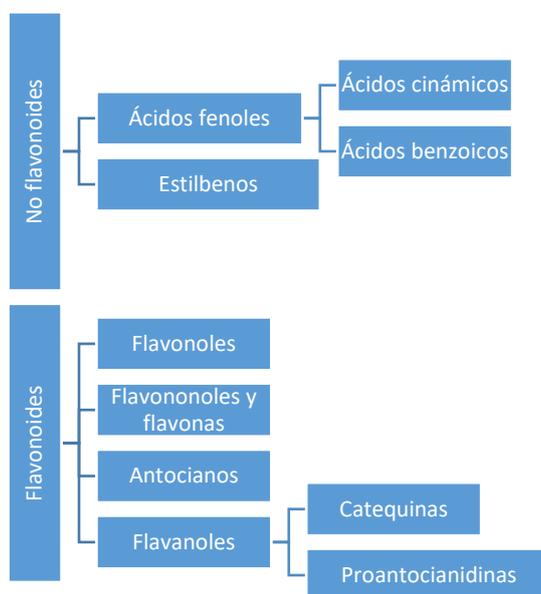
Dentro de las percepciones táctiles, en los vinos espumosos destaca una sensación punzante que se debe a la rotura de las burbujas de CO<sub>2</sub> en la boca produciendo una sensación de cosquilleo u hormigueo característico (20). El CO<sub>2</sub> disuelto implica un estímulo multimodal complejo, y actúa sobre los receptores trigeminales y los receptores gustativos mediante la conversión del CO<sub>2</sub> disuelto en ácido carbónico (71). Además, la sensación punzante se ve afectada por el tamaño de burbuja y la temperatura. A parte de producir esta sensación táctil en boca, el CO<sub>2</sub> disuelto posee un ligero sabor ácido, además de los sabores secundarios de amargor y salado (12, 20). Por tanto, la efervescencia y la espuma no son únicamente atributos visuales, sino que influyen de manera significativa sobre las sensaciones que se perciben en el paladar (72). Una bebida gasificada presenta habitualmente una efervescencia tumultuosa y de grandes burbujas, lo que origina en boca una sensación de agresividad, y perderá rápidamente su efervescencia a causa de la rápida pérdida de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, un vino espumoso natural de calidad presentará en boca un agradable cosquilleo acompañado de una agradable sensación de untuosidad provocada por la espuma (73).

## 2.3. PRINCIPALES COMPUESTOS QUÍMICOS DE LOS VINOS ESPUMOSOS TINTOS

La composición química de un vino es clave para su calidad y por tanto, para sus características organolépticas. Los principales compuestos químicos que influyen en la calidad de un vino son los compuestos fenólicos, los compuestos aromáticos y los compuestos nitrogenados.

### 2.3.1. Compuestos Fenólicos

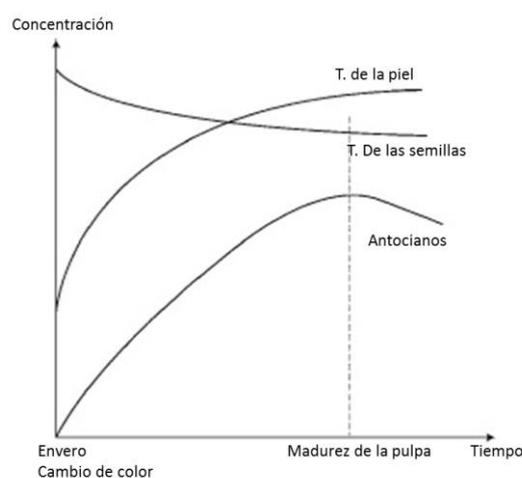
Los compuestos fenólicos influyen de manera muy significativa en las características sensoriales de los vinos, principalmente tienen efecto en el color, aroma, cuerpo, astringencia y amargor (74, 75). Además, poseen propiedades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias (76- 80). Químicamente, los compuestos fenólicos se caracterizan por tener un núcleo bencénico que contiene uno o varios grupos hidroxilo. Según su estructura química, generalmente se clasifican en dos grandes subgrupos: fenoles no flavonoides, que abarcan los ácidos fenólicos y los estilbenos, y fenoles flavonoides (81) (Figura 7).



**Figura 7.** Clasificación de los compuestos fenólicos. Adaptado de Zamora (58)

Los compuestos fenólicos se encuentran en las distintas partes del racimo de la uva. En general, los no flavonoides se encuentran en cualquier parte del racimo (piel, pulpa, semillas y

raspón), mientras que los flavonoides, según a que familia pertenecen, se encuentran mayoritariamente en una u otra parte de la uva; de ahí las diferencias en cuanto a su extractibilidad. Los flavonoles y los antocianos predominan en los hollejos de la uva mientras que los 3-flavanoles se localizan preferentemente en la piel, las semillas y el raspón (58). Existen un gran número de factores que influyen en la composición fenólica de las uvas como la variedad, las condiciones edafoclimáticas, las condiciones culturales del cultivo y las prácticas tecnológicas. El grado de maduración de las uvas también influye fuertemente en la composición fenólica. En la Figura 8 se detalla la evolución durante la maduración de la uva de los taninos de la piel y de las semillas, así como de los antocianos.



**Figura 8.** Evolución de los compuestos fenólicos durante la maduración. T: taninos (74)

Los antocianos aumentan su concentración durante la maduración de la uva hasta llegar a un máximo cuando la pulpa alcanza su madurez; a partir de ese momento disminuye su concentración. Los taninos de la piel muestran una tendencia de aumento de la concentración con la madurez mientras que los taninos de las semillas tienden a disminuir. En términos generales, tanto la concentración de antocianos como de taninos aumenta durante la maduración de la uva. Además, los taninos de la piel disminuyen su astringencia según avanza la madurez de las uvas, mientras que los taninos de las semillas son siempre más astringentes. Haciendo un balance global, para un mismo grado de extracción, los vinos elaborados con uva madura deberán ser menos astringentes que los elaborados con uva pre-madura (58).

Los compuestos fenólicos de los vinos tintos tranquilos han sido ampliamente estudiados. En relación a los vinos espumosos, existen diversos estudios acerca de la composición fenólica de los vinos base y de los vinos espumosos durante la crianza en presencia de lías tanto en vinos espumosos blancos como en rosados (82- 86). Sin embargo, es escasa la bibliografía científica

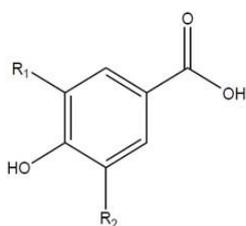
sobre los vinos espumosos tintos y la composición polifenólica de los mismos. Jordão y col. (87) estudiaron los diferentes porcentajes de fracción de proantocianidinas (fracción monomérica, oligomérica y polimérica) en vinos espumosos comerciales blancos y tintos de la Denominación de Origen Portuguesa de *Bairrada*. Stefenon y col. (88) evaluaron la actividad antioxidante de vinos espumosos blancos, rosados y tintos producidos tanto por el método *charmat* como por el *champenoise*. Torchio y col. (89) estudiaron la composición polifenólica y las características cromáticas de vinos base y espumosos tintos dulces elaborados con la variedad *brachetto* y observaron que estas características y la composición de los vinos espumosos se mantuvieron estables durante un año de conservación. Ivit y col. (90) estudiaron el uso de levaduras no *Saccharomyces* en la elaboración de vinos espumosos blancos y tintos, y analizaron el contenido de antocianos, piranoantocianos y el color.

### 2.3.1.1. Compuestos fenólicos no flavonoides

Dentro de este grupo se encuentran los ácidos fenoles y los estilbenos (Figura 7).

#### 2.3.1.1.1. Ácidos fenoles

Los ácidos fenoles se subdividen en ácidos benzoicos y ácidos cinámicos. Pueden encontrarse en el vino en forma libre, pueden proceder de la hidrólisis de otros polifenoles o encontrarse esterificados con azúcares, ácidos orgánicos o alcoholes. Estos compuestos se encuentran en los hollejos, en la pulpa, en las semillas y en el raspón. En la Figura 9 se representa la estructura química de los ácidos benzoicos, que en el vino se encuentran mayoritariamente como ácido gálico, ácido sirínico y ácido p-hidroxibenzoico.

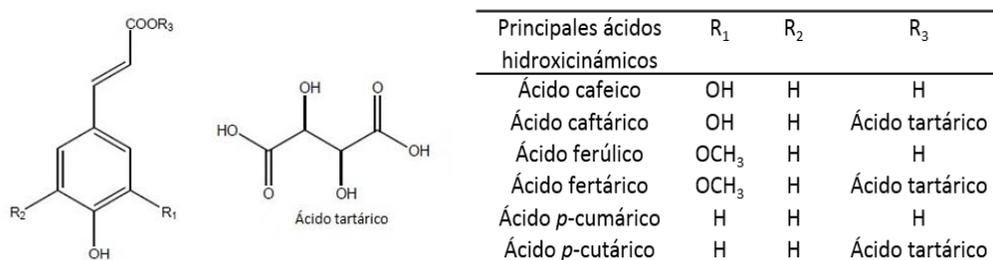


Principales ácidos benzoicos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Ácido Gálico	OH	OH
Ácido p-hidroxibenzoico	H	H
Ácido Sirínico	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Figura 9.** Estructura química de los principales ácidos benzoicos del vino. Adaptado de Zamora (58)

Los ácidos hidroxicinámicos son los principales ácidos fenoles de la pulpa. En el vino se encuentran como ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido cumárico como forma libre; como forma

esterificada con el ácido tartárico se presentan como el ácido caftárico, el ácido fertárico y el ácido cutárico (Figura 10). Durante la segunda fermentación y la crianza sobre lías se produce la hidrólisis de los ácidos esterificados dando lugar a un incremento en la concentración de los ácidos libres (91). Martínez-Lapuente y col. (85) describieron una disminución en la concentración de los ácidos hidroxicinámicos durante el envejecimiento en presencia de lías de vinos espumosos blancos y rosados, debido a interacciones con otros compuestos para formar pigmentos más estables y /o porque fueron adsorbidos por las levaduras. En los últimos meses de la crianza en presencia de lías, los ácidos hidroxicinámicos adsorbidos fueron liberados debido al proceso autolítico, sobre todo en los vinos que presentaron altas concentraciones de estos compuestos.



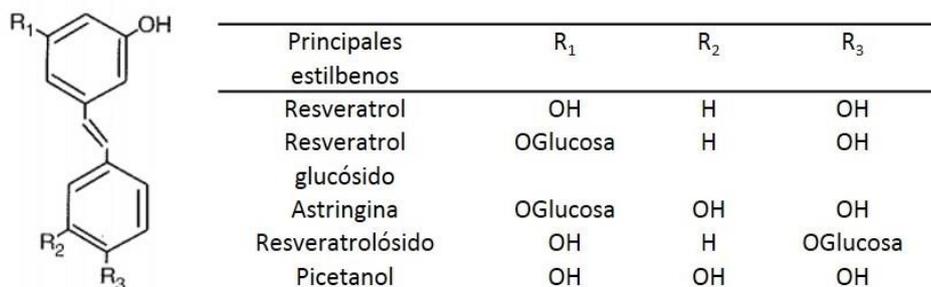
**Figura 10.** Estructura química de los principales ácidos hidroxicinámicos. Adaptado de Zamora (58)

Los ácidos fenoles son compuestos que carecen de color pero que pueden participar en las reacciones de copigmentación (92). Desde el punto de vista organoléptico los ácidos fenoles muestran en disolución cierto sabor ácido, amargo y astringente; y su degradación puede originar fenoles volátiles, algunos de los cuales están asociados a defectos aromáticos. Algunos estudios parecen indicar que los ácidos fenólicos afectan a la astringencia percibida. Además, se ha postulado un efecto sinérgico entre los ácidos fenólicos y los flavanoles denominado “co-astringencia”; de acuerdo con esto, las mezclas de compuestos fenólicos son más astringentes que el compuesto fenólico aislado en la misma concentración (64, 93).

### 2.3.1.1.2. Estilbenos

Los estilbenos son compuestos fenólicos no flavonoides. Su concentración puede variar debido al estado sanitario de la uva ya que se desarrollan frente a ataques fúngicos como mecanismo de defensa o frente a una situación de estrés biótico o abiótico (94). El resveratrol o 3,4,5- trihidroxi-estilbeno se encuentra en los hollejos de las uvas en una concentración

aproximada de 20 µg/baya. En los vinos tintos su contenido promedio es 7 mg/L, en rosados 2 mg/L y en blancos 0,5 mg/L, aunque estos valores pueden variar en función de la variedad de uva empleada en la vinificación (95). En la Figura 11 se representa la estructura química de los estilbenos.



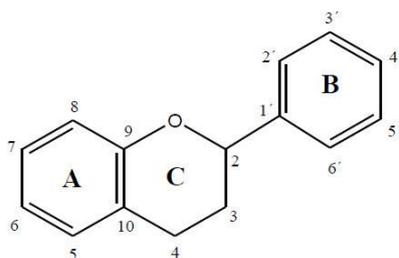
**Figura 11.** Estructura química de los estilbenos. Adaptado de Zamora (58)

Respecto a la influencia de los estilbenos sobre el color y el resto de características organolépticas de los vinos, Gaudette & Pickering (95) describieron una mayor densidad de color y un tono menor en los vinos tintos enriquecidos con *trans*-resveratrol, que podría explicarse por reacciones de copigmentación entre los antocianos y el *trans*-resveratrol. En el caso de vinos blancos, el enriquecimiento con *trans*-resveratrol parece aumentar la percepción de la astringencia y del amargor.

Además, en los últimos años estos compuestos están cobrando interés debido a sus propiedades beneficiosas sobre la salud humana (95- 98).

### 2.3.1.2. Compuestos fenólicos flavonoides

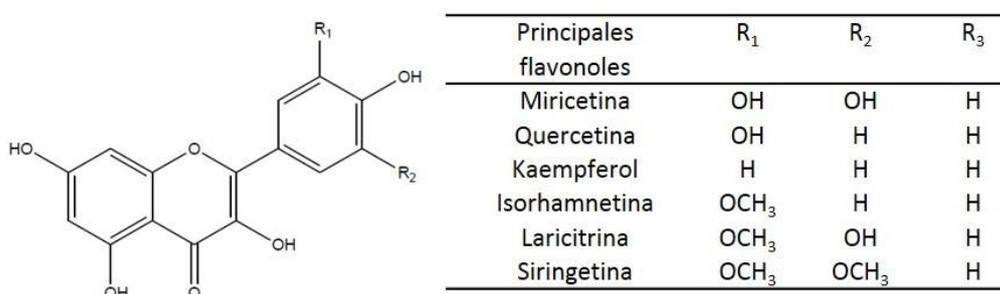
Se distinguen cuatro familias, flavonoles, flavonoles y flavonas, antocianos y flavonoles, que a su vez se subdividen en catequinas y taninos condensados (Figura 8). Los compuestos flavonoides son moléculas formadas por una estructura de 15 átomos de carbono, dispuestas en una estructura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Estos compuestos están formados por dos anillos bencénicos, denominados A y B, unidos por una cadena de tres átomos que forman parte de un heterociclo oxigenado (Figura 12).



**Figura 12.** Estructura general de los flavonoides. Adaptado de Cooper y col. (99)

### 2.3.1.2.1. Flavonoles

Los flavonoles son pigmentos amarillos que se localizan en los hollejos de las uvas donde pueden encontrarse como forma heterósida (glucósido, galactósido, ramnósido, rutinósido o glucurónido) de las seis agliconas conocidas, quercetina, miricetina, kaempferol, isoramnetina, laricitrina y siringetina. En el vino, debido a la hidrólisis ácida que sufren durante la elaboración y envejecimiento se encuentran tanto como flavonoles glicósidos como en la forma aglicona denominada “forma libre” (100). La estructura de estos compuestos se representa en la Figura 13.



**Figura 13.** Estructura química de los flavonoles. Adaptado de Zamora (58)

Los flavonoles son compuestos fácilmente extraíbles aunque no son muy solubles en agua, por lo que requieren que haya algo de etanol para su extracción. En su forma libre su participación en el color del vino tinto es poco importante, aunque principalmente contribuyen a la componente amarilla. Sin embargo, son importantes en los procesos de copigmentación (57, 59, 92, 101). Con respecto al sabor, son compuestos que se han relacionado con las sensaciones de amargor. Sin embargo, pueden participar en la astringencia de los vinos ya que algunos estudios han demostrado que la adición de quercetina-3-O-glucósido vuelve al vino más astringente, verde, seco y persistente. Además, son compuestos de interés para la industria alimentaria debido a sus propiedades beneficiosas como propiedades antioxidantes, actividades

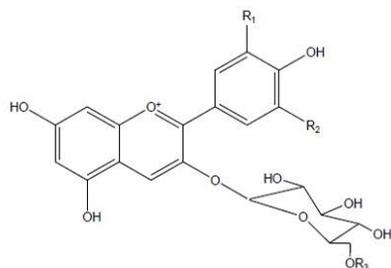
anticancerígenas, disminución de la inflamación y del riesgo a padecer enfermedades crónicas (64, 102).

### 2.3.1.2.2. Flavonoles y flavonas

La estructura química de estos compuestos es muy similar a la de los flavonoles (Figura 13); únicamente difieren en que los flavonoles y flavonas no poseen el doble enlace del heterociclo. Estos compuestos han sido identificados en champanes monovarietales elaborados a partir de *Chardonnay* y *Pinot noir* (91).

### 2.3.1.2.3. Antocianos

Su nombre proviene del griego, *anthos* flor y *kyanos* azul. Son los compuestos responsables del color de los vinos espumosos tintos y son extraídos durante el proceso de maceración-fermentación. Se localizan en los hollejos de la uva aunque en las especies tintoreras podemos encontrarlos también en la pulpa. Su estructura básica es del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, (Figura 14).



Antocianos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Pelargonidina	H	H
Delfinidina	OH	OH
Cianidina	OH	H
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Figura 14.** Estructura de los antocianos (R<sub>3</sub>: ácido acético, ácido cumárico o ácido cafeico).

Adaptado de Monagas & Bartolomé (103)

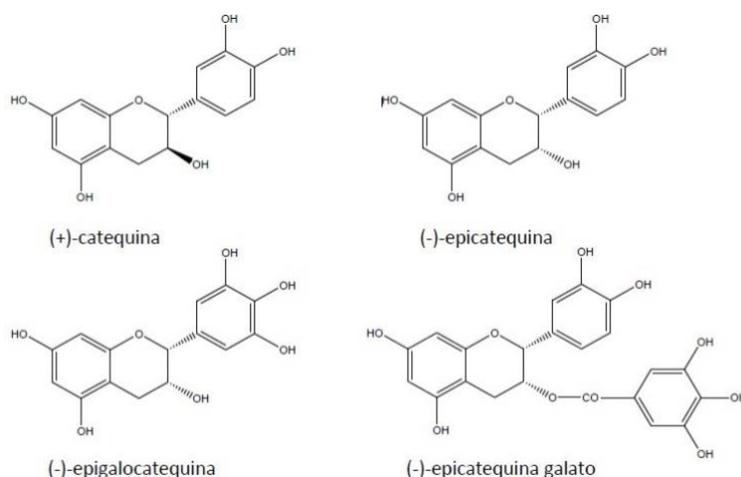
Los antocianos están formados por la combinación de una aglicona, que es la parte cromófora y se denomina antocianidina, y de un azúcar que generalmente es la glucosa. La glucosa puede estar esterificada en la posición 6 con distintos ácidos (R<sub>3</sub>). Principalmente en *Vitis vinifera* las antocianinas identificadas son cinco, delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, siendo la malvidina-3-glucosido la antocianina mayoritaria. Sin embargo, también ha sido detectada en baja concentración una sexta antocianidina, la pelargonidina (104).

La concentración de antocianos en el vino depende de un gran número de factores como la variedad y estado de madurez de la uva, las condiciones climáticas y las prácticas enológicas aplicadas durante la vinificación (intensidad del prensado, tiempo de maceración, temperatura de fermentación, levaduras, enzimas, manejo del sombrero, etc.). Durante la crianza los antocianos sufren una serie de reacciones que pueden hacerlos más estables y pueden incluso desaparecer.

En estudios previos sobre vinos espumosos tintos (89, 90), se describió una disminución de la concentración de antocianos durante la segunda fermentación con respecto a la medida en el vino base.

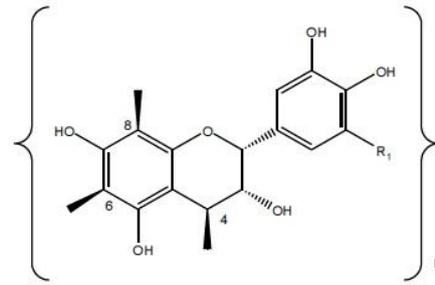
#### 2.3.1.2.4. Flavanoles

Los principales flavanoles o flavan-3-oles de la uva son los monómeros de (+)- catequina, (-)- epicatequina, (-)- epigallocatequina y (-)-epicatequina galato (Figura 15). Estos compuestos se encuentran en el hollejo, en las pepitas y el raspón de la uva de forma simple o polimerizada. Los taninos de las semillas presentan menor grado de polimerización que los taninos de la piel (105).



**Figura 15.** Principales flavanoles monómeros

Además de como compuestos monómeros, los flavanoles se encuentran en las uvas y el vino como polímeros, y reciben el nombre de taninos condensados o proantocianidinas (Figura 16).



**Figura 16.** Estructura de las proantocianidinas

El grado medio de polimerización, mDP, es el número promedio de subunidades de flavan-3-ol que componen la cadena de taninos. Se trata de un parámetro con una gran heterogeneidad y tiene diferentes valores dependiendo de la variedad de uva, del efecto de la añada y de las técnicas enológicas aplicadas durante la vinificación (106).

Las formas monómeras de los flavanoles presentan un ligero color amarillo o son incoloras; al aumentar la polimerización se incrementa el color amarillo. Respecto al color del vino, los flavanoles pueden actuar como copigmentos colaborando en la estabilidad del color durante el envejecimiento (57, 107, 108).

Las proantocianidinas han mostrado una gran afinidad por las proteínas salivares. Son componentes principales de los vinos debido a que se extraen de los hollejos de las uvas y de las semillas durante la vinificación. Por estas razones se considera que la astringencia del vino está impulsada por los flavanoles. La epicatequina es más astringente que la catequina y muestra una astringencia persistente, inmadura, seca y dura. La galocatequina es sin embargo menos astringente que la catequina, y se explica porque el número de sustituyentes hidroxilo en el anillo B del núcleo flavánico (Figura 12) es importante en la interacción con las proteínas salivares y el desarrollo de la sensación de astringencia. Respecto al peso molecular, y a medida que la cadena de polímero se alarga, mayor es la astringencia de los taninos. Además, las proantocianidinas pueden actuar como ligandos polidentados; cuanto mayor es su peso molecular, mayor es el número de posibles sitios de unión en la proantocianidina, lo que incrementa la capacidad de los taninos para interactuar con las proteínas. Sin embargo, la relación entre el tamaño molecular de la proantocianidina y la afinidad por las proteínas no es directa y se deben tener en cuenta algunos factores. Por un lado, al aumentar el peso molecular las partes hidrofóbicas, pueden ser menos accesibles y los taninos se vuelven más inflexibles, limitando el contacto con la proteína. Por otro lado, la solubilidad de los taninos altamente condensados es baja, lo que puede producir su auto-precipitación antes de que se produzca la interacción (64, 93).

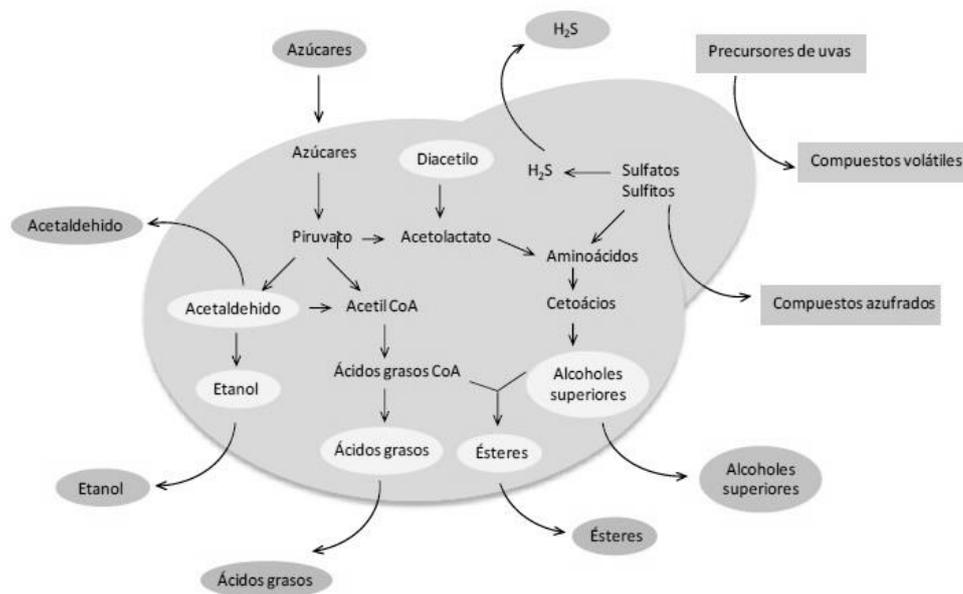
### 2.3.2. Compuestos volátiles

Los compuestos aromáticos que se encuentran en los vinos espumosos tienen diferentes orígenes. Pueden proceder principalmente de la uva (aromas varietales o primarios), de las levaduras que llevan a cabo las fermentaciones (aromas fermentativos o secundarios) o del envejecimiento sobre lías (aromas derivados de la crianza o terciarios). Los aromas verdes o herbáceos están ligados a la uva pre-madura, pero si no superan el umbral de detección en el vino no tienen por qué ser perjudiciales para la calidad organoléptica de los vinos. Los compuestos que contribuyen al aroma pueden estar en forma libre o ligada. En la uva existen compuestos precursores glicosídicos que serán los compuestos que liberen por vía química o enzimática moléculas aromáticas durante la fermentación o el envejecimiento. Los precursores aromáticos incluyen compuestos derivados de mercaptanos, fenoles volátiles, lactonas, norisoprenoides, vainillinas y terpenos ligados a azúcares (109- 111).

Aunque la composición general de la mayoría de las variedades de uva es muy similar, los aromas varietales son algunos compuestos que permiten diferenciar a los vinos por su variedad. En el caso de la variedad Tempranillo, en vinos tranquilos se ha caracterizado como compuesto volátil típico de la variedad el eugenol, con aroma a regaliz y clavo (112).

Los aromas secundarios son producto de las fermentaciones producidos por microorganismos del vino (levaduras y bacterias lácticas), que participan en las notas florales, afrutadas y lechosas de los vinos jóvenes; principalmente son ésteres etílicos de ácidos grasos y acetatos de alcoholes superiores (113). Son cuantitativamente el grupo más numeroso, aunque el impacto en el aroma global de los vinos no es tan acusado (114). En la Figura 17 se detalla la formación de los aromas secundarios del metabolismo de la levadura que se producen durante la fermentación alcohólica. Los ácidos grasos, junto con sus ésteres, y los alcoholes son los compuestos más característicos del aroma fermentativo. Los alcoholes son el grupo mayoritario de compuestos volátiles que se forman durante la fermentación alcohólica. Se forman a partir de los aminoácidos y en los vinos espumosos destacan el 2- y 3-metil butanol, propanol, pentanol, 2-metilpropanol, butanol y 2-feniletanol. Si la concentración de estos compuestos es inferior a 400- 500 mg/L aportan complejidad al vino (115). Los ésteres son otro grupo de compuestos importantes que se forman en esta etapa. La mayoría son ésteres etílicos de ácidos grasos que contribuyen a las notas frutales incluso en bajas concentraciones (116). Los ácidos grasos pueden ser lineales de cadena corta ( $C_2-C_4$ ), media ( $C_6-C_{10}$ ) y larga ( $C_{12}-C_{18}$ ), o ramificados como el 2-metil propanoico o el 2-metil butanoico, sobre los cuales se ha comprobado que a

medida que aumenta la longitud de su cadena, la volatilidad disminuye y el olor cambia de ácido a rancio (117).



**Figura 17.** Formación de compuestos del aroma por la levadura durante la fermentación alcohólica. Adaptado de Pozo-Bayón (114)

Otros compuestos secundarios son los carbonílicos; entre los que influyen en el aroma del vino se encuentran el acetaldehído, la acetoina, el diacetilo y la 3-hidroxipentan-3-ona, siendo el acetaldehído el más abundante. Las levaduras, por descarboxilación de los ácidos cumárico y ferúlico, producen fenoles volátiles entre los que destacan el 4-vinilfenol y el 4-vinilguayacol, aunque se producen en mayor cantidad en los vinos blancos. Martínez-García y col. (118) en su estudio sobre la composición volátil de vinos base y vinos espumosos blancos, observaron que debido a la presión del  $\text{CO}_2$ , al final de la segunda fermentación aumentaba el contenido en ésteres y disminuían los alcoholes superiores y aldehídos respecto a los valores medidos a mitad de la fermentación.

El aroma terciario está formado por todos aquellos compuestos que se originan durante la conservación y el envejecimiento de los vinos. Durante el envejecimiento de los vinos espumosos la autólisis de las levaduras produce importantes cambios en la composición de los vinos, especialmente en los compuestos volátiles, lo que influye en la calidad final de los vinos (119, 120). Durante esta etapa se producen simultáneamente la síntesis y degradación de diversos compuestos, por lo que los estudios muestran resultados contradictorios. Se produce la hidrólisis de algunos ésteres, como los acetatos de alcoholes superiores, con lo que el vino se empobrece en compuestos relacionados con notas aromáticas más frescas y asociadas a aromas

florales y frutales. En la superficie de las lías pueden quedar retenidos ésteres, aldehídos y terpenos, modificando también así el aroma de los vinos espumosos (63, 121).

Muchos precursores aromáticos presentes en el vino pueden sufrir también una progresiva hidrólisis liberando compuestos aromáticos como los vitispiranos y el TDN (1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno), que están asociados a aromas a frutos secos, tabaco o quemado. Se considera que su origen se debe a la acción de las enzimas liberadas durante la autólisis de las levaduras sobre los carotenoides (109, 122).

La mayoría de estudios sobre la composición volátil de los vinos espumosos se ha centrado en variedades típicas para la elaboración de cavas. Sin embargo, existen algunos estudios sobre vinos espumosos que se han elaborado a partir de variedades tintas. Hidalgo y col. (123) realizaron su estudio sobre uvas de la variedad Garnacha confirmando su idoneidad para la elaboración de espumosos rosados; Riu-Aumatell y col. (109) estudiaron la evolución de los compuestos volátiles durante el envejecimiento en presencia de lías en cavas y vinos espumosos rosados elaborados con la variedad Trepát. Pozo-Bayón y col. (120) estudiaron la composición volátil de las variedades Trepát y Monastrell, observando que la variedad influyó en la composición volátil de los vinos espumosos y confirmando que las uvas de la variedad Monastrell tenían una buena aptitud para la elaboración de vinos espumosos rosados. Ivit y col. (90) han publicado un trabajo centrado en el efecto del uso de levaduras *no Saccharomyces* en la elaboración de vinos espumosos blancos y tintos. Dicho estudio evalúa la composición volátil de los vinos base y espumosos tras 4 meses de crianza en presencia de lías empleando las variedades Airén y Tempranillo. Rizzolo y col. (40) observaron una disminución del contenido de acetaldehído durante la maceración en su estudio sobre las características físico-químicas de los vinos espumosos tintos de Brasil. Ubeda y col. (63), en su estudio sobre los cambios en la composición volátil de vinos espumosos elaborados a partir de la variedad Tempranillo, describieron una disminución del contenido de ésteres durante el envejecimiento en presencia de lías, lo que se relaciona con una disminución de aromas frutales y florales de los vinos.

### **2.3.3. Aminoácidos y aminos biógenas**

Los aminoácidos presentes en el vino pueden tener diferentes orígenes. Además de los que están presentes en las uvas y los que pueden ser metabolizados por las levaduras y bacterias lácticas durante las fermentaciones, otros son secretados por las levaduras y bacterias al final de las fermentaciones, algunos son liberados por proteólisis durante la autólisis de levaduras muertas y otros se producen por degradación enzimática de las proteínas de la uva. A su vez, la variedad y el estado de maduración de la uva, las condiciones climatológicas, así como las

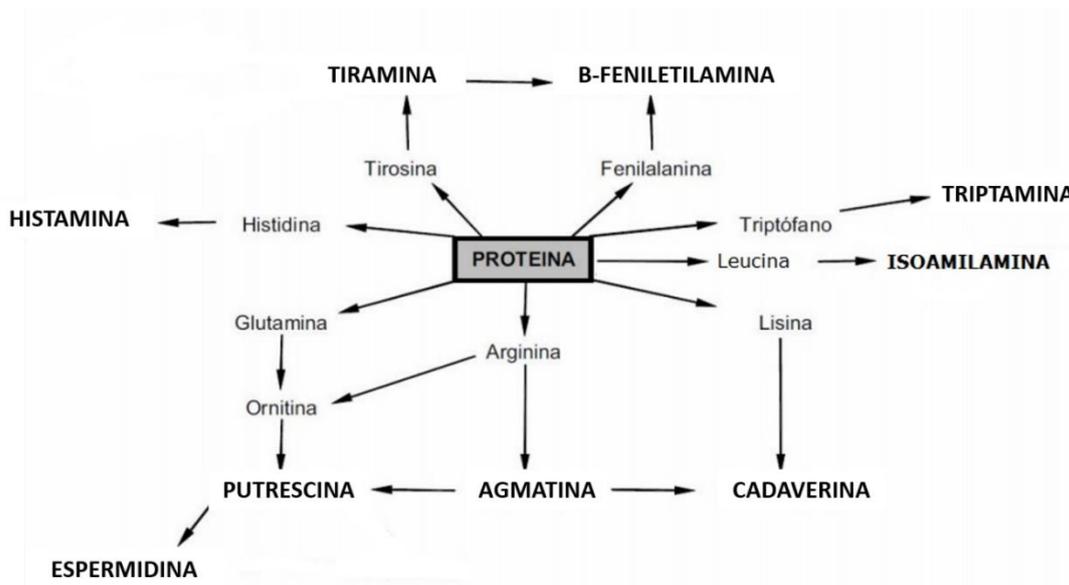
prácticas de viticultura y las técnicas de vinificación empleadas, afectan al contenido total de aminoácidos en el vino (124, 125).

Los aminoácidos son usados por las levaduras como fuente de nitrógeno. Sin embargo, la prolina puede encontrarse en altas concentraciones en los vinos debido a que las levaduras en ausencia de oxígeno no son capaces de asimilarla. Los aminoácidos también actúan como precursores de compuestos aromáticos (126), por lo que su grado de conversión en compuestos aromáticos también influirá en las concentraciones de aminoácidos en los vinos espumosos (16). Se han realizado diversos estudios sobre la evolución de la composición de los aminoácidos durante la crianza en presencia de lías. Moreno-Arribas, y col. (127) y Pozo-Bayón y col. (120), observaron un aumento en la concentración de sustancias nitrogenadas y aminoácidos durante el envejecimiento en presencia de lías. Sin embargo, otros autores han descrito una disminución en el contenido de aminoácidos durante el envejecimiento en presencia de lías (128- 130).

Los aminoácidos libres también han sido correlacionados con los parámetros de la espuma (25, 33 y 131), aunque Medina-Trujillo y col. (26) describieron que no había correlación debido a que la concentración de los aminoácidos no variaba significativamente en las diferentes fracciones de vino analizadas (espuma, vino espumoso y fracción remanente). Aún con este resultado contradictorio, sí se cree que los aminoácidos influyen en la espuma, lo que no está claro es el mecanismo por el cual los aminoácidos contribuyen a la estabilidad de la espuma (16).

En vinos tintos tranquilos elaborados con la variedad Tempranillo se han encontrado concentraciones entre 1.300 mg/L y 2.200 mg/L de aminoácidos totales (124). En el caso de los vinos espumosos, la concentración de los aminoácidos dependerá de la composición del vino base y los aminoácidos que se liberen durante la autólisis de las levaduras. A su vez, los aminoácidos pueden sufrir descarboxilaciones y originar aminas biógenas.

Las aminas biógenas son compuestos que se encuentran de forma natural en las plantas; algunas poliaminas como la putrescina pueden estar presentes en la piel de las uvas (132) y también se encuentran en diferentes productos alimentarios que han experimentado una fermentación realizada por bacterias lácticas, como el queso, la cerveza o el vino. En presencia de etanol aumenta su efecto sobre la salud debido a que se inhiben las enzimas encargadas de su detoxificación (133). Por lo general, las aminas biógenas se forman mediante reacciones enzimáticas a través de una descarboxilación de aminoácidos o por hidrólisis de sustancias nitrogenadas durante las fermentaciones o los procesos de envejecimiento y conservación de los vinos (Figura 18).



**Figura 18.** Aminas biógenas y sus aminoácidos precursores

Las principales aminas biógenas que encontramos en los vinos son la histamina, putrescina, cadaverina, agmatina, espermidina, tiramina, triptamina, isoamilamina y feniletilamina. La cadaverina y putrescina se asocian con defectos aromáticos del vino. Las aminas aromáticas como la histamina, la tiramina o la feniletilamina, pueden producir dolores de cabeza, intolerancias y náuseas entre otros efectos negativos para la salud en las personas sensibles. La presencia de putrescina y cadaverina se asocia con una falta de higiene o limpieza en la bodega (132). Martínez- Lapuente y col. (129) describieron una disminución en algunas aminas biógenas durante el envejecimiento del vino en presencia de lías, al igual que ocurría con los aminoácidos.

La Unión Europea no ha establecido límites legales con respecto al contenido permitido de aminas biógenas en vinos pero hay países que han establecido límites de importación o valores recomendados de seguridad con respecto a la histamina. Francia recomienda valores por debajo de los 8 mg/L, mientras que Bélgica ha establecido el límite entre 5-6 mg/L, siendo Alemania el país más restrictivo estableciendo la concentración máxima recomendada de histamina en 2 mg/L (125, 134). España no ha establecido límites legales para las aminas biógenas, aunque debido al aumento de la preocupación de la sociedad por la salud y a que otros países emplean el contenido de aminas biógenas como barrera para las importaciones, es un tema de actualidad y los enólogos tienen como objetivo elaborar vinos con baja concentración de aminas biógenas.

## 2.4. ELABORACIÓN DE VINOS ESPUMOSOS

El término vinos espumosos abarca un gran abanico de vinos según las variedades empleadas, las regiones donde se producen y los sistemas utilizados en su elaboración, que los hacen ser muy diferentes entre ellos; aunque presentan una característica común: el origen del dióxido de carbono es natural y procede de la primera fermentación alcohólica del mosto o de la segunda fermentación que experimenta el vino base (135). Según la Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV) la definición de vino espumoso es: “vinos especiales producidos a partir de uvas, mostos o vinos procesados según técnicas aceptadas por la OIV, caracterizados, en el descorche, por la producción de una espuma más o menos persistente resultante del desprendimiento de dióxido de carbono de origen exclusivamente endógeno. La sobrepresión de este gas en la botella ha de ser de al menos 3,5 bares a 20 °C. No obstante, para botellas de una capacidad inferior a 0,25 L, la sobrepresión mínima se reduce a 3 bares a 20 °C” (136).

La tradición atribuye la invención del vino espumoso al fraile benedictino Don Perignon (1638-1715). Sin embargo, en el siglo XIV ya había referencias escritas sobre vinos espumosos de la pluma del teólogo franciscano Francesc Eiximenis (Girona 1327/32- Perpiñán 1409). El descriptor organoléptico utilizado en uno de sus tratados (*Lo Crestià*) nos induce a pensar en la presencia de carbónico en el vino. Varios siglos antes, el poeta romano Publio Virgilio Marón (70-19 a. C.) ya conocía los vinos espumosos. Ambos autores describen unos vinos que producían un cosquilleo en el paladar y una sensación de frescor en boca, pero parece que su obtención era fruto del azar (137). Los vinos espumosos deben gran parte de su desarrollo a los avances técnicos producidos en los elementos que se emplean para la conservación de la espuma, el corcho y el vidrio. La introducción de los cierres de corcho y las mejoras en la elaboración de vidrio, haciendo a este más resistente a altas presiones, fueron claves para poder desarrollar los vinos espumosos (138).

La legislación española reglamenta los vinos espumosos naturales y los vinos gasificados según la Orden del 27 de Julio de 1972 (B.O.E. de 8 de Agosto de 1972), por la que los define de la siguiente manera: “*son aquellos vinos procedentes de uvas de variedades adecuadas, que contienen, como consecuencia de su especial elaboración, gas carbónico de origen endógeno y que al ser descorchada la botella y escanciado el vino forma espuma de sensible persistencia, seguida de un desprendimiento continuo de burbujas. El gas carbónico procederá de una segunda fermentación, realizada en envase herméticamente cerrado, de azúcares naturales del*

*vino base o añadidos y el producto terminado tendrá una presión mínima de cuatro atmósferas a 20 °C*.

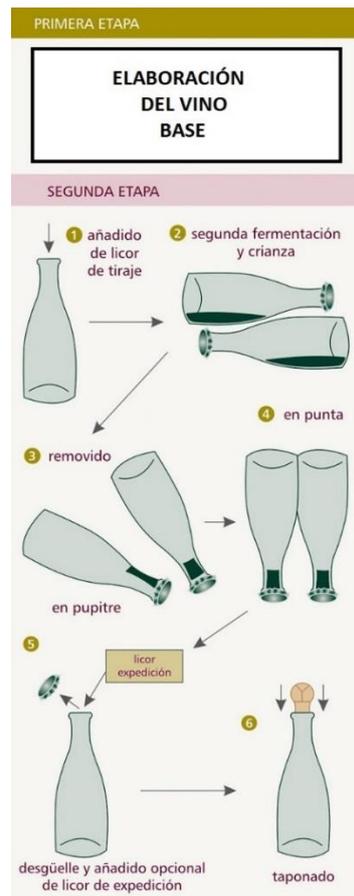
Dentro de los vinos espumosos naturales se distinguen en España cuatro tipos: *Cava*, *Vino Espumoso Natural*, *Fermentación en Botella* o *método Transfer*, y *Grandes Envases* o *Granvás*. Los dos primeros se caracterizan por su elaboración mediante el método tradicional, también conocido como *champenoise* y se diferencian por pertenecer el primero a la D.O. Cava, mientras que el segundo no pertenece a dicha denominación. Estos vinos desarrollan el proceso de elaboración y crianza, desde la segunda fermentación hasta la eliminación de las lías inclusive, en la misma botella en la que se ha realizado el tiraje, siendo el tiempo mínimo de permanencia del vino con las lías de nueve meses. Los vinos espumosos de *granvás* se elaboran en grandes envases o depósitos de cierre hermético donde realizan la segunda fermentación y los vinos espumosos de *fermentación en botella* son un híbrido de ambos sistemas (135). Culbert y col. (131) estudiaron cómo influye el método de elaboración en la composición química de los vinos y las propiedades de la espuma y determinaron que los vinos espumosos naturales elaborados por el método tradicional presentaron un contenido mayor de alcohol y proteínas, así como un contenido de compuestos fenólicos totales menor, pero mostraron buena estabilidad de espuma con respecto a los otros vinos estudiados elaborados por los métodos *transfer*, *charmat* y gasificación (vinos espumosos no naturales).

Los vinos espumosos se clasifican en función de su riqueza en azúcares como (136):

- ✓ Brut, cuando tiene como máximo 12 g/L de azúcar, con una tolerancia de + 3 g/L.
- ✓ Extraseco, cuando contiene entre 12 y 17 g/L con una tolerancia de + 3 g/L.
- ✓ Seco, cuando contiene entre 17 y 32 g/L con una tolerancia de + 3 g/L.
- ✓ Semisecco o semidulce, de 32 a 50 g/L de materias reductoras.
- ✓ Dulce, superior a 50 g/L de materias reductoras.

Según lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 607/2009, son vinos espumosos *brut nature* aquellos cuyo contenido en azúcar es inferior a 3 g/L y no se le ha añadido azúcar después de la segunda fermentación.

La elaboración de los vinos espumosos por el método tradicional se realiza dentro de las botellas como único envase, desarrollándose sucesivamente tras la elaboración del vino base, las siguientes fases: tiraje, rima, punta, y degüelle. El esquema de elaboración se muestra en la Figura 19.



**Figura 19.** Esquema del proceso de elaboración de los vinos espumoso mediante el método tradicional o *Champenoise*. Adaptado de García-Gallego (139)

### 2.4.1. Elaboración del vino base tinto

El vino base debe tener una graduación alcohólica moderada que permita una adecuada toma de espuma y una acidez relativamente elevada para que el vino tenga una buena sensación de frescura en boca. Al tratarse de vinos espumosos tintos, el vino base deberá tener además una buena intensidad de color. Nos encontramos entonces con un dilema; si queremos que el vino base tinto tenga una graduación alcohólica entre 10 y 12 % vol., debemos cosechar las uvas cuando alcancen la madurez de la pulpa pero antes de que hayan alcanzado la madurez fenólica adecuada. Esto producirá vinos con poco color, poco estructurados y que serán amargos y astringentes en boca ya que la uva poseerá una menor concentración de antocianos que serán difíciles de extraer debido a la mayor rigidez de la baya y a que el tanino del hollejo no habrá alcanzado el grado de madurez deseado.

Para solventar estas dificultades, en esta tesis se estudian distintas técnicas enológicas, que se describen en el apartado 2.5, para la elaboración de vinos base tintos adecuados.

Los vinos base tintos deberán estar perfectamente limpios y estabilizados frente a las precipitaciones tartáricas y/o de materia colorante antes de ser introducidos en la botella con el licor de tiraje (140), ya que una vez en botella junto al licor de tiraje no se harán más tratamientos. El vino base tinto deberá de tener las siguientes características analíticas (características referidas para vinos base espumosos blancos y rosados (135), no se han encontrado definidos los límites para la producción de vinos base tintos):

- ✓ Graduación alcohólica: 9,5-11,5 % vol.
- ✓ Acidez total (en ácido sulfúrico): 3,5-6 g/L.
- ✓ Extracto seco no reductor: 12,5-20 g/L.
- ✓ Acidez volátil real (en ácido acético) < 0,7 g/L.
- ✓ SO<sub>2</sub> libre < 20 mg/L.
- ✓ SO<sub>2</sub> total < 170 mg/L.

### 2.4.2. Tiraje

La fase de tiraje comprende tanto la preparación del “vino de tiraje” como su embotellado y taponado. El vino de tiraje se prepara llenando la botella con el vino base y el licor de tiraje, que es una disolución formada por levaduras y sacarosa en proporción adecuada para que la segunda fermentación produzca la presión de dióxido de carbono deseada. Las especies de levaduras que se emplean habitualmente en la segunda fermentación son *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces bayanus*. Deben ser cepas que presenten una serie de características como actividad fermentativa a baja temperatura, resistencia al etanol y a la presión de CO<sub>2</sub>, capacidad floculante y capacidad autolítica entre otras (135, 141). Junto al azúcar y las levaduras se suele añadir una pequeña cantidad de bentonita con el objetivo de facilitar la floculación de las levaduras para su posterior eliminación. Esta cantidad debe ser pequeña puesto que la bentonita puede afectar a la capacidad espumante de los vinos espumosos, así como reducir su calidad sensorial (140, 142). Posteriormente las botellas son cerradas con un tapón corona temporal de acero inoxidable.

### 2.4.3. Rima

Terminado el tiraje las botellas son trasladadas a los locales de crianza llamados cavas. En dichos espacios se controla la temperatura y humedad relativa y las botellas se colocan en posición horizontal. Durante esta etapa se produce la segunda fermentación, toma de espuma

y crianza (envejecimiento sobre lías). Tras la segunda fermentación, las levaduras se depositan en el fondo de la botella y comienza la etapa de crianza sobre lías. La legislación española establece que un vino espumoso debe permanecer en presencia de las lías, desde el momento del tiraje hasta el degüelle, como mínimo nueve meses (135). Las lías empleadas para crianza de un vino tranquilo se componen de sales de ácido tartárico, residuos orgánicos y células de diversas especies de levaduras y bacterias. Sin embargo, las lías que se emplean para la crianza de un vino espumoso están compuestas principalmente de células de una sola especie de levadura y de los coadyuvantes tecnológicos empleados que ayudan a flocular y eliminar las lías al final del envejecimiento (140). En esta etapa se produce la autólisis de las levaduras y las lías pueden adsorber o liberar polifenoles como ésteres hidroxicinámicos, antocianos y taninos, que pueden modificar el perfil fenólico y la capacidad antioxidante de los vinos espumosos durante el envejecimiento (143).

### **2.4.4. Punta o pupitre**

Para eliminar las lías procedentes de la segunda fermentación, las botellas se someten a un proceso de removido con el objetivo de que todo el sedimento se dirija al cuello de la botella. Tradicionalmente las botellas se colocaban en pupitres tras la rima. Antiguamente, cada día se giraban manualmente un octavo de vuelta y poco a poco se colocaban en posición vertical e invertida. Tras 24 días, las botellas han dado 3 giros y las lías se encuentran en el gollete, quedando el vino limpio y transparente. Hoy en día esta etapa se realiza con sistemas más o menos automatizados que consiguen la sedimentación de un gran número de botellas a la vez (135).

### **2.4.5. Degüelle**

Es la operación que elimina las lías depositadas en el cuello de la botella. De forma tradicional se ha realizado con la técnica denominada “al vuelo” en la cual, el tapón es retirado mediante una pinza y se realiza un movimiento rápido hacia la vertical para eliminar las lías. En la actualidad, este depósito se elimina congelando el cuello de la botella al introducirla en una solución de agua y anticongelante que está a 20 o 25 °C bajo cero. A continuación, se pone la botella en posición vertical, se quita el tapón y por la propia presión interna las levaduras congeladas, junto con algo de vino, se expulsan. Tras el degüelle el vino debe quedar perfectamente brillante, sin presencia de sedimento. Durante esta operación se pueden

producir pérdidas de vino, las cuales se compensan con la adición, hasta restablecer el volumen inicial, del licor de expedición. Dicho licor de expedición no puede aumentar el grado alcohólico en más de 0,5 % vol., y su composición varía en función del tipo de vino espumoso que queramos elaborar. El licor de expedición puede ser el propio vino espumoso o bien una disolución de sacarosa, mosto de uva, vino base o una mezcla de dichos productos, con adición en su caso de destilados de vino, etc. Con esta adición se suavizan los vinos y se da el grado de dulzor deseado. Si se emplean levaduras inmovilizadas se facilita el degüelle, obteniéndose ventajas técnicas y económicas e incluso mejoras en la calidad aromática de los espumosos (144). Por último, se cierra la botella con el tapón definitivo, que debe ser capaz de aguantar la presión interior, el cual se sujeta al cuello de ésta con el bozal o morrión de alambre (135).

#### **2.4.6. Envejecimiento en botella en ausencia de lías**

Los vinos espumosos pueden ser envejecidos en la botella durante meses o incluso durante años antes de su consumo. Durante la crianza en presencia de lías, los vinos espumosos se encuentran en un medio desprovisto de oxígeno. En el degüelle se produce un cambio brusco, modificándose el ambiente reductor y subiendo potencial redox. Tras el taponado definitivo dentro de la botella hay una sobresaturación de CO<sub>2</sub> con un ambiente de falta de oxígeno, con el tiempo se va restableciendo el anterior equilibrio de estado redox aunque sin alcanzar del todo los niveles previos al degüelle. Este cambio sufrido por los espumosos altera sus características organolépticas (145), pudiéndose producir defectos debido a fenómenos de oxidación y/o reducción. La cantidad de oxígeno que entra en contacto con el vino es pequeña pero permitirá una lenta oxidación que dotará al vino de una redondez mayor. Estos vinos mantendrán su acidez pero desarrollarán aromas terciarios con notas de mermeladas, miel y flores secas así como de corteza de pan y frutos secos. El mantenimiento de la efervescencia dependerá de la capacidad de sellado del corcho y su permeabilidad. Pérez-Magariño y col. (119) observaron que el envejecimiento en ausencia de lías no redujo las características espumantes de los vinos espumosos blancos y rosados en el periodo de tiempo estudiado. En los vinos espumosos blancos se han descrito fenómenos de pardeamiento afectando negativamente al color (146). Un estudio previo analiza cómo afecta el período de envejecimiento sin lías a los vinos espumosos rosados, ya que sería una etapa problemática para estos vinos debido a que son fotosensibles y pueden degradarse con el paso del tiempo, y concluyen que las condiciones de almacenamiento adecuadas para preservar las características cromáticas y el perfil sensorial de estos vinos son 5 °C y en oscuridad (147). Sin embargo, existen escasas referencias sobre cómo afecta la crianza en ausencia de lías a los vinos espumosos tintos.

A continuación, se describen las características analíticas definidas para los vinos espumosos blancos terminada su elaboración, ya que no existen referencias de las características analíticas para vinos espumosos tintos.

- ✓ Graduación alcohólica: 10,8-12,8 % vol.
- ✓ Acidez total (en ácido sulfúrico): 3,5-6 g/L.
- ✓ Extracto seco no reductor: 12-20 g/L.
- ✓ Acidez volátil real (en ácido acético) < 0,8 g/L.
- ✓ SO<sub>2</sub> libre < 20 mg/L.
- ✓ SO<sub>2</sub> total < 170 mg/L.
- ✓ Presión de CO<sub>2</sub> (a 20 °C) > 4 atm.

## 2.5. TÉCNICAS ENOLÓGICAS PARA LA ELABORACIÓN DEL VINO BASE

La dificultad para elaborar vinos espumosos tintos de calidad se encuentra en la elaboración de un vino base tinto con las características adecuadas. Los vinos base tintos deberán tener una graduación alcohólica moderada, una elevada acidez, una buena intensidad de color, ser estructurados y equilibrados en boca y presentar un tanino suave. Para conseguir esto los enólogos pueden seguir dos estrategias: i) elaborar vinos base a partir de uvas pre-maduras y emplear técnicas enológicas que mejoren la calidad de los vinos; ii) elaborar los vinos base a partir de uvas vendimiadas en su estado óptimo de madurez de la pulpa y emplear técnicas que ayuden a la reducción del contenido alcohólico en los vinos.

En esta tesis se estudian las siguientes técnicas: i) grado de madurez de las uvas; ii) maceración pre-fermentativa en frío con hielo seco; iii) *délestage* con eliminación parcial de semillas; iv) reducción del contenido de azúcares del mosto mediante nanofiltración; v) desalcoholización parcial del vino base mediante ósmosis reversa; vi) maceración carbónica y vii) vinificación tradicional en tinto con adición de enzimas pectolíticas. Las peculiaridades de cada técnica se describen a continuación.

### 2.5.1. Técnicas empleadas con uvas pre-maduras

La uva que no ha alcanzado la madurez de la pulpa posee una concentración menor de antocianos y estos son de difícil extracción debido a la rigidez de la pared celular del hollejo. Además, la vendimia pre-madura presenta una gran concentración de taninos verdes que tendrán un carácter astringente y herbáceo. Para evitar estos inconvenientes sería adecuado

emplear técnicas que mejoren la extracción de antocianos para obtener vinos con una buena capa de color y a la vez evitar la extracción de los taninos más astringentes de los hollejos y las pepitas. Las técnicas enológicas estudiadas en esta tesis para llevar a cabo la elaboración de vinos base con uvas pre-maduras fueron: i) maceración pre-fermentativa en frío; ii) *délestage*; iii) maceración carbónica y iv) adición de enzimas pectolíticas.

### **2.5.1.1. Maceración pre-fermentativa en frío**

La maceración previa a la fermentación, maceración en frío, es una herramienta que se ha utilizado tradicionalmente en la elaboración de vinos aromáticos blancos. En los últimos años se utiliza también para aumentar la complejidad, el color y la estabilidad del color de los vinos tintos. En ausencia de alcohol se extraen compuestos solubles en medio acuoso y se forman uniones entre las antocianidinas y otros fenoles que favorecen la estabilización del color del vino resultante. La maceración en frío puede darse en condiciones aeróbicas, donde se aumenta la polimerización de los fenoles, y se realiza a bajas temperaturas para evitar que comience la fermentación (148); o en condiciones anaeróbicas si empleamos nieve carbónica como refrigerante. Al añadir la nieve carbónica se evita la actividad microbiana por el descenso de la temperatura y se inhibe la acción de las enzimas polifenoxidasas. El uso de CO<sub>2</sub> sólido produce una mayor extracción de antocianos, taninos y color en general, que se atribuye a la suma del efecto extractivo y protector del CO<sub>2</sub> que desplaza al oxígeno tras su sublimación (149- 151).

Dicha técnica, también conocida como “cold soak”, es una técnica de maceración basada en permitir el contacto de hollejos, semillas y mosto antes del inicio de la fermentación alcohólica en un medio no alcohólico, y que se realiza a baja temperatura para retrasar el inicio de la fermentación (152). Además de la extracción de antocianos, esta técnica influye en los flavan-3-oles, en las proantocianidinas y en los flavonoles, así como en los compuestos aromáticos libres y glicosilados (151, 153- 155). Los flavonoles, al igual que los antocianos, se encuentran en las vacuolas de la uva y siguen un patrón de extracción similar a los antocianos pero de manera más lenta debido a su polaridad; por el contrario, la extracción de los taninos de las semillas necesita tiempos de maceración más largos y la presencia de etanol en el medio (152).

Actualmente la maceración pre-fermentativa en frío está siendo ampliamente utilizada. En función de la intensidad que se quiera aplicar, variará su duración y la temperatura a la que se lleva a cabo (153).

En las elaboraciones realizadas en esta tesis se emplearon pellets de CO<sub>2</sub>. El choque térmico que experimentan las bayas al distribuir la nieve carbónica de manera homogénea en

los depósitos provoca la formación de cristales de hielo dentro de las uvas y ayuda a la ruptura de las paredes y membranas celulares (156). Al sublimar el CO<sub>2</sub> se desplaza el oxígeno contribuyendo a la protección de los aromas y antocianos frente a la oxidación. Asimismo, parece ser una técnica más efectiva en vendimias verdes ya que cuando se ha alcanzado un cierto grado de madurez pierde parte de su efectividad a nivel de extracción de color (150, 153).

La aplicación de esta técnica durante los últimos veinte años ha producido resultados contradictorios debido a que su efectividad depende de factores como la variedad de la uva, su estado de madurez, la añada, la temperatura y la duración de la maceración, la levadura empleada o el tipo de refrigeración. González-Neves y col. (157) estudiaron esta técnica en 4 vendimias distintas obteniendo resultados diversos. Puertas y col., (149) Gil-Muñoz y col. (158), Gordillo y col. (159) y Wang y col. (160) observaron un efecto positivo sobre la composición fenólica y el color de los vinos, mientras que Soto-Vázquez y col. (52); González-Neves y col. (161) y Lukić y col. (45) obtuvieron vinos con un menor contenido de antocianos monómeros y no observaron una mejora significativa en el color de los vinos con respecto a los vinos control. Pocos estudios han evaluado la influencia de la maceración pre-fermentativa sobre el contenido de aminoácidos y aminor biógenas. Smit y col. (162) describieron un aumento de los aminoácidos precursores y las aminor biogénas en el momento de la aplicación del tratamiento, pero en los vinos terminados el contenido de aminor fue el más bajo respecto al resto de tratamientos analizados en ese estudio. Álvarez y col. (153), Moreno-Pérez, y col. (163), Cai y col. (164) y Aleixandre- Tudó y col. (155) estudiaron el efecto de la maceración pre-fermentativa en frío con diferentes condiciones en la composición volátil de los vinos. Observaron en general una mejora en los compuestos aromáticos y describieron un aumento en la concentración de los ésteres y en los aromas frutales, florales y las notas de caramelo. En función del tipo de fermentador, la temperatura y el sistema refrigerante, o incluso de la variedad de la uva empleada, los resultados sobre otros compuestos aromáticos fueron algo diferentes. Lukić y col. (45) observaron una mejora en los niveles de ésteres afrutados, una mayor concentración de acetaldehído y de compuestos C<sub>6</sub>. Jagatić Korenika y col. (165) en su estudio sobre vinos blancos elaborados a partir de variedades nativas croatas, observaron una mejora en el contenido de compuestos fenólicos totales y flavan-3-oles, y sugirieron que esta técnica podría emplearse para mejorar las características varietales de los vinos.

#### **2.5.1.2. Délestage**

Está técnica, que fue desarrollada en la zona “Côte du Rhône” de Francia, consiste en extraer de un depósito de fermentación la totalidad del mosto-vino que contiene, dejando los

hollejos prácticamente secos en el interior del depósito por un periodo de tiempo prudencial para que la acidez volátil no aumente demasiado. A continuación, se vuelve a encubar el mosto-vino en el mismo depósito vertiéndolo por la boca del mismo. Con esta técnica se consigue activar la maceración, no sólo por el movimiento de los hollejos y su aplastamiento contra el fondo del depósito, sino también debido al calentamiento que experimenta el sombrero, que aumentará la extracción de polifenoles pero sin alterar la cinética de la fermentación alcohólica. Además, con esta técnica se consigue la aireación del mosto-vino, lo que favorece la multiplicación de las levaduras y acelera el desarrollo de la fermentación. Se recomienda llevar a cabo uno o dos *délestages* al día durante el segundo y tercer día de fermentación. Con el *délestage* se consigue también la eliminación parcial de semillas ya que se separan del sombrero, depositándose en el fondo del depósito receptor del mosto-vino (135). Este uso como técnica de eliminación de semillas permite trabajar con uva pre-madura, dando lugar a un vino con mayor volumen en boca pero menor astringencia, amargor y sequedad (58).

Canals y col. (166) estudiaron la aplicación del *délestage* de tres formas distintas: i) *délestage*, ii) *délestage* con eliminación de semillas y iii) *délestage* con adición de semillas. El tratamiento del *délestage* sin eliminación de semillas aumentó la intensidad colorante, los antocianos libres y las proantocianidinas. Por ello, si la uva no está lo suficientemente madura existe un riesgo al aplicar el *délestage* sin eliminación de semillas. El *délestage* acompañado de la eliminación de semillas es una buena técnica para reducir la astringencia de los vinos pero se debe tener en cuenta que también afecta al color del vino, ya que se observó una disminución de la intensidad colorante, del contenido de antocianos libres y de las proantocianidinas. El *délestage* con adición de semillas produjo un incremento en el contenido de antocianos libres, y un menor grado medio de polimerización de las proantocianidinas.

Puertas y col. (149) observaron un incremento en el color de los vinos elaborados mediante *délestage*, y tras 4 meses de envejecimiento en botella, el vino elaborado mediante *délestage* mostró un mayor contenido de antocianos totales. Baiano y col. (167) también observaron que los vinos elaborados por *délestage*, tras un año de envejecimiento, tenían un contenido superior en antocianidinas totales y proantocianidinas respecto al vino elaborado por vinificación tradicional. Sin embargo, Soto-Vázquez y col. (52) describieron que este tratamiento produjo vinos con una menor intensidad de color, un contenido de antocianinas y proantocianidinas totales similar al vino control y un contenido menor de quercetina y kaempferol. No se han encontrado artículos científicos que analicen el efecto de esta técnica en el contenido de aminoácidos, aminas biógenas y compuestos aromáticos.

### 2.5.1.3. Maceración carbónica

La maceración carbónica es una técnica que implica la capacidad de la uva para evolucionar rápidamente desde un metabolismo respiratorio a un metabolismo de tipo fermentativo cuando los racimos se colocan en una atmósfera extremadamente pobre en oxígeno y enriquecida con dióxido de carbono (Figura 20). En la maceración carbónica, las uvas enteras son fermentadas en una atmósfera de dióxido de carbono antes de que sean estrujadas y despalladas. La vinificación tradicional emplea uva estrujada de tal forma que se mezclen los azúcares con las levaduras y tras la fermentación alcohólica se obtiene el vino. La maceración carbónica hace que la baya fermente con el mosto del interior de la baya y que los vinos obtenidos tengan sabores más afrutados y con menos contenidos de taninos. Este tipo de vinificación, que se estudió por primera vez en 1934, se realiza en dos etapas claramente diferenciadas, aunque en la práctica se solapan:

- En la primera etapa, también denominada fermentación intracelular o metabolismo anaerobio de los racimos, los racimos íntegros se sitúan en una atmósfera saturada de CO<sub>2</sub>.
- En la segunda etapa se produce fermentación alcohólica de los mostos procedentes de la etapa anterior.

Durante la primera etapa de la maceración carbónica se producen tres fenómenos: i) metabolismo anaeróbico de la baya; ii) intercambio mediante difusión entre la baya, la atmósfera y el mosto que se origina por el aplastamiento de las bayas; iii) fermentación alcohólica con levaduras.

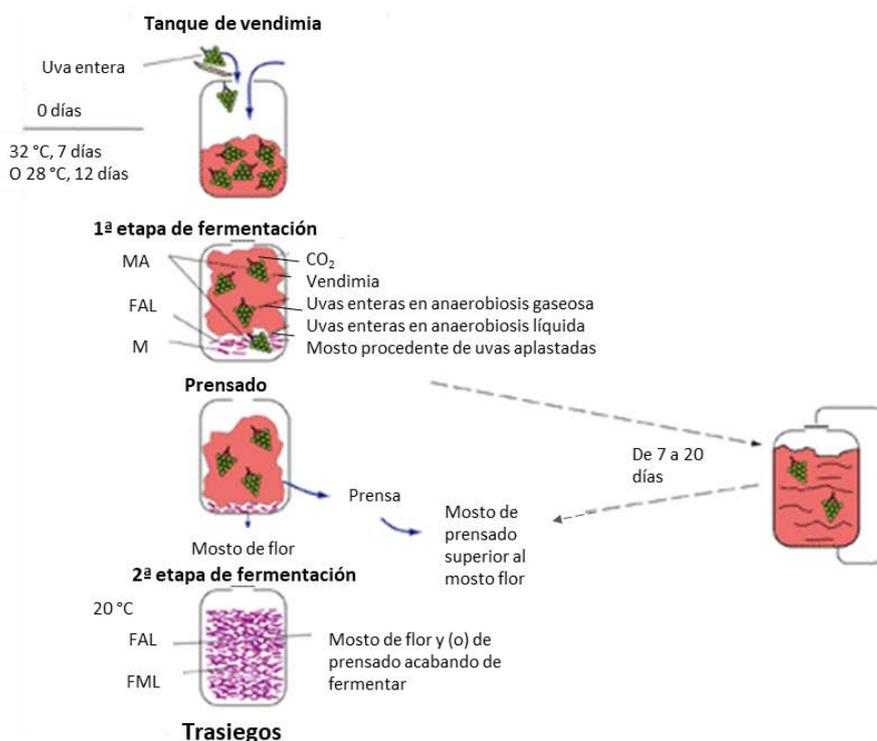
La fermentación alcohólica con levaduras comienza en la primera etapa en aquellas uvas que comienzan a romperse y generan mosto, y continúa en la segunda etapa con el mosto obtenido del prensado de las uvas.

La temperatura es un parámetro clave en la maceración carbónica y se relaciona de manera inversamente proporcional con la duración de la primera etapa. La temperatura ideal para conducir la maceración carbónica es de 30 a 32 °C, obteniéndose vinos mejor estructurados y consiguiéndose acortar el tiempo de encubado. Si realizamos la maceración carbónica a baja temperatura, 15- 20 °C, obtendremos vinos muy finos pero con aromas inestables y poco duraderos.

- i) **Metabolismo anaeróbico de la baya de uva.** Las uvas que han mantenido su integridad evolucionan rápidamente hacia la maceración carbónica cuando se introducen en una atmósfera pobre en oxígeno (< 1 %). Durante este período se producen distintas actividades enzimáticas; en primer lugar, el ácido málico que contienen las uvas es

transformado en ácido pirúvico por la enzima málica. A continuación, debido a la acción de la enzima descarboxilasa, el ácido pirúvico pierde otro carbono formándose acetaldehído o etanal, que finalmente se transforma en etanol por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa. Durante este proceso se desprende  $\text{CO}_2$  con cada descarboxilación. La siguiente actividad enzimática es la que se produce sobre las paredes celulares de los tejidos vegetales de la vendimia y es inducida por las enzimas pectolíticas naturales que contiene. Por último, las enzimas proteolíticas hidrolizan las proteínas de la uva en aminoácidos más simples.

Por tanto, como consecuencia del metabolismo anaerobio de la uva se producen pequeñas cantidades de etanol (1,5- 2 %),  $\text{CO}_2$  y subproductos derivados del ácido pirúvico. El ácido tartárico no se degrada en este proceso pero se producen cambios en el nitrógeno de la uva, incrementándose la concentración de la mayoría de aminoácidos. Los vinos de maceración carbónica se caracterizan por su potencia y calidad aromática, y poseen caracteres sensoriales de juventud que recuerdan a frutas como son la cereza, fresa, frambuesa o plátano y que se suman a los aromas varietales de la variedad empleada. Una relación elevada de succinato de etilo/ $\gamma$ -butirolactona podría ser característica de la maceración carbónica (135).



**Figura 20.** Esquema de vinificación por maceración carbónica. Adaptado de Flanzy y col. (168)

MA: metabolismo anaeróbico de la uva; FAL: fermentación alcohólica; FML: fermentación maloláctica; M: maceración

- ii) **Intercambios por difusión.** En la primera etapa coexisten en el mismo depósito uvas enteras que están realizando el metabolismo anaerobio, mosto que se genera a partir de las uvas aplastadas durante el encubado y una atmósfera rica en CO<sub>2</sub>. Los intercambios se producen por tanto entre la baya, la atmósfera gaseosa y el mosto del fondo del depósito. El metabolismo anaeróbico modifica la composición del mosto. El anhídrido carbónico de la atmósfera es absorbido por la vendimia durante las primeras horas de maceración. Casi paralelamente, las uvas comienzan a desprenderlo hacia la atmósfera procedente del metabolismo del ácido málico. En el transcurso de la primera etapa de fermentación, las levaduras reaccionan en un medio que se incrementa volumétricamente y que tiene una composición variable. La variación de la composición se debe a la acción de microorganismos y a la continua adición de mosto procedente de las uvas que se van aplastando. Las uvas que no están sumergidas en el mosto pueden absorber compuestos volátiles por la difusión que ha producido la levadura durante la fermentación.
- iii) **Fermentación alcohólica con levaduras o segunda fermentación.** Comienza durante la primera etapa en el mosto que se va generando por el aplastamiento de las uvas durante el encubado. Durante este proceso existe el riesgo de que se desarrollen simultáneamente las bacterias lácticas. Esta segunda fermentación se produce, habitualmente, de manera rápida debido a que las levaduras se encuentran en un medio rico en azúcares.

Los vinos de maceración carbónica se caracterizan por su riqueza en aromas, suavidad y equilibrio armonioso. La profundidad del color y la sensación tánica de los vinos va a depender fuertemente de la duración y la temperatura que apliquemos (168, 169). Existen un gran número de estudios sobre cómo afecta la maceración carbónica a la composición de los vinos y a sus características sensoriales; en ocasiones, con resultados algo diversos por las condiciones de aplicación de la técnica. Geffroy y col. (49) observaron que el vino elaborado mediante maceración carbónica (30 °C durante 8 días) mostró un valor de IPT comparable al vino control. Pace y col. (170) estudiaron la extracción de los antocianos en la maceración carbónica a partir de uvas de distinto estado de madurez. Las uvas más maduras liberaron una cantidad superior de antocianinas. Gómez-Míguez & Heredia (171) y Spranger y col. (172) describieron concentraciones menores de polifenoles totales y vinos menos saturados o con menor intensidad colorante en vinos elaborados por maceración carbónica. También describieron que los vinos de maceración carbónica poseían menor concentración de 1-hexanol, 2- feniletanol, dietil succinato y dietil malato, pero mayores concentraciones de alcohol benzílico y etil lactato que los vinos que fermentaron con los hollejos. Castillo-Sánchez y col. (173) mostraron que los vinos de maceración carbónica tras 26 meses de embotellado sufrieron menor degradación del

color respecto a los otros tratamientos que estudiaron. Dourtoglou y col. (174) describieron un aumento en las concentraciones de los aminoácidos GABA, L-glicina, y en general, de los aminoácidos ácidos a excepción del ácido glutámico en las uvas tras su almacenamiento en atmósfera de CO<sub>2</sub>.

#### **2.5.1.4. Tratamiento con enzimas pectolíticas**

El tratamiento con enzimas pectolíticas es una técnica que se emplea en las bodegas desde los años 50 tanto para mejorar el rendimiento del mosto como en procesos de clarificación, rompiendo las pectinas que dan la estructura firme a la baya (175). Las enzimas se emplean para acortar el tiempo de maceración con los hollejos, consiguiendo así un aumento en el color y una baja extracción de taninos. Sin embargo, no todos los preparados enzimáticos producen los mismos resultados. Su idoneidad para la extracción depende de la capacidad de las enzimas para “aflojar” la estructura de la lámina media de las células. La protopectina es parte de la red tridimensional de hemicelulosa rica en residuos de ácido galacturónico (148). Las enzimas comerciales se producen generalmente a partir del hongo *Aspergillus niger*. Sin embargo, las preparaciones enzimáticas comerciales son muy diversas, es decir, presentan diferentes actividades y distinto nivel de actividad. Las principales actividades pectinasas son poligalacturonasa (PG), pectin-esterasa (PE) y pectin-liasa (PL); estas actividades se encargan de degradar las cadenas de homogalacturonano de las sustancias pécticas de la pared celular. La actividad PL es despolimerizante, corta la cadena de pectina entre dos ácidos galacturónicos metilados mientras que la actividad PG actúa sobre los ácidos galacturónicos no metilados. La actividad PE no despolimeriza la cadena de pectina sino que actúa sobre el grupo metil de los ácidos galacturónicos esterificados. Además, es muy común que los preparados enzimáticos comerciales presenten actividades secundarias que refuerzan la acción de las pectinasas como son las actividades hemicelulasa y celulasa, proteasa,  $\beta$ -glucanasa y glicosidasa entre otras. La actividad  $\beta$ -glucosidasa es capaz de hidrolizar los heterósidos y liberar en el caso de los precursores de aromas varietales terpenoles, norisoprenoides y fenoles volátiles (135). Por tanto, los preparados enzimáticos comerciales debilitan las paredes celulares del hollejo y de la pulpa, favoreciendo la liberación de sus compuestos. La adición de enzimas debería facilitar la extracción de los taninos más suaves así como de los antocianos solubles, precursores aromáticos y polisacáridos. El uso de enzimas pectolíticas está especialmente indicado para la uva madura ya que la uva verde posee una capa de células voluminosas de pulpa que dificulta la extracción de los antocianos por la cara interna de la piel al inicio de la fermentación (58).

El efecto de las enzimas de maceración sobre los polifenoles y el color de los vinos tintos ha sido ampliamente estudiado en vinos tintos elaborados con diferentes variedades, aunque con resultados contradictorios. Se ha descrito una mejora en el color de los vinos, aunque el efecto sobre los compuestos polifenólicos difiere según autores. Sacchi y col. (44), describieron que las enzimas pectinasas parecen no mejorar la extracción de antocianos pero si la de otros compuestos fenólicos como los taninos. El estudio realizado por Geffroy y col. (49) no mostró efecto significativo en los polifenoles totales respecto al control, mientras que Borazan & Bozan (176) describieron una disminución en el contenido de flavan-3-oles monómeros en los vinos tratados con enzimas y los antocianos monómeros extraídos no aumentaron. Revilla & González-SanJosé (177) y Guadalupe y col. (47) describieron una mejora en el color de los vinos. Romero-Cascales y col. (178) y Gil-Muñoz y col. (158), además de la mejora en el color, observaron mayor contenido de taninos y polifenoles totales en los vinos tratados con enzimas. Además, algunos autores (178, 179) comprobaron que estas mejoras se mantenían con el tiempo en el vino embotellado. Ducasse y col. (180) y Busse- Valverde y col. (181) demostraron que los taninos que se extraen con las enzimas de maceración no provienen exclusivamente del hollejo de las uvas, sino que también proceden de las semillas, lo cual podría aumentar la astringencia de los vinos.

La adición de enzimas comerciales puede conducir además a una hidrólisis de proteínas y péptidos, lo que puede aumentar los aminoácidos libres presentes en el vino. Sin embargo, no se han encontrado artículos científicos que hayan estudiado este comportamiento. En cuanto a la producción de aminas biógenas, se ha descrito que el uso de enzimas comerciales no favorece la acumulación de aminas biógenas en los vinos (182).

### **2.5.2. Técnicas empleadas con uvas maduras**

Durante los últimos años, el cambio climático está provocando en diversas regiones vitivinícolas un cambio del ciclo vegetativo de la vid y de los patrones de madurez de la uva. Entre los cambios más importantes destaca un aumento en el contenido de azúcares de las uvas, una menor acidez y una modificación de los compuestos aromáticos varietales. La fermentación de este tipo de mostos conduce a grados alcohólicos más altos de los deseados y puede enmascarar los aromas afrutados y el sabor del vino. Si se elaboran vinos con uva pre-maduras serán vinos más ácidos y menos coloreados, ya que la madurez fenólica no se alcanza (69, 183-185). Además, las tendencias actuales a llevar una vida saludable y las restricciones legales sobre el consumo de alcohol ponen en riesgo el consumo de vino. Todo esto ha motivado que actualmente se estén investigando distintas técnicas para reducir el contenido de alcohol de los

vinos. Para reducir el contenido en alcohol se pueden utilizar estrategias vitícolas, estrategias pre-fermentativas, estrategias microbiológicas y/o el empleo de técnicas post-fermentativas (69, 186, 187).

En esta tesis se propone elaborar los vinos base tintos a partir de uvas vendimiadas una vez han alcanzado la madurez de la pulpa, y emplear metodologías que ayuden a reducir el contenido alcohólico mediante técnicas que disminuyan la graduación alcohólica de los vinos ya elaborados o el contenido de azúcares en mosto. El objetivo es reducir el grado alcohólico de los vinos base tintos, ya que experimentaran una segunda fermentación en botella que aumentará su grado alcohólico final.

A escala industrial una de las metodologías más habituales es la desalcoholización, que se basa en principios térmicos o físicos. Hoy en día, la columna de cono rotatorio y la ósmosis inversa son dos de los métodos más empleados para producir vinos con menor contenido alcohólico. La mejor tecnología para la eliminación de alcohol debe ajustarse a un control efectivo del alcohol eliminado, consumir la mínima energía posible y provocar el mínimo impacto sobre el vino. En el caso de emplear la columna de cono rotatorio hay que calentar el vino, lo que puede afectar negativamente a las propiedades sensoriales del vino (186, 187). La aplicación de las membranas hidrofóbicas es una de las técnicas más prometedoras que pueden emplearse para la eliminación del etanol y la retención de compuestos aromáticos en el vino. Los procesos de separación de membranas, que incluyen diálisis, nanofiltración, ósmosis inversa y destilación osmótica, difieren según la fuerza motriz, que puede ser el gradiente de concentración o la presión. La eliminación del alcohol por el proceso de membranas puede causar una disminución de los compuestos volátiles orgánicos, que juegan un papel importante en la aceptabilidad del vino. Esta reducción está influenciada por diversos factores, como el propio proceso, las propiedades químico-físicas de estos compuestos, la interacción con la matriz del vino, la concentración de alcohol y la afinidad con la membrana (188). El uso individual o combinado de métodos basados en membranas para el vino puede ser aplicado para (69, 189):

- ✓ elaborar vinos más equilibrados en cuanto a sus características organolépticas;
- ✓ compensar los efectos de las condiciones climáticas adversas y sus consecuencias;
- ✓ corregir defectos organolépticos particulares;
- ✓ satisfacer las expectativas de los consumidores mediante el desarrollo de nuevos productos.

Hay que tener en cuenta la normativa Europea que determina que la disminución del grado alcohólico volumétrico adquirido no puede ser superior al 2 % vol (Reglamento (CE) Nº 479/2008), ya que la eliminación del alcohol va a reducir el efecto de amargor, calidez y cuerpo del vino ya que la acidez y la astringencia disminuyen. La elección de una técnica adecuada de

desalcoholización será importante para evitar la pérdida de compuestos aromáticos así como la autenticidad de los vinos.

### 2.5.2.1. Ósmosis reversa

La ósmosis es un fenómeno por el cual dos disoluciones de distinta concentración separadas por una membrana semipermeable, tienden a igualar sus concentraciones, pasando disolvente de la más diluida a la más concentrada bajo una fuerza que es la denominada presión osmótica. La ósmosis reversa consiste en forzar las condiciones para que la ósmosis se produzca en sentido contrario, es decir, que el paso sea de la disolución más concentrada a la más diluida, teniendo que aplicar una presión superior a la osmótica y concentrando más aún la fase concentrada debido a la pérdida de disolvente a través de la membrana (69). En el caso del vino, la ósmosis reversa concentra el extracto seco y el etanol. En esta técnica se trabaja a temperaturas entre 15 y 25 °C, lo que permite mantener intacta la calidad aunque puede variar el pH, el contenido de ácido tartárico y el potasio del vino final (135). Para conseguir una reducción de la cantidad de etanol es necesario añadir un volumen de agua equivalente al eliminado durante la ósmosis reversa. Para evitar esta aportación exógena, a causa de la normativa de algunos países vitícolas, se propone fraccionar el permeado de ósmosis reversa por destilación con la finalidad de reincorporar la fase acuosa recuperada (190). Esta técnica es relativamente moderna y está comenzando a ser utilizada en la actualidad en combinación con otras, como puede ser la destilación osmótica (187). Diversos estudios analizan su potencial aplicación (191- 193).

Meillon y col. (194) evaluaron el impacto de la reducción parcial del grado alcohólico mediante ósmosis reversa en vinos de la variedad *Syrah*. Los resultados sobre el gusto en los vinos parcialmente desalcoholizados no fueron uniformes. Los vinos con mayor contenido alcohólico fueron percibidos como menos astringentes, pero más complejos, persistentes, fuertes y con muchos aromas.

Gil y col. (195) emplearon la ósmosis reversa para reducir en 1 y 2 % el contenido alcohólico de vinos del Penedès y del Priorat. Los parámetros enológicos experimentaron pequeñas variaciones y los cambios del color fueron imperceptibles a la vista. En general, la reducción del grado alcohólico no produjo grandes diferencias respecto al vino control en el contenido de antocianos, proantocianidinas y grado medio de polimerización. Estos vinos fueron analizados sensorialmente en pruebas triangulares y algunos catadores tuvieron dificultades para distinguir entre los vinos controles y los vinos desalcoholizados.

Russo y col. (187) estudiaron un proceso de desalcoholización combinando la ósmosis reversa y la destilación osmótica. Observaron que el proceso de ósmosis reversa afectó significativamente a la concentración de antocianos y fenoles totales, al pH, a la intensidad colorante y a la tonalidad. Sin embargo, el tratamiento preliminar de ósmosis reversa permitió retener una gran cantidad de compuestos volátiles. No se han encontrado artículos científicos que estudien como afecta la aplicación de la ósmosis reversa únicamente, sin combinación con otras técnicas, a la fracción volátil y al contenido de aminoácidos y aminas biógenas de vinos tintos tranquilos. Sin embargo, en combinación con otras técnicas, sí se ha observado que su aplicación afecta a la composición volátil de los vinos (186, 196 y 197).

### **2.5.2.2. Nanofiltración**

La nanofiltración es un proceso mediante el cual se hace pasar un fluido a través de una membrana semipermeable a una determinada presión. Se produce una separación basada en el tamaño molecular de los componentes del fluido. En particular, teniendo en cuenta el peso molecular de los azúcares del mosto, la nanofiltración parece ser la técnica más apropiada para controlar la concentración de azúcar en términos de retención de bajo a moderado peso molecular (69, 198). Se trata de un proceso de membrana con propiedades entre los procesos de ósmosis reversa y ultrafiltración. Es una técnica “moderna”, al igual que la ósmosis reversa, aunque su historia se remonta a la década de los 70 cuando se comenzaron a desarrollar membranas de ósmosis reversa con un flujo de agua razonable a presiones relativamente bajas. Las altas presiones usadas en la ósmosis reversa suponían un coste energético considerable, aunque la calidad del permeado obtenido era muy buena. La nanofiltración surgió de la búsqueda de membranas con menores rechazos de componentes disueltos y con mayor permeabilidad al agua. Estas membranas poseen un tamaño de poro típico de 1 nm, que se corresponde con un límite de peso molecular (MWCO) de 150-500 Da. Algunas características distintivas de la nanofiltración con respecto a la ósmosis reversa son el bajo rechazo de iones monovalentes, alto rechazo de iones divalentes y mayor flujo.

En enología, diversos estudios analizan su aplicación para reducir el grado alcohólico en vinos (192, 193, 199) o el contenido de azúcares en mosto (200-205).

García-Martín y col. (201) consiguieron obtener buenos resultados aunque los vinos filtrados mostraron una pequeña pérdida en cuanto aroma y color, y concluyeron que reducir el tiempo de filtración, aumentando el área de la membrana, podría mejorar los resultados.

Salgado y col. (204) estudiaron diferentes aplicaciones de la nanofiltración sobre mostos blancos y tintos. Además de conseguir el objetivo de obtener vinos con menor graduación

alcohólica, la evaluación sensorial y el análisis de compuestos principales mostraron que ninguna de las muestras de vino era particularmente preferida por los consumidores, ya que no hubo diferencias significativas entre el vino control y los vinos filtrados. La nanofiltración no afectó significativamente al olor y el color de los vinos tintos resultantes. No se han encontrado artículos científicos que analicen como afecta la aplicación de la nanofiltración al contenido de aminoácidos y aminor biógenas en vinos tintos tranquilos.

## 2.6. REFERENCIAS

- (1) Aspectos de la coyuntura mundial. Situación del sector en 2018. Abril de 2019. <http://www.oiv.int/public/medias/6680/es-oiv-aspectos-de-la-coyuntura-mundial-2019.pdf>
- (2) Aspectos de la coyuntura mundial. Abril de 2018. <http://www.oiv.int/public/medias/5960/aspectos-de-la-coyuntura-mundial-oiv-abril-2018.pdf>
- (3) OIV (2014). International Organization of Vine and Wine. El mercado de los vinos espumosos. <http://www.oiv.int/public/medias/95/les-vins-effervescents-es-complet.pdf>
- (4) OIV (2017). International Organization of Vine and Wine. *Statistical Report on World Vitiviniculture 2017*. <http://www.oiv.int/public/medias/5479/oiv-en-bilan-2017.pdf>
- (5) OeMV, Market Trends Nielsen. <http://www.oemv.es/esp/informe-market-trends-junio-2016-1735k.php>
- (6) Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, MAPAMA. <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-alimentacion/consumo-alimentario/>
- (7) Extraordinario Estadísticas 2016. Consumo. *La semana vitivinícola*. Nº 3475, 123-1252.
- (8) Publicación “La alimentación en España”, sector Vino y Mosto. [www.mercasa.es http://xn--alimentacionenespaa-d4b.es/ae/pdfs/Sectores/Vino%20y%20mosto.pdf](http://www.mercasa.es/xn--alimentacionenespaa-d4b.es/ae/pdfs/Sectores/Vino%20y%20mosto.pdf)
- (9) Culbert, J. A., Ristic, R., Ovington, L. A., Saliba, A. J., & Wilkinson, K. L. (2017). Influence of production method on the sensory profile and consumer acceptance of Australian sparkling white wine styles. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23, 170-178.
- (10) Zironi, R., & Tat, L. (27/07/2005). Vinos espumosos y de aguja en Italia. *ACE: Revista de enología*, [http://www.acenologia.com/ciencia71\\_03.htm](http://www.acenologia.com/ciencia71_03.htm)
- (11) Olarte, C., Pelegrín, J., & Reinares, E. (2017). Model of acceptance of a new type of beverage: application to natural sparkling red wine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15, Issue 1, e0102.
- (12) Jackson, R. S. (2009). *Análisis sensorial de vinos. Manual para profesionales*. Editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza, España.

- (13) Mafata, M., Buica, A., du Toit, W., Panzeri, V., & van Jaarsveld, F. P. (2018). The effect of grape temperature on the sensory perception of méthode cap classique wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 39, 132-140.
- (14) Gallart, M., Tomás, X., Suberbiola, G., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2004). Relationship between foam parameters obtained by the gas-sparging method and sensory evaluation of sparkling wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 127-133.
- (15) Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2012). Sparkling wines: Features and trends from tradition. *Advances in Food and Nutrition Research*, 66, 1-45.
- (16) Kemp, B., Condé, B., Jégou, S., Howell, K., Vasserot, Y., & Marchal, R. (2019). Chemical compounds and mechanisms involved in the formation and stabilization of foam in sparkling wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(13), 2072-2094.
- (17) Vanrell, G., Canals, R., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2007). Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chemistry*, 104, 148-155.
- (18) Martínez-Rodríguez, A., & Pueyo, E. (2009). Sparkling wines and yeast autolysis. En M. V. Moreno-Arribas, & M. C. Polo (Eds.), *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 61-80). New York: Springer.
- (19) Cilindre, C., Liger-Belair, G., Villaume, S., Jeandet, P., & Marchal, R. (2010). Foaming properties of various Champagne wines depending on several parameters: Grape variety, aging, protein and CO<sub>2</sub> content. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2, SI), 164-170.
- (20) McMahon, K. M., Culver, C., & Ross, C. F. (2017). The production and consumer perception of sparkling wines of different carbonation levels, *Journal of Wine Research*, 28: 2, 123-134.
- (21) Séon, T., & Liger-Belair, G. (2017). Effervescence in champagne and sparkling wines: From bubble bursting to droplet evaporation. *The European Physical Journal Special Topics*, 226, 117-156.
- (22) Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2010). Managing the quality of sparkling wines. En A. G. Reynolds (Ed.), *Managing wine quality: oenology and wine quality*, Vol. 2 (pp. 164-187). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- (23) Liger-Belair, G., Cilindre, C., Beaumont, F., Jeandet, P., & Polidori, G. (2012). Evidence for ascending bubble driven flow patterns in champagne glasses, and their impact on gaseous CO<sub>2</sub> and ethanol release under standard tasting conditions. *Bubble Science, Engineering and Technology*, 4, 35-48.

- (24) Maujean, A., Poinsaut, P., Dantan, H., Brissonnet, F., & Cossiez, E. (1990). Etude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents. II. Mise au point d'une technique de mesure de la moussabilité de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bulletin de l'O.I.V.*, 63, 405-427.
- (25) Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., & Pérez-Magariño, S. (2015). Role of major wine constituents in the foam properties of white and rosé sparkling wines. *Food Chemistry*, 174, 330-338.
- (26) Medina-Trujillo, L., Matias-Guiu, P., López-Bonillo, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2017). Physicochemical Characterization of the Foam of White and Rosé Base Wines for Sparkling Wine Production (AOC Cava). *American Journal of Enology and Viticulture*, 68, 485-495.
- (27) Condé, B. C., Fuentes, S., Caron, M., Xiao, D., Collmann, R., & Howell, K. S. (2017). Development of a robotic and computer vision method to assess foam quality in sparkling wines. *Food Control*, 71, 383–392.
- (28) Andrés-Lacueva, C., López-Tamames, E., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S., & de la Torre-Boronat, M. C. (1996). Characteristics of sparkling base wines affecting foam behavior. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 989-995.
- (29) Girbau-Solà, T., López-Tamames, E., Buján, J., & Buxaderas, S. (2002). Foam aptitude of Trepát and Monastrell red varieties in Cava elaboration. 1. Base wine characteristics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 5596-5599.
- (30) Esteruelas, M., González-Royo, E., Kontoudakis, N., Orte, A., Cantos, A., Canals, J. M., & Zamora, F. (2015). Influence of grape maturity on the foaming properties of base wines and sparkling wines (Cava). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (10), 2071–2080.
- (31) Condé, B. C., Bouchard, E., Culbert, J. A., Wilkison, K. L., Fuente, S., & Howell, K. S. (2017). Soluble Protein and Amino Acid Content Affects the Foam Quality of Sparkling Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 9110-9119.
- (32) Liu, P-H., Vrigneau, C., Salmon, T., Hoang D. A., Boulet, J-C., Jégou, S., & Marchal, R. (2018). Influence of grape berry maturity on juice and base wine composition and foaming properties of sparkling wines from the Champagne region. *Molecules*, 23, 1372.
- (33) Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Nieto, F. J., Martín-Álvarez, P. J., & Polo, M. C. (2000). Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chemistry*, 70(3), 309–317.

- (34) Girbau-Solà, T., López-Barajas, M., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2002). Foam aptitude of Trepát and Monastrell red varieties in Cava elaboration. 2. Second Fermentation and Aging. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 5600-5604.
- (35) Pérez-Magariño, S., Martínez-Lapuente, L., Bueno-Herrera, M., Ortega-Heras, M., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2015). Use of Commercial Dry Yeast Products Rich in Mannoproteins for White and Rosé Sparkling Wine Elaboration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (23), 5670–5681.
- (36) Martí-Raga, M., Martín, V., Gil, M., Sancho, M., Zamora, F., Mas, A., & Beltran, G. (2016). Contribution of yeast and base wine supplementation to sparkling wine composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(15), 4962–4972.
- (37) Vanrell, G., Cabanillas, P., Albet, S., Canals, J. M., Arola, L., & Zamora, F. (2002). Étude des composés influençant la mousse des cavas. *Revue Française d'Oenologie*, 196, 30- 36.
- (38) Gallart, M., Lopez-Tamames, E., Suberbiola, G., & Buxaderas, S. (2002). Influence of fatty acids on wine foaming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7042-7045.
- (39) Bautista-Ortín, A. B., Busse-Valverde, N., Fernández-Fernández, J. I., Gómez-Plaza, E., & Gil-Muñoz, R. (2016). The extraction kinetics of anthocyanins and proanthocyanidins from grape to wine in three different varieties. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, 50, nº2, 91-100.
- (40) Rizzolo, R. G., Guerra, C. C., Perissutti, G. E., Ben, R. L., Navroski, R., & Malgarim, M. B. (2018). Physicochemical and sensory characteristics of fine sparkling red wines produced at different maceration lengths in the south of Brazil. *Bioscience Journal*, 34(6), 37–47.
- (41) Puértolas, E., Álvarez, I., & Raso, J. (07.07.2010). Los pulsos eléctricos de alto voltaje: una alternativa para mejorar la extracción fenólica en la elaboración del vino tinto. *ACE: Revista de enología*.  
[http://www.acenologia.com/correspondencia/PEAV\\_extraccion\\_fenolica\\_tinto\\_0610.htm](http://www.acenologia.com/correspondencia/PEAV_extraccion_fenolica_tinto_0610.htm)
- (42) López-Giral, N., González-Arenzana, L., González-Ferrero, C., López, R., Santamaría P., López-Alfaro, I., & Garde-Cerdán, T. (2015). Pulsed electric field treatment to improve the phenolic compound extraction from Graciano, Tempranillo and Grenache grape varieties during two vintages. *Innovative food science and emerging technologies*, 28, 31-39.
- (43) Teusdea, A., Bandici, L., Kordiaka, R., Bandici, G., & Vicas, S. (2017). The Effect of Different Pulsed Electric Field Treatments on Producing High Quality Red Wines. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 45(2), 540-547.

- (44) Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 197-206.
- (45) Lukić, I., Budić-Leto, I., Bubola, M., Damijanić, K., & Staver, M. (2017). Pre-fermentative cold maceration, *saignée*, and various thermal treatment as options for modulating volatile aroma and phenol profiles of red wine. *Food chemistry*, 224, 251-261.
- (46) Setford, P. C., Jeffery, D. W., Grbin, P. R., & Muhlack, R. A. (2017). Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of process modelling. *Trends in food science & technology*, 69, 106-117.
- (47) Guadalupe, Z., Palacios, A., & Ayestarán, B. (2007). Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4854–4862.
- (48) Alpeza, I., Kovačević-Ganić, K., Vanzo, A., & Herjavec, S. (2017). Improved chromatic and sensory characteristics of Plavac Mali wines efficiency of maceration enzymes. *Czech Journal of Food Sciences*, 35, 236-245.
- (49) Geffroy, O., Siebert, T., Silvano, A., & Herderich, M. (2017). Impact of Winemaking Techniques on Classical Enological Parameters and Rotundone in Red Wine at the Laboratory Scale. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68(1), 141–146.
- (50) Lerno, L., Reichwage, M., Ponangi, R., Hearne, L., Block, D. E., & Oberholster, A. (2015). Effects of Cap and Overall Fermentation Temperature on Phenolic Extraction in Cabernet Sauvignon Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66, 444-453.
- (51) Alencar, N. M. M., Cazarin, C. B. B., Corrêa, L. C., Maróstica Junior, M. R., Biasoto, A. C. T., & Behrens, J. H. (2018). Influence of maceration time on phenolic compounds and antioxidant activity of the Syrah must and wine. *Journal of Food Biochemistry*, 42:e12471.
- (52) Soto-Vázquez, E., Río Segade, S., & Orriols Fernández, I. (2010). Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. *European Food Research and Technology*, 231(5), 789–802.
- (53) Bai, B., He, F., Yang, L., Chen, F., Reeves, M. J., & Li, J. (2013). Comparative study of phenolic compounds in Cabernet Sauvignon wines made in traditional and Ganimede fermenters. *Food Chemistry*, 141, 3984-3992.

- (54) de Castilhos, M. B. M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Del Bianchi, V. L., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2017). Isabel red wines produced from grape pre-drying and submerged cap winemaking: A phenolic and sensory approach. *LWT- Food Science and Technology*, 81, 58-66.
- (55) Lerno, L. A., Panprivech, S., Ponangi, R., Herane, L., Blair, T., Oberholster, A., & Block, D. E. (2018). Effect of pump-over conditions on the extraction of phenolic compounds during Cabernet Sauvignon fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 69:3, 295-301.
- (56) Zamora-Marín, F. (18-12-2013). La química del color del vino. *ACE: Revista de enología*. [http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/quimica\\_color\\_vino\\_cienc1213.htm](http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/quimica_color_vino_cienc1213.htm).
- (57) de Freitas, V., Fernandes, A., Oliveira, J., Teixeira, N., & Mateus, N. (2017). A review of the current knowledge of red wine colour. *OENO One*, 51(1).
- (58) Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. AMV Ediciones.
- (59) Heras-Roger, J., Díaz-Romero, C., & Darias-Martín, J. (2016). What gives a wine its strong red color? Main correlations affecting copigmentation. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 64, 34, 6567-6574.
- (60) Avizcuri, J-M., Sáenz-Navajas, M-P., Echávarri, J-F., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano. P. (2016). Evaluation of the impact of initial red wine composition on changes in color and anthocyanin content during bottle storage, *Food Chemistry*, 213, 123-134.
- (61) Aleixandre, J. L., & Álvarez, I. (2003). *Tecnología enológica*. Editorial síntesis.
- (62) Riu-Aumatell, M., Torrens, J., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2013). Cava (Spanish sparkling wine) aroma: composition and determination methods. En D. Muñoz-Torrero, A. Cortés, & E. L. Mariño (Eds.), *Recent advances in pharmaceutical sciences III* (pp. 45-60). Kerala: Transworld Research Network.
- (63) Ubeda, C., Kania-Zelada, I., del Barrio-Galán, R., Medel-Marabolí, M., Gil, M., & Peña-Neira, A. (2019). Study of the changes in volatile compounds, aroma and sensory attributes during the production process of sparkling wine by traditional method. *Food Research International*, 119, 554-563.
- (64) García-Estévez, I., Ramos-Pineda, A. M., & Escribano-Bailon, M. T. (2018). Interactions between wine phenolic compounds and human saliva in astringency perception. *Food Function*, 9, 1294-1309.

- (65) Quijada-Morín, N., Williams, P., Rivas-Gonzalo, J. C., Doco, T., & Escribano-Bailon, M. T. (2014). Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chemistry*, 154, 44-51.
- (66) Tempère, S., Marchal, A., Barbe, J. C., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Marullo, P., & Albertin, W. (2018). The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 3995-4007.
- (67) Laguna, L., Bartolome, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2017). Mouthfeel perception of wine: Oral physiology, components and instrumental characterization. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 49-59.
- (68) Ployon, S., Morzel, M., Belloir, C., Bonnotte, A., Bourillot, E., Briand, L., Lesniewska, E., Lherminier, J., Aybeke, E., & Canon, F. (2018). Mechanisms of astringency: Structural alteration of the oral mucosal pellicle by dietary tannins and protective effect of bPRPs. *Food Chemistry*, 253, 79-87.
- (69) Liguori, L., Russo, P., Albanese, D. & Di Matteo, M. (2018). In *Handbook of Food Bioengineering, Food Processing for Increased Quality and Consumption*, Chapter 12: Production of low-alcohol beverages: Current status and perspectives, Academic Press, 347-382.
- (70) Palacios-García, A., Suárez- Martínez, C., & Heras-Manso, J. M. (28-02-2006). Manejo de la acidez del vino base cava desde el punto de vista organoléptico. *ACE: Revista de enología*. [http://www.acenologia.com/ciencia74\\_3.htm](http://www.acenologia.com/ciencia74_3.htm)
- (71) Liger-Belair, G. (2016). Modeling the Losses of Dissolved CO<sub>2</sub> from Laser-Etched Champagne Glasses. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120 (15), 3724-3734.
- (72) Vanrell Truyols, G. (2002). *Estudi de l'evolució del comportament escumant i de la fracció coloidal del cava durant la seva elaboració; efecte de diferents tractaments*. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.
- (73) Vanrell, G., Esteruelas, M., Canals, J. M., Zamora, F., Poinssaut, P., Sieczkowski, N., & Leboeuf, D. (31-05-2005). Influencia del tipo de clarificación del vino base y de los coadyuvantes de tiraje sobre la calidad de la espuma de los vinos efervescentes. *ACE: Revista de enología*. [http://www.acenologia.com/ciencia71\\_1.htm](http://www.acenologia.com/ciencia71_1.htm) el 10/12/2018.
- (74) Ribéreau-Gayón, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2003). *Tratado de enología: química del vino. Estabilización y tratamientos*. Volumen II. Buenos Aires: Mundi-Prensa.

- (75) Pérez-Jiménez, M., Chaya, C., & Pozo-Bayón, M. A. (2019). Individual differences and effect of phenolic compounds in the immediate and prolonged in –mouth aroma release and retronasal aroma intensity during wine tasting. *Food chemistry*, 285, 147-155.
- (76) German, J. B. (2000). The health benefits of wine. *Annual Review of nutrition*, 20, 561-593.
- (77) Bianchini, F., & Vainio, H. (2003). Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention?, *European Journal of Cancer Prevention*, 12(5): 417-425.
- (78) Guilford, J. M., & Pezzuto J. M. (2011). Wine and Health: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62, 471-486.
- (79) Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, 1-15.
- (80) Jamir, L., Kumar, V., Gat, Y., Kumar, A., & Kaur, S. (2019). Wine: a potential source of antimicrobial compounds. *Journal of Wine Research*, 30, 220-237.
- (81) Cheynier, V., Moutounet, M., & Sarni-Manchado, P. (2003). Los compuestos fenólicos. En C. Flanzy (Ed.), *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos* (pp. 114-132). Madrid: Mundi Prensa.
- (82) Ibern-Gómez, M., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S., Singleton, V. L., & de la Torre-Boronat, M. C. (2000). Browning of cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 29-36.
- (83) Pozo-Bayón, M. A., Hernández, M. T., Martín-Álvarez, P. J., & Polo, M. C. (2003). Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2089-2095.
- (84) Pozo-Bayón, M. A., Monagas, M., Polo, M. C., & Gómez-Cordovés, C. (2004). Occurrence of pyranoanthocyanins in sparkling wines manufactured with red grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1300-1306.
- (85) Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Ortega- Heras, M., & Pérez-Magariño, S. (2013). Sparkling wines produced from alternative varieties: sensory attributes and evolution of phenolics during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64:1, 39-49.

- (86) Stefenon, C. A., Bonesi, C. M., Marzarotto, V., Barnabé, D., Spinelli, F. R., Webber, V., & Vanderlinde, R. (2014). Phenolic composition and antioxidant activity in sparkling wines: modulation by the ageing on lees, *Food Chemistry*, 145, 292-299.
- (87) Jordão, A. M., Goncalves, F. J., Correia, A. C., Cantão, J., Rivero-Pérez, M. D., & González-SanJosé, M. L. (2010). Proanthocyanidin content, antioxidant capacity and scavenger activity of Portuguese sparkling wines (Bairrada Appellation of Origin). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2144-2152
- (88) Stefenon, C. A., Colombo, M., Bonesi, C. M., Marzarotto, V., Vanderlinde, R., Salvador, M., & Henriques, J. A. P. (2010). Antioxidant activity of sparkling wines produced by Champenoise and Charmat methods. *Food Chemistry*, 119, 12–18.
- (89) Torchio, F., Río-Segade, S., Gerbi, V., Gagnasso, E., & Rolle, L. (2011). Changes in chromatic characteristics and phenolic composition during winemaking and shelf-life of two types of red sweet sparkling wines, *Food Research International*, 44, 729-738.
- (90) Ivit, N. N., Loira, I., Morata, A., Benito, S., Palomero, F., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). Making natural sparkling wines with non-saccharomyces yeast. *European Food Research and Technology*, 244, 925- 935.
- (91) Chamkha, M., Cathala, B., Cheynier, V., & Douillard, R. (2003). Phenolic composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot Noir vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3179-3184.
- (92) Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67-87.
- (93) Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2014). Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: Synergistic effect and modulation by aromas. *Food Research International*, 62, 1100-1107.
- (94) Bavaresco, L., Morreale, G., & Flamini, R. (2015). Genetic and physiological bases of healthy attributes of grapes and wine. *Acta Horticulturae*, (1082), 263–274.
- (95) Gaudette, N. J., & Pickering, G. J. (2011). Sensory and chemical characteristics of *trans*-resveratrol-fortified wine. *Australian Journal of grape and wine research*, 17, 249-257.
- (96) Nguyen, C., Savouret, J-F., Widerak, M., Corvol, M-T., Rannou, F. (2017). Resveratrol, Potential Therapeutic Interest in Joint Disorders: A Critical Narrative Review. *Nutrients*, 9, 45.

- (97) Pastor, R. F., Restani, P., Di Lorenzo, C., Orgiu, F., Teissedre, P-L., Stockley, C., Ruf, J. C., Quini, C. I., García Tejedor, N., Gargantini, R., Aruani, C., Prieto, S., Murgo, M., Videla, R., Penissi, A., & Iermoli, R. H. (2017). Resveratrol, human health and winemaking perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-19.
- (98) Tsai, H. Y., Ho, C. T., & Chen, Y. K. (2017). Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene, *Journal of Food and Drug Analysis*, 25, 134-147.
- (99) Cooper, K. A., Chopra, M., & Thurnham, D. I. (2004). Wine polyphenols and promotion of cardiac health. *Nutrition Research Reviews*, 17, 111-129.
- (100) Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M. V., Velders, A. H., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2009). Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* cv. Petit Verdot red wine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 209-219.
- (101) Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. *Chemical Reviews*, 116 (9) 4937-4982.
- (102) Ferrer-Gallego, R., Brás, N., García-Estévez, I., Mateus, N., Rivas-Gonzalo, J. C., de Freitas, V., & Escribano-Bailón, M. T. (2016). Effect of flavonols on wine astringency and their interaction with human saliva. *Food Chemistry*, 209, 358-364.
- (103) Monagas, M., & Bartolomé, B. (2009). Anthocyanins and anthocyanin-derived compounds. En M.V. Moreno-Arribas, & M.C. Polo (Eds.), *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 439-462). New York: Springer.
- (104) He, F., He, J-J., Pan, Q-H., & Duan, C-Q. (2010). Mass-spectrometry evidence confirming the presence of pelargonidin-3-O-glucoside in the berry skins of Cabernet Sauvignon and Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of grape and wine Research*, 16, 464-468.
- (105) Smith, P. A., McRae, J. M., & Bindon, K. A. (2015). Impact of winemaking practices on the concentration and composition of tannins in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 601-614.
- (106) Basalekou, M., Kyrleou, M., Pappas, C., Tarantilis, P., Kotseridis, Y., & Kallithraka, S. (2019). Proanthocyanidin content as an astringency estimation tool and maturation index in red and white winemaking technology. *Food Chemistry*, 299, 125-135.

- (107) Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, Ch., Souquet, J-M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 3, 298-305.
- (108) Pérez-Magariño, S., & González-San José, M. L. (2004). Evolution of flavonols, anthocyanins and their derivatives during the ageing of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 5, 1181-1189.
- (109) Riu-Aumatell, M., Bosch-Fusté, J., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2006). Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. *Food Chemistry*, 95, 237-242.
- (110) Ganss, S., Kirsch, F., Winterhalter, P., Fischer, U., & Schmarr, H. G. (2011). Aroma changes due to second fermentation and glycosylated precursors in Chardonnay and Riesling sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2524-2533.
- (111) Hernández-Orte, P., Concejero, B., Astrain, J., Lacau, B., Cacho, J. & Ferreira, V. (2014). Influence of viticulture practices on grape aroma precursors and their relation with wine aroma, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 688–701.
- (112) Martínez-Pinilla, O., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Pérez-Magariño, S., & Ortega-Heras, M. (2013). Characterization of volatile compounds and olfactory profile of red minority varietal wines from La Rioja. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 93, 3720-3729.
- (113) Pons, A., Allamy, L., Schüttler, A., Rauhut, D., Thibon, C., & Darriet, P. (2017). What is the expected impact of climate change on wine aroma compounds and their precursors in grape?. *OENO One*, 51(2), 141-146.
- (114) Pozo-Bayón, M. (29-10-11). Descifrando las claves químicas que explican el aroma del vino. *ACE: Revista de enología*.  
[http://www.acenologa.com/cienciaytecnologia/claves\\_quimicas\\_aroma\\_cienc1010.htm](http://www.acenologa.com/cienciaytecnologia/claves_quimicas_aroma_cienc1010.htm)
- (115) Sánchez-Palomo, E., Gómez García-Carpintero, E., Gómez-Gallego, M. A., González-Viñas, M. A. (2012). The aroma of rojal red wines from La Mancha region—Determinations of key odorants. Salih B (ed). In: *Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications*. Intech, Croatia, pp 147–170.
- (116) Ferreira, V., Fernández, P., Pena, C., Escudero, A., & Cacho, J. F. (1995). Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 381-392.

- (117) Francis I. L. & Newton J. L. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Wine and Grape Research*, 11, 114-126.
- (118) Martínez-García, R., García-Martínez, T., Puig-Pujol, A., & Mauricio, J. C. (2017). Changes in sparkling wine aroma during the second fermentation under CO<sub>2</sub> pressure in sealed bottle. *Food Chemistry*, 237, 1030-1040.
- (119) Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Bueno-Herrera, M., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., & 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, 47-55.
- (120) Pozo-Bayón, M. A., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., Andujar-Ortiz, I., & Pueyo, E. (2010). Impact of using Trepát and Monastrell red grape varieties on the volatile and nitrogen composition during the manufacture of rosé Cava sparkling wines. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1526-1532.
- (121) Gallardo-Chacón, J., Vichi, S., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2009). Analysis of sparkling wine lees surface volatiles by optimized headspace solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3279-3285.
- (122) Welke, J. E., Zanus, M., Lazzarotto, M., Hepp-Pulgati, F., & Alcaraz-Zini, C. (2014). Main differences between volatiles of sparkling and base wines accessed through comprehensive two dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection and chemometric tools. *Food Chemistry*, 164, 427-437.
- (123) Hidalgo, P., Pueyo, E., Pozo-Bayon, M. A., Martinez-Rodriguez, A. J., Martin-Alvarez, P., Polo M. C. (2004). Sensory and analytical study of rose sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (21), 6640-6645.
- (124) Martínez-Pinilla, O., Guadalupe, Z., Hernández, Z., Ayestarán, B. (2013). Amino acids and biogenic amines in red varietal wines: the role of grape variety, malolactic fermentation and vintage. *European Food Research and Technology*, 237, 887-895.
- (125) Pereira, V., Pereira, A. C., Trujillo, J. P., Cacho, J., & Marques, J. C. (2015). Amino acids and biogenic amines evolution during the Estufagem of fortified wines. *Journal of Chemistry*, vol 2015, Article ID 494285, 9 pages.
- (126) Garde-Cerdán, T., & Ancín Azpilicueta, C. (2008). Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation, *LWT- Food Science and Technology*, 41 (3): 501-510.

- (127) Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Polo, M. C., & Martín-Álvarez, P. J. (1998). Changes in the amino acid composition of the different nitrogenous fractions during the aging of wine with yeasts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4042-4051.
- (128) Martínez-Rodríguez, A. J., Carrascosa, A. V., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, V., & Polo, M. C. (2002). Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29, 314-322.
- (129) Martínez-Lapuente, L., Apolinar-Valiente, R., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Pérez-Magariño, S., Williams, P., & Doco, T. (2018). Polysaccharides, oligosaccharides and nitrogenous compounds change during the ageing of Tempranillo and Verdejo sparkling wines. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 98, 291-303.
- (130) Torresi, S., Frangipane, M. T., Garzillo, A. M. V., Massantini, R., & Contini, M. (2014). Effects of a  $\beta$ -glucanase enzymatic preparation on yeast lysis during aging of traditional sparkling wines. *Food Research International*, 55, 83-92.
- (131) Culbert, J. A., McRae, J. M., Condé, B. C., Schmidtke, L. M., Nicholson, E. L., Smith, P. A., Howell, K. S., Boss, K. S., & Wilkinson, K. L. (2017). Influence of production method on the chemical composition, foaming properties, and quality of Australian carbonated and sparkling white wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65, 1378-1386.
- (132) Plotka-Wasyłka, J., Simeonov, V., Morrison, C., & Namieśnik, J. (2018). Impact of selected parameters of the fermentation process of wine and wine itself on the biogenic amines content: Evaluation by application of chemometric tools. *Microchemical Journal*, 142, 187-194.
- (133) Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*, Chapter 6A: Amino acids and biogenic amines. Springer.
- (134) Martuscelli, M., Arfelli, G., Manetta, A. C., & Suzzi, G. (2013). Biogenic amines content as a measure of the quality of wines of Abruzzo (Italy). *Food Chemistry*, 140, 590-597.
- (135) Hidalgo- Tогores, J. (2011). *Tratado de Enología*. Tomo I y II. (2ª ed.). Madrid: Mundi-Prensa.
- (136) OIV, vinos espumosos (18/73 & 6/79). <http://www.oiv.int/public/medias/3758/f-code-i-44es.pdf>
- (137) Daban, M. (31-05-2005). Los espumosos del mundo: factor variedad y fermentación. *ACE: Revista de enología*. <http://www.acenologia.com/dossier71.htm>

- (138) Ronald, S. J. (2008). *Wine Science: Principles and Applications*. Third edition, Elsevier, Inc., Londres, Inglaterra.
- (139) García-Gallego, J. (2008). *Maridaje, enología y cata de vinos*. (1ª ed.). Málaga: Innovación y Cualificación.
- (140) Kemp, B., Alexandre, H., Robillard, B., & Marchal, R. (2015). Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 19-38.
- (141) Martínez-Rodríguez, A. J., Carrascosa, A. V., Barcenilla, J. M., Pozo-Bayón, M. A., & Polo, M. C. (2001). Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. *Food Microbiology*, 18, 183-191.
- (142) Martínez-Rodríguez, A. J., & Polo, M. C. (2003). Effect of the addition of bentonite to the tirage solution on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chemistry*, 81, 383-388.
- (143) Sartor, S., Burin, V. M., Panceri, C. P., dos Passos, R. R., Caliari, V., Bordignon-Luiz, M. T. (2018). Rosé sparkling wines: Influence of winemaking practices on the phytochemical polyphenol during ageing on lees and comercial storage. *Journal of Food Science*, 83:11, 2790-2801.
- (144) López de Lerma, N., Peinado, R. A., Puig-Pujol, A., Mauricio J. C., Moreno, J., García-Martínez, T. (2018). Influence of two yeast strains in free, bioimmobilized or immobilized with alginate forms on the aromatic profile of long aged sparkling wines. *Food Chemistry*, 250, 22-29.
- (145) de Castro Martín, J. J. (1984). La elaboración de los vinos espumosos naturales. "Arxius de l'ESAB", 1984, núm. 6.
- (146) Serra-Cayuela, A., Aguilera-Curiel, M. A., Riu-Aumatell, M., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2013). Browning during biological aging and commercial storage of Cava sparkling wine and the use of 5-HMF as a quality marker. *Food Research International*, 53, 226-231.
- (147) Benucci, I. (2020). Impact of post-bottling storage conditions on colour and sensory profile of a rosé sparkling wine. *LWT- Food Science and Technology*, 118, 108732.
- (148) Zoecklein, B. W., Fugelsan, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (2001). *Análisis y producción de vino*. Editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza, España.
- (149) Puertas, B., Guerrero, R. F., Jurado, M. S., Jiménez, M. J., & Cantos-Villar, E. (2008). Evaluation of alternative winemaking processes for red wine color enhancement. *Food Science Technology International*, 14 (Suppl. 5), 021-027.

- (150) Kountoudakis, N., Canals, R., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (30.05.09). Maceración prefermentativa en frío. Aspectos tecnológicos en la elaboración de vinos de crianza. *ACE: Revista de enología*.
- (151) Casassa, F., & Sari, S. E. (2015). Sensory and chemical effects of two alternatives of prefermentative cold soak in Malbec wines during winemaking and bottle ageing. *International Journal of Food Science & Technology*, 50, 1044-1055.
- (152) Aleixandre-Tudo, J. L., & du Toit, W. (2018). Cold maceration application in red wine production and its effects on phenolic compounds: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 95, 200-208.
- (153) Álvarez, I., Aleixandre, J. L., García, M. J., & Lizama, V. (2006). Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta*, 563, 109-115.
- (154) Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., & González-Sanjosé, M. L. (2012). Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencía red wine. *LWT - Food Science and Technology*, 48, 1-8.
- (155) Aleixandre-Tudó, J. L., Álvarez, I., Lizama, V., Nieuwoudt, H., García, M. J., Aleixandre, J. L., & du Toit, W. J. (2016). Modelling phenolic and volatile composition to characterize the effects of pre-fermentative cold soaking in Tempranillo wines. *LWT- Food Chemistry and Technology*, 66, 193-200.
- (156) Parenti, A., Spugnoli, P., Calamai, I., Ferrari, S., & Gori, C. (2004). Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape, *European Food Research and Technology*, 218, 360- 366.
- (157) González-Neves, G., Favre, G., Gil, G., Ferrer, M., & Charamelo, D. (2014). Effect of cold pre-fermentative maceration on the color and composition of Young red wines cv. Tannat. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3449-3457.
- (158) Gil-Muñoz, R., Moreno-Pérez, A., Vila-López, R., Fernández-Fernández, J. I., Martínez-Cutillas, A., & Gómez-Plaza, E. (2009). Influence of low temperature prefermentative techniques on chromatic and phenolic characteristics of Syrah and Cabernet Sauvignon wines. *European Food Research and Technology*, 228, 777-788.
- (159) Gordillo, B., López-Infante, M. I., Ramírez-Pérez, P., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2010). Influence of Prefermentative Cold Maceration on the Color and Anthocyanic

Copigmentation of Organic Tempranillo Wines Elaborated in a Warm Climate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6797-6803.

(160) Wang, J., Huo, S., Zhang, Y., Liu, Y., & Fan, W. (2016). Effect of different pre-fermentation treatments on polyphenols, color, and volatile compounds of three wine varieties. *Food Science and Biotechnology*, 25(3), 735-743.

(161) González-Neves, G., Gil, G., Favre, G., & Ferrer, M. (2012). Influence of grape composition and winemaking on the anthocyanin composition of red wines of Tannat. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(5), 900-909.

(162) Smit, A. Y., du Toit, W. J., Stander, M. & du Toit, M. (2013). Evaluating the influence of maceration practices on biogenic amine formation in wine. *LWT- Food Science and Technology*, 53, 297-307.

(163) Moreno-Pérez, A., Vila-López, R., Fernández-Fernández, J. I., Martínez-Cutillas, A., & Gil-Muñoz, R. (2013). Influence of cold pre-fermentation treatments on the major volatile compounds of three wine varieties. *Food Chemistry*, 139, 770-776.

(164) Cai, J., Zhu, B. Q., Wang, Y. H., Lu, L., Lan, Y. B., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2014). Influence of pre-fermentation cold maceration treatment on aroma compounds of Cabernet Sauvignon wines fermented in different industrial scale fermenters. *Food Chemistry*, 154, 217-229.

(165) Jagatić-Korenika, A-M., Maslov, L., Jakobović, S., Palčić, I., & Jeromel, A. (2018). Comparative study of aromatic and polyphenolic profiles of Croatian white wines produced by cold maceration. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(Nº. 6), 459–469.

(166) Canals, R., Llaudy, M. C., & Canals, J. M. Zamora, F. (2008). Influence of the elimination and addition of seeds on the colour, phenolic composition and astringency of red wine. *European Food Research and Technology*, 226, 1183-1190.

(167) Baiano, A., Terracone, C., Gambacorta, G., & La Notte, E. (2009). Phenolic content and antioxidant activity of Primitivo wine: comparison among winemaking technologies. *Journal of food science*, 74. Nr. 3.

(168) Flanzy, C., Samson, A., & Escudier, J-L. (30.05.09). Los principios de la maceración carbónica. *ACE: Revista de enología*.

[http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/principios\\_maceracion\\_carbonica\\_cien0509.htm](http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/principios_maceracion_carbonica_cien0509.htm)

- (169) Tesniere, C., & Flanzy, C. (2011). Carbonic maceration wines: Characteristics and winemaking process. *Advances in Food and Nutrition Research*, 63, 1-15.
- (170) Pace, C., Giacosa, S., Torchio, F., Río Segade, S., Cagnasso, E., & Rolle, L. (2014). Extraction kinetics of anthocyanins from skin to pulp during carbonic maceration of winegrape berries with different ripeness levels. *Food Chemistry*, 165, 77–84.
- (171) Gómez-Míguez, M., & Heredia, F. J. (2004). Effect of the maceration technique on the relationships between anthocyanin composition and objective color of Syrah wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5117–5123.
- (172) Spranger, I. M., Clímaco, M. C., Baoshan, S., Eiriz, N., Fortunato, C., Nunes, A., Conceição Leandro, M., Avelar, M. L., & Belchior, A. P. (2004). Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 151–161.
- (173) Castillo- Sánchez, J. J., Mejuto, J. C., Garrido, J., & García- Falcón, S. (2006). Influence of wine-making protocol and fining agents on the evolution of the anthocyanin content, colour and general organoleptic quality of Vinhão wines. *Food Chemistry*, 97, 130-136.
- (174) Dourtoglou, V. G., Yannovits, N. G., Tychopoulos, V. G., & Vamvakias, M. M. (1994). Effect of storage under CO<sub>2</sub> atmosphere on the volatile, amino acid, and pigment constituents in red grape (*Vitis vinifera* L. Var. *Agiorgitiko*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 338-344.
- (175) Mulero, J., Zafrilla, P., Cayuela, J. M., Martínez-Cachá, A., & Pardo, F. (2011). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Organic Red Wine Using Different Winemaking Techniques. *Food Science*, 76, C436- C440.
- (176) Borazan, A. A., & Bozan, B. (2013). The influence of pectolytic enzyme addition and prefermentative mash heating during the winemaking process on the phenolic composition of Okuzgozu red wine. *Food Chemistry*, 138(1), 389–395.
- (177) Revilla, I., & González-SanJosé, M. L. (2002). Multivariate evaluation of changes induced in red wine characteristics by the use of extracting agents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, N°16, 4525-4530.
- (178) Romero-Cascales, I., Fernández-Fernández, J. I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2008). Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(7), 1295–1305.

- (179) Revilla, I., & González-SanJosé, M. L. (2003). Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 29-36.
- (180) Ducasse, M-A., Canal-Llauberes, R-M., de Lumley, M., Williams, P., Souquet, J-M., Fulcrand, H., Doco, T., & Cheynier, V. (2010). Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry*, 118(2), 369–376.
- (181) Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R., & Bautista-Ortín, A. B. (2011). The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5450–5455.
- (182) Martín-Álvarez, P. J., Marcobal, Á., Polo, C., & Moreno-Arribas, M. V. (2006) Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *European Food Research and Technology*, 222, 420–424.
- (183) Salgado, C. M., Fernández-Fernández, E., Palacio, L., Hernández, A., & Prádanos, P. (2015). Alcohol reduction in red and white wines by nanofiltration of musts before fermentation. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 285–295.
- (184) Longo, R., Blackman, J. W., Torley, P. J., Rogiers, S. Y., & Schmidtke, L. M. (2017). Changes in volatile composition and sensory attributes of wines during alcohol content reduction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 8-16.
- (185) Schelezki, O. J., Smith, P. A., Hranilovic, A., Bindon, K. A., & Jeffrey D. W. (2018). Comparison of consecutive harvests versus blending treatments to produce lower alcohol wines from Cabernet Sauvignon grapes: Impact on polysaccharide and tannin content and composition. *Food Chemistry*, 244, 50-59.
- (186) Pham, D-T., Stockdale, V. J., Wollan, D., Jeffery, D. W., Wilkinson, K. L. (2019). Compositional consequences of partial dealcoholization of red wine by reverse osmosis-evaporative perstraction. *Molecules*, 24, 1404.
- (187) Russo, P., Liguori, L., Corona, O., Albanese, D., Di Matteo, M. & Cinquanta, L. (2019). Combined membrane process for dealcoholization of wines: osmotic distillation and reverse osmosis. *Chemical engineering transactions*, 75, 7-12.
- (188) Corona, O., Liguori, L., Albanese, D., Di Matteo, M., Cinquanta, L. & Russo, P. (2019). Quality and volatile compounds in red wines at different degrees of dealcoholization by membrane process. *European Food Research and Technology*, 245, 2601-2611.

- (189) Resolución OIV-OENO 373B/2010. <http://www.oiv.int/public/medias/1254/oiv-oeno-373b-2010-es.pdf>
- (190) Moutounet, M., Bez, M., & Escudier, J-L. (30.08.07). Las tecnologías de elaboración de vinos con bajo nivel de etanol. *ACE: Revista de enología*. <http://www.acenologia.com/ciencia84.htm>
- (191) Pilipovik, M. V., & Riverol, C. (2005). Assessing dealcoholization system based on reverse osmosis. *Journal of Food Engineering*, 69, 437-441.
- (192) Labanda, J., Vichi, S., Llorens, J., & López-Tamames, E. (2009). Membrane separation technology for the reduction of alcoholic degree of a white model wine. *LWT- Food Science and Technology*, 42, 1390-1395.
- (193) Catarino, M. & Mendes, A. (2011). Dealcoholization wine by membrane separation processes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 330-337.
- (194) Meillon, S., Viala, D., Medel, M., Urbano, C., Guillot, G., & Schlich, P. (2010). Impact of partial alcohol reduction in Syrah wine on perceived complexity and temporality of sensations and link with preference. *Food Quality and Preference*, 21, 732-740.
- (195) Gil, M., Estévez, S., Kontoudakis, N., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2013). Influence of partial dealcoholization by reverse osmosis on red wine composition and sensory characteristics. *European Food Research and Technology*, 237, 481-488.
- (196) Longo, R., Blackman, J. W., Antalick, G., Torley, P. J., Rogiers, S. Y., & Schmidtke, L. M. (2018). A comparative study of partial dealcoholisation versus early harvest: Effects on wine volatile and sensory profiles. *Food Chemistry*, 261, 21-29.
- (197) Longo, R., Blackman, J. W., Antalick, G., Torley, P. J., Rogiers, S. Y., & Schmidtke, L. M. Volatile and sensory profiling of Shiraz wine in response to alcohol management: comparison of harvest timing versus technological approaches. (2018). *Food Research International*, 109, 561-571.
- (198) Salgado, C., Carmona, F. J., Palacio, L., Hernández, A., & Prádanos, P. (2016). Fouling study of nanofiltration membranes for sugar control in grape must: Analysis of resistances and the role of osmotic pressure. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 51 (3), 525-541.
- (199) Banvolgyi, S., Savaş-Bahçeci, K., Vatai, G., Bekassy, S., & Bekassy-Molnar, E. (2016). Partial dealcoholization of red wine by nanofiltration and its effect on anthocyanin and resveratrol levels. *Food Science and Technology International*, 22(8), 677-687.

- (200) García-Martín, N., Palacio, L., Prádanos, P., Hernández, A., Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., & González- Huerta, D. C. (2009). Evaluation of several ultra- and nanofiltration membranes for sugar control in winemaking. *Desalination*, 245, 554-558.
- (201) García-Martín, N., Pérez-Magariño, S., Ortega- Heras, M., González- Huerta, C., Minhea, M., González-Sanjosé, M. L., Palacio, L., Prádanos, P., & Hernández, A. (2010). Sugar reduction in musts with nanofiltration membranes to obtain low alcohol-content wines. *Separation and Purification Technology*, 76, 158-170.
- (202) García-Martín, N., Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., González- Huerta, C., Minhea, M., González-Sanjosé, M., Palacio, L., Prádanos, P., & Hernández, A. (2011). Sugar reduction in white and red musts with nanofiltration membranes. *Desalination and water treatments*, 27, 1-3.
- (203) Mihnea, M., González-SanJosé, M. L., Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., García-Martin, N., Palacio, L., Prádanos, P., & Hernández, A. (2012). Impact of Must Sugar Reduction by Membrane Applications on Volatile Composition of Verdejo Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(28), 7050–7063.
- (204) Salgado, C. M., Fernández-Fernández, E., Palacio, L., Hernández, A., & Prádanos, P. (2015). Alcohol reduction in red and White wines by nanofiltration of musts before fermentation, *Food and Bioproducts Processing*, 96, 285-295.
- (205) Salgado, C. M., Palacio, L., Prádanos, P., Hernández, A., González-Huerta, C., & Pérez-Magariño, S. (2015). Comparative study of red grape must nanofiltration: Laboratory and pilot plant scales, *Food and Bioproducts Processing*, 94, 610-620.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

---



### 3.1. VINIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS

Todos los vinos espumosos tintos naturales que se han estudiado en esta tesis se han realizado por el método tradicional o *champenoise*. Las elaboraciones se han llevado a cabo en la bodega experimental de la Estación Enológica del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), situada en el municipio vallisoletano de Rueda.

#### 3.1.1. Vinificaciones en las añadas 2012 y 2013

En las añadas 2012 y 2013 se elaboraron 6 vinos espumosos tintos siguiendo el método tradicional a partir de la variedad de uva tinta Tempranillo de la Denominación de Origen Cigales. Se eligió esta variedad de uva para las vinificaciones ya que se encuentra presente en casi todas las Denominaciones de Origen de España.

En el año 2012 y 2013 las uvas, de la variedad Tempranillo, fueron cosechadas en dos momentos de madurez: i) uvas pre-maduras (PM) con la acidez y el nivel de azúcares adecuado para la elaboración de los vinos base para la obtención de vinos espumosos tintos y; ii) uvas maduras (M), que han alcanzado la madurez de la pulpa (Tabla 2 y Tabla 3). Ambas vendimias se realizaron en buenas condiciones sanitarias. La vendimia se realizó a mano tras una cuidadosa selección en la propia viña. El transporte hasta la bodega se realizó en cajas de 15 kg de capacidad para evitar aplastamientos. Todas las vinificaciones se llevaron a cabo en depósitos de acero inoxidable de 150 L por duplicado.

**Tabla 2.** Parámetros enológicos de las uvas en el momento de la entrada en bodega (mosto) en la añada 2012

Muestra de mosto	°Brix	pH	AT <sup>a</sup>	Azúcares (g/L)	Alcohol probable % vol	Ácido málico (g/L)	Ácido tartárico (g/L)	Potasio (mg/L)
Uva pre-madura	19,7	3,25	6,31	187,9	10,76	3,30	4,73	1207
Uva madura	22,4	3,46	6,09	219,2	12,51	1,89	5,19	2000

<sup>a</sup>AT: acidez total en gramos de ácido tartárico/L

**Tabla 3.** Parámetros enológicos de las uvas en el momento de la entrada en bodega (mosto) en la añada 2013

Muestra	°Brix	pH	AT <sup>a</sup>	Azúcares (g/L)	Alcohol probable % vol	Ácido málico (g/L)	Ácido tartárico (g/L)	Potasio (mg/L)
<b>Uva pre-madura</b>	20,9	3,10	8,20	202	11,55	5,00	5,25	1670
<b>Uva madura</b>	22,2	3,40	7,80	2017	12,40	4,10	5,90	1480

<sup>a</sup> AT: acidez total en gramos de ácido tartárico/L

La Figura 21 representa el esquema de vinificación y toma de muestras que se realizó en las vendimias de 2012 y 2013. Los métodos de elaboración de los vinos base tintos realizados fueron:

Con uvas pre-maduras

- (i) vinificación tradicional en tinto o control (PM-C).
- (ii) maceración pre-fermentativa en frío con hielo seco (PM-DI).
- (iii) *délestage* con eliminación parcial de semillas (PM-D).

Con uvas maduras

- (iv) vinificación tradicional en tinto o control (M-C).
- (v) reducción de azúcares en mosto mediante nanofiltración (M-SR).
- (vi) desalcoholización parcial del vino mediante ósmosis inversa (M-AR).

Los vinos base control siguieron una vinificación tradicional en tinto. Las uvas introducidas en la bodega se estrujaron y despalillaron en una despalilladora-estrujadora modelo ECR-15 (grupo CMMC, Madrid, España). La uva estrujada y despalillada fue sulfitada (0,05 g/L). La pasta obtenida se llevó a depósitos de acero inoxidable de 150 L de capacidad. La fermentación alcohólica se realizó con siembra de levaduras comerciales *Saccharomyces cerevisiae* (FERM ES 488, Enartis, Italy) (0,2 g/L) a la temperatura controlada de  $25 \pm 2$  °C. Se realizaron dos remontados diarios, y una vez que finalizó la fermentación alcohólica (azúcares reductores < 2 g/L), las pastas se prensaron en una prensa manual vertical y los vinos fueron trasegados a depósitos de 100 L. Los vinos se inocularon con la bacteria láctica comercial *Oenococcus oeni* (Viniflora CH16, CHR Hansen, Dinamarca) (0,01 g/L) para llevar a cabo la fermentación maloláctica a una temperatura controlada de  $18 \pm 2$  °C. Se describen a continuación las particularidades de cada de vinificación.

La maceración pre-fermentativa en frío se llevó a cabo mediante la adición de pellets de hielo seco de 3 mm (Carbueros Metálicos S.A., Valladolid, España) a las uvas despalilladas y estrujadas. Se añadió hielo seco en la cantidad necesaria para disminuir la temperatura a  $5 \pm 2$  °C, y esta se mantuvo durante 3 días antes del comienzo de la fermentación alcohólica. Se añadió

más hielo seco según fue necesario para mantener la temperatura a  $5 \pm 2$  °C. Después se siguió el protocolo de vinificación tradicional en tinto.

El *délestage* se llevó a cabo después de dos días del comienzo de la fermentación alcohólica, realizando dos *délestages* diarios durante tres días con el fin de acelerar la extracción de compuestos fenólicos y la eliminación parcial de las semillas (entre un 40 % y un 60 % de las semillas fueron eliminadas). A partir de este momento se continuó con el protocolo de vinificación tradicional en tinto.

La reducción de azúcares en el mosto se realizó mediante un proceso de nanofiltración utilizando una membrana SR3 (Sistema de Membrana Koch, Países Bajos) seleccionada teniendo en cuenta los resultados obtenidos en trabajos previos (1, 2). El proceso de nanofiltración de los mostos fue realizado por el Grupo de superficies y Materiales porosos (SMAP, UA-UVA-CSIC) de la Universidad de Valladolid bajo la dirección del Dr. Antonio Hernández, según el proceso descrito en un trabajo previo (3). Para reducir el grado alcohólico final del vino, el mosto inicial se mezcló con el permeado obtenido en el proceso de la nanofiltración, en la proporción adecuada, buscando una reducción de dos grados probables. Después se continuó con la vinificación tradicional en tinto.

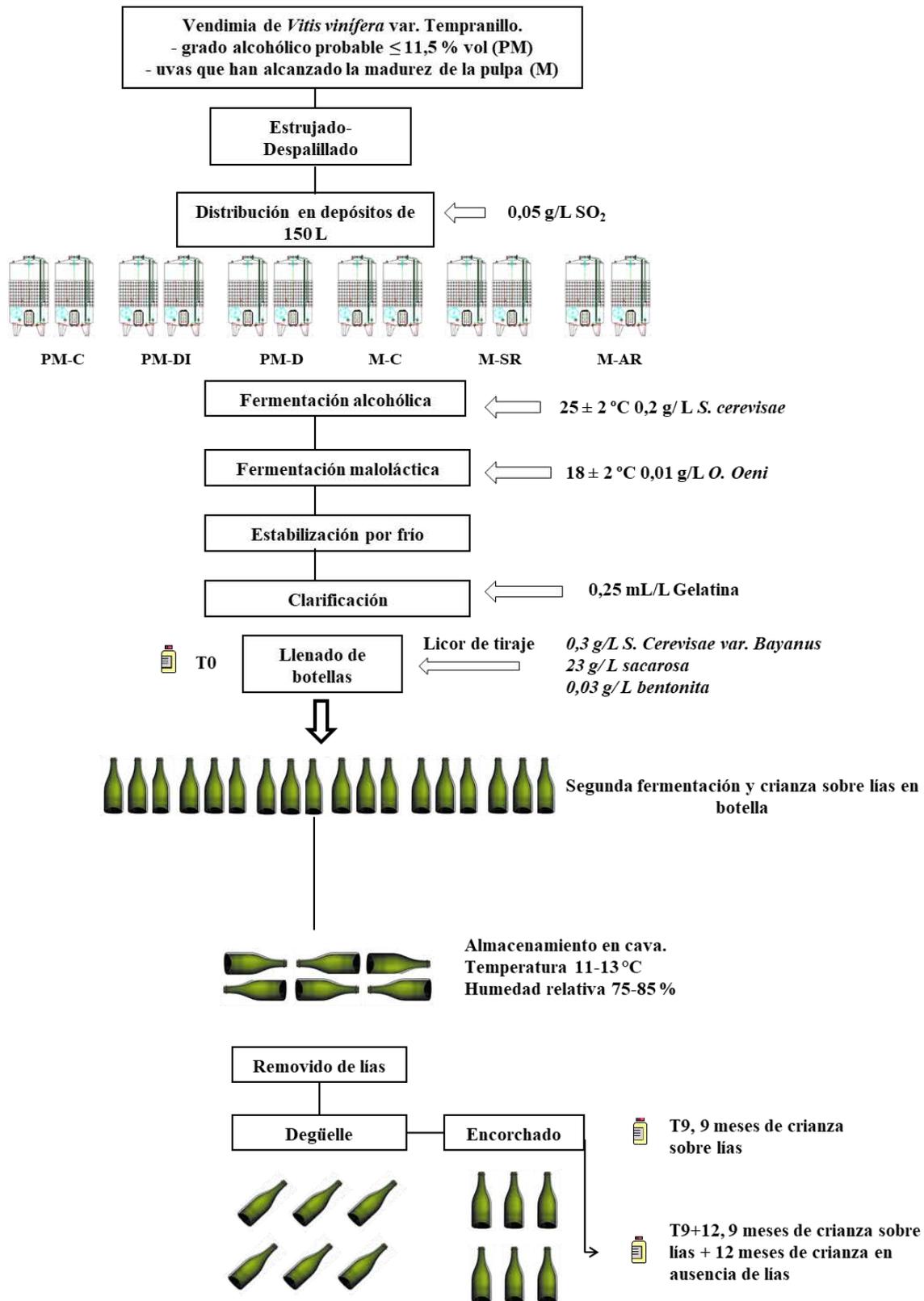
El proceso de desalcoholización parcial se llevó a cabo mediante ósmosis inversa utilizando el equipo Flavy MT (Bucher Vaslin, Francia). Los vinos base se obtuvieron siguiendo la misma vinificación descrita para los vinos control. Tras la fermentación maloláctica, una parte del vino fue sometida al proceso de ósmosis para reducir el contenido alcohólico. Una parte del vino parcialmente desalcoholizado se mezcló con el vino final en la proporción necesaria para reducir en dos grados el contenido alcohólico.

Después de la fermentación maloláctica, los vinos fueron estabilizados por frío (-5 °C) y clarificados con gelatina (0,25 mL/L Vinigel Seda, Agrovin, España). Los vinos espumosos tintos fueron elaborados siguiendo el método tradicional o *champenoise* donde los vinos llevan a cabo una segunda fermentación en botellas cerradas y deben permanecer en contacto con las lías al menos 9 meses, teniendo en cuenta el Reglamento CE N° 606/2009 para vinos espumosos con denominación de origen protegida.

Tras la estabilización por frío y la clarificación se adicionó el licor de tiraje a los vinos y fueron embotellados. El licor de tiraje estaba formado por levaduras comerciales *S. cerevisiae* var. *bayannus* (0,30 g/L, IOC 18-2007, Instituto Enológico de Champagne, Épernay, Francia), sacarosa (23 g/L) y bentonita activada con calcio (0,03 g/L, Laffort, Francia). Las botellas se almacenaron en una cava subterránea a una temperatura comprendida entre 11 y 13 °C y una humedad relativa del 75 al 85 %. La presión y los azúcares residuales se midieron cada 15 días para controlar la segunda fermentación. Tras 9 meses de envejecimiento en presencia de lías se

procedió al removido y degüelle (DLV 1 TDD Grilliat Machines, Maquinaria Moderna, Barcelona, España) y al encorchado definitivo. En todos los casos se elaboraron vinos espumosos *Brut Nature*, es decir, sin la adición de licor de expedición.

La toma de muestras se realizó una vez elaborado el vino base (T0), durante la crianza sobre lías en botella (a los 9 meses de crianza sobre lías, T9) y durante el envejecimiento en botella en ausencia de lías (9 meses de crianza sobre lías más 12 meses de crianza en ausencia de lías, T9+12). El análisis sensorial de los vinos espumosos se realizó en las muestras que habían pasado 9 meses de crianza sobre lías seguidos de 12 meses de crianza en ausencia de lías en botella.



**Figura 21.** Esquema de la vinificación y toma de muestras de las añadas de 2012 y 2013

PM: uvas pre-maduras, M: uvas maduras, C: control, DI: *dry ice*, D: *délestage*, SR: *sugar reduction*, AR: *alcohol reduction*

### 3.1.2. Vinificación en la añada 2014

En esta vendimia se elaboraron cuatro tipos de vinos tintos espumosos siguiendo el método tradicional a partir de la variedad de uva tinta Tempranillo de la Denominación de Origen Cigales. Las uvas fueron cosechadas en dos momentos de madurez, uvas pre-maduras (PM) con la acidez y el nivel de azúcares adecuado para la elaboración de los vinos base para la obtención de vinos tintos espumosos y uvas maduras (M), que han alcanzado la madurez de la pulpa (Tabla 4). Las uvas se encontraban en buenas condiciones sanitarias. La vendimia se realizó a mano tras una cuidadosa selección en la propia viña. El transporte hasta la bodega se realizó en cajas de 15 kg de capacidad para evitar aplastamientos. Todas las vinificaciones se llevaron a cabo en depósitos de acero inoxidable de 150 L por duplicado.

**Tabla 4.** Parámetros enológicos de las uvas en el momento de la entrada en bodega (mosto) en la añada 2014

Muestra	°Brix	pH	AT <sup>a</sup>	Azúcares (g/L)	Alcohol probable (% vol)	Ácido málico (g/L)	Ácido tartárico (g/L)	Potasio (g/L)
Uva pre-madura	20,0	3,1	6,9	192	11,00	3,40	4,7	1,95
Uva madura	21,9	3,3	6,2	214	12,20	3,00	3,8	1,70

<sup>a</sup> AT: acidez total en gramos de tartárico/L

La Figura 22 representa el esquema de vinificación y toma de muestras en la añada de 2014. Se elaboraron cuatro tipos de vinos diferentes en esta vendimia y todas las experiencias se llevaron a cabo por duplicado. Los métodos de elaboración de los vinos base tintos estudiados fueron:

Con uvas pre-maduras

- (i) vinificación tradicional en tinto o control (PM-T).
- (ii) maceración carbónica (PM-CM).
- (iii) vinificación tradicional en tinto con adición de enzimas pectolíticas (PM-E).

Con uvas maduras

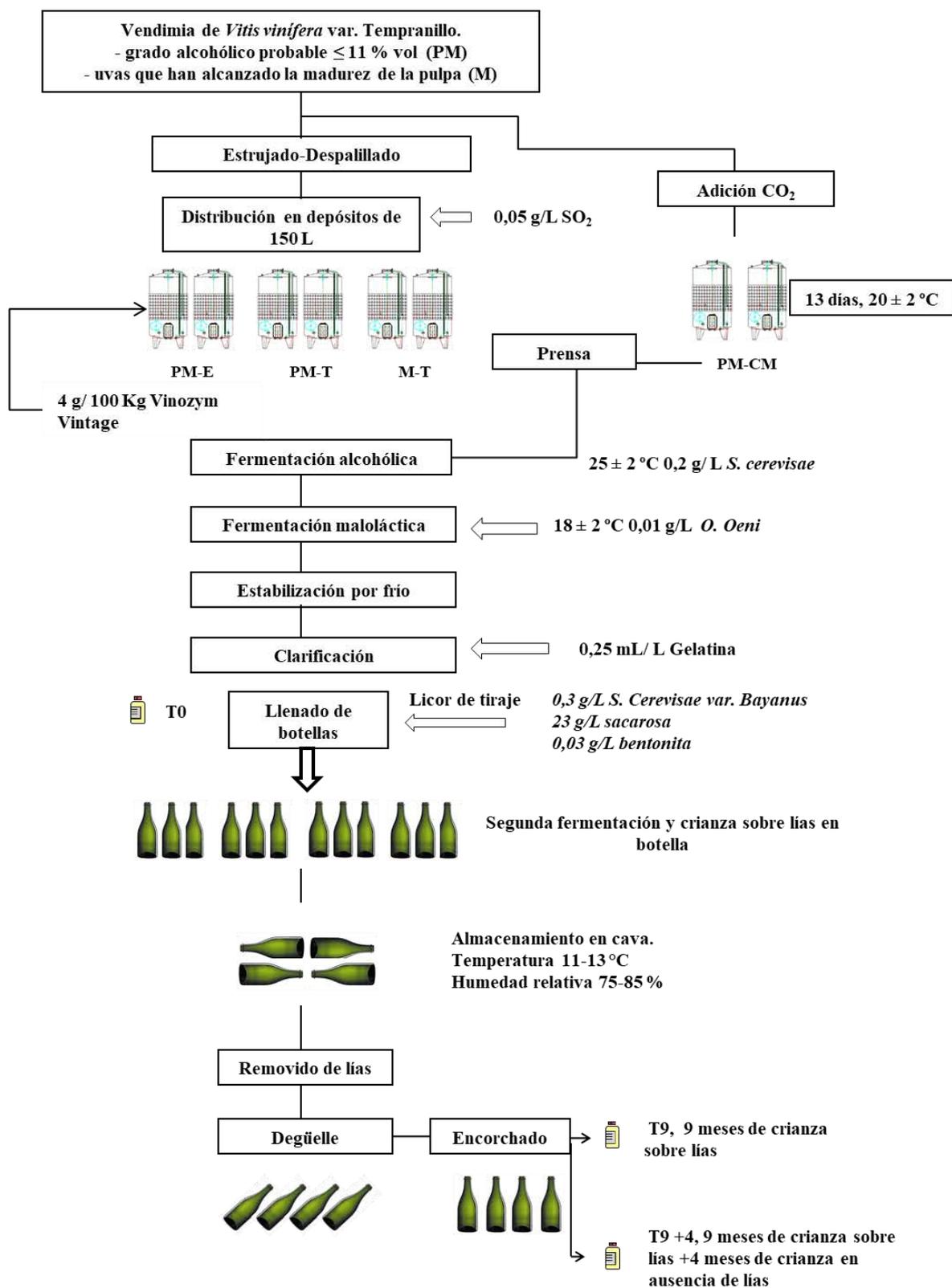
- (iv) vinificación tradicional en tinto o control (M-T).

Los vinos PM-T y M-T se emplearon como vinos control al igual que en las anteriores vendimias se hizo con los vinos PM-C y M-C. El protocolo de vinificación seguido para la elaboración de estos vinos base fue igual al descrito en las añadas 2012 y 2013 para los vinos base control. Las peculiaridades del resto de vinificaciones para la obtención de los vinos base se detallan a continuación.

Para la maceración carbónica se introdujeron los racimos enteros en depósitos de acero inoxidable y se mantuvieron durante 13 días a una temperatura controlada de  $20 \pm 2$  °C. Los depósitos se llenaron con CO<sub>2</sub> antes de añadir las uvas y durante el llenado, y se mantuvo esta atmósfera de CO<sub>2</sub> durante todo el proceso para conseguir desplazar al O<sub>2</sub> y que se diesen las condiciones óptimas para la maceración carbónica. Tras finalizar la maceración carbónica se eliminó el vino yema, se prensó la masa y el vino obtenido terminó la fermentación alcohólica y se continuó con el proceso de vinificación tradicional en tinto de los vinos control.

El vino elaborado mediante adición de enzimas pectolíticas siguió el mismo proceso de vinificación tradicional para tinto pero al inicio de la fermentación alcohólica se adicionaron enzimas pectolíticas (4 g/100 Kg de Vinozym vintage; Lamothe-Abiet, Buerdeos, Francia).

Para la elaboración de los vinos espumosos tintos se siguió también el protocolo descrito en las añadas 2012 y 2013 y los vinos se almacenaron en presencia de lías durante 9 meses en la cava a temperatura y humedad controlada. La toma de muestras para los análisis químicos se realizó una vez elaborado el vino base (T0) y a los 9 meses de crianza sobre lías en botella (T9). Para el análisis sensorial se analizaron los vinos tras 9 meses de crianza sobre lías en botella seguidos de 4 meses de crianza en ausencia de lías (T9+4).



**Figura 22.** Esquema de la vinificación y toma de muestras de la cosecha de 2014

PM: uvas pre-maduras, M: uvas maduras, T: tradicional, CM: *carbonic maceration*, E: enzyme

## **3.2. PARÁMETROS ENOLÓGICOS Y ANÁLISIS QUÍMICOS**

A continuación se describen los parámetros y compuestos analizados, de las muestras descritas en las Figuras 21 y 22, así como los métodos de análisis utilizados para su determinación.

### **3.2.1. Seguimiento de la maduración de las uvas**

Los análisis del seguimiento de la maduración de las uvas fueron realizados en el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Valladolid) por el grupo de Enología bajo la dirección de la Doctora Silvia Pérez Magariño y por la Estación Enológica de Rueda. Se realizó un seguimiento de la maduración de las uvas tintas desde el envero. Para ello, se tomaron muestras representativas de toda la parcela y sobre cada muestra se realizaron análisis de los parámetros enológicos (°Brix, pH, acidez total, azúcares reductores, ácido málico, ácido tartárico y potasio) siguiendo los métodos oficiales de la OIV (4).

### **3.2.2. Parámetros enológicos generales**

Los análisis de parámetros generales fueron realizados en el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Valladolid) por la Estación Enológica de Rueda. En todas las muestras de vino se realizaron análisis de grado alcohólico, pH, acidez total, acidez volátil, sulfuroso libre y sulfuroso total, azúcares reductores, ácido málico y ácido tartárico siguiendo los métodos oficiales de la OIV (4).

### **3.2.3. Parámetros de color**

El análisis de los parámetros del color se realizó en el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Valladolid) por el grupo de Enología bajo la dirección de la Doctora Silvia Pérez Magariño. Las medidas de intensidad de color y de tonalidad de los vinos tintos base y espumosos se evaluaron usando los parámetros de Glories (5). Estos análisis se llevaron a cabo utilizando el espectrofotómetro Shimadzu serie UV-1700 (Pharmaspec, China). Todas las medidas se realizaron por triplicado y se refirieron a cubetas de cuarzo de 10 mm de espesor.

### 3.2.4. Compuestos volátiles

El análisis de los compuestos volátiles se realizó en el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Valladolid) por el grupo de Enología bajo la dirección de la Doctora Silvia Pérez Magariño. Los compuestos volátiles mayoritarios se determinaron por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (FID) por inyección directa de 1  $\mu$ L de vino. Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 7890A con un detector (FID). Las muestras se inyectaron en modo split (25: 1) y los volátiles se separaron usando una columna capilar Agilent DW-WAX (30 m de longitud x 0,25 mm de diámetro x 0,25  $\mu$ m de espesor de la película). Las condiciones cromatográficas fueron: helio como gas portador a un caudal de 0,7 mL / min, programa de temperatura de la columna, 40 °C mantenidos por 4 min, calentados a 1 °C / min a 70 °C, y luego calentados a 30 °C / min a 200 °C (se mantuvo durante 10 min) y la temperatura de inyección fue de 250 °C. Cada compuesto se identificó y cuantificó mediante gráficos de calibración construidos con soluciones estándar puras, analizados en las mismas condiciones. Los compuestos volátiles minoritarios se determinaron mediante cromatografía gaseosa con detector de masas (GC-MS) previa extracción líquido-líquido de la fracción volátil. Los análisis se realizaron con un cromatógrafo de gases modelo HP-6890N (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) acoplado a un detector de masas inerte 5973 HP, siguiendo el método y las condiciones cromatográficas desarrolladas por Rodríguez-Bencomo y col. (6). Los iones de cuantificación y el patrón interno utilizado para cada compuesto estudiado están indicados en Pérez-Magariño y col. (7). Se identificaron y cuantificaron 32 compuestos volátiles que se agruparon en las siguientes familias de compuestos volátiles: ésteres de etilo, alcoholes, acetatos, ácidos, terpenos, lactonas y fenoles volátiles. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### 3.2.5. Compuestos fenólicos monómeros

La identificación y cuantificación de los antocianos, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles se realizó por cromatografía líquida de alta presión con detector de fila de diodos (HPLC-DAD). Las muestras de vino se filtraron por filtros de disco de PTFE de 0,45 micras de tamaño de poro y se inyectaron directamente un cromatógrafo líquido modular 1100 Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) controlado por el software Agilent Chemstation, equipado con una bomba cuaternaria G1311A, un desgasificador G1379A, un horno de columna G1316A, un inyector automático G1313A y un detector G1315B. La separación se llevó a cabo en una

columna ACE (5 C18-HL) (Teknokroma, Barcelona, Spain) de tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  (250 mm x 4,6 mm), según la metodología propuesta por Gómez-Alonso y col. (8). Este método permitió la identificación y cuantificación de 7 ácidos hidroxicinámicos, 7 flavonoles, 15 antocianos y 2 estilbenos. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

### 3.2.6. Proantocianidinas

Para el análisis de proantocianidinas las muestras de vino se fraccionaron previamente por cromatografía de permeación en gel a baja presión (GPC) en una columna Toyopearl HP-50F (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Alemania), como describe Guadalupe y col. (9). Una primera fracción (F1) se eluyó con una mezcla de etanol/agua/ácido trifluoroacético (55/45/0,05, v/v/v) y la segunda fracción (F2) se obtuvo con una mezcla acetona/agua (60/40, v/v). La fracción rica en taninos (F2) se hidrolizó en presencia de floroglucinol y se analizaron las rupturas de los aductos de floroglucinol por HPLC-DAD según las condiciones descritas en el método Kennedy y Jones (10). El equipo de cromatografía y la columna utilizados para la determinación fue el mismo que el usado para el análisis de los compuestos fenólicos monómeros. Este método permitió identificar y cuantificar los flavan-3-oles catequina, epicatequina, epicatequina-3-O-galato y epigallocatequina y sus respectivos aductos con floroglucinol, así como calcular el grado medio de polimerización (mDP) de las proantocianidinas. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

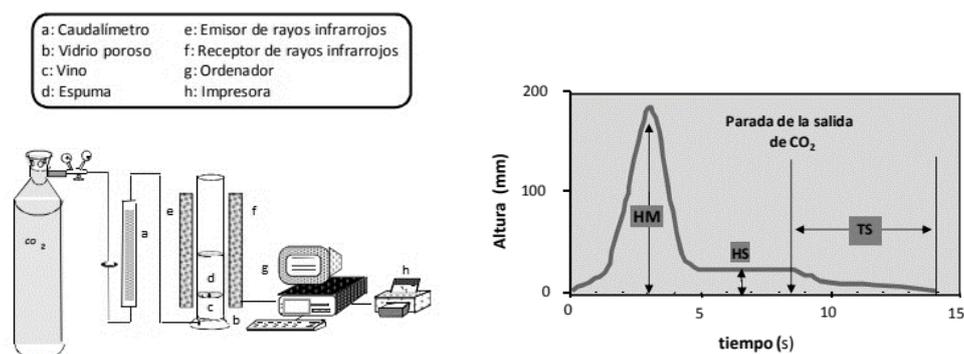
### 3.2.7. Aminoácidos y aminas biógenas

El contenido de aminoácidos y aminas biógenas se determinó simultáneamente mediante cromatografía de ultra alto rendimiento y detector de detector de fila de diodos (UHPLC-DAD) siguiendo una adaptación del método descrito por Gómez-Alonso y col. (11). Este método consiste en la separación mediante HPLC-DAD de las aminoenonas de los aminoácidos y de las aminas formadas por el etoximetilenmalonato de dietilo (DEEMM) como agente derivatizante. En esta tesis se empleó una adaptación del método para trabajar a presiones más altas, y reducir así el tiempo de los análisis. Se empleó un cromatógrafo UHPLC Shimadzu Nexera (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón), equipado con una bomba cuaternaria LC-30 AD, un desgasificador DGU-20ASR, un horno CTO-20AC y un detector de fila de diodos DAD modelo SPD-M20A. La separación se llevó a cabo en una columna Acquity UPLC HSS T3 (Waters, Massachusetts, Estados Unidos) de tamaño de partícula 1,8  $\mu\text{m}$  (100 x 2,1 mm). La identificación y cuantificación

se llevó a cabo mediante el método de patrón interno y las respectivas curvas de calibración para cada aminoácido y amina biógena. Dicha metodología permitió la identificación y cuantificación de 20 aminoácidos y 9 aminas biógenas. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### 3.2.8. Medida instrumental de la espuma

Los análisis de la medida instrumental de la espuma se realizaron en el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Valladolid) por el grupo de Enología bajo la dirección de la Doctora Silvia Pérez Magariño. La evaluación de las propiedades espumantes de los vinos se realizó con un equipo Mosalux (Station Oenotechnique de Champagne, Cormontreuil, Francia), según la metodología descrita por Maujean y col. (12). Este método se basa en inyectar gas carbónico en el vino previamente desgasificado para provocar la formación de espuma. El elemento principal del módulo de medida es una probeta graduada de 570 mm de altura y 40 mm de diámetro, donde en su parte inferior se sitúa un difusor de CO<sub>2</sub>. El procedimiento se basa en introducir en la probeta 100 ml de vino y hacer pasar un caudal de CO<sub>2</sub> de 7 litros/hora a una presión de 1 bar, formándose una espuma cuya altura puede ser medida por un conjunto de emisores y captadores de luz infrarroja colocados a ambos lados de la probeta, y conectados a un ordenador e impresora para recoger los resultados de la prueba en forma gráfica en función del tiempo (Figura 23).



**Figura 23.** Esquema del equipo Mosalux y curva típica de la evolución de la espuma. Adaptado de Vanrell Truyols (13)

Los parámetros medidos con el Mosalux fueron los siguientes:

- ✓ HM (*maximum height*) o espumabilidad. Es la altura máxima alcanzada por la espuma tras la inyección de CO<sub>2</sub>. Este parámetro se corresponde con la capacidad

del vino para formar espuma, lo que se asimila a la altura de la espuma obtenida tras verter el vino espumoso en la copa. Se mide en milímetros.

- ✓ HS (*stability height*) o persistencia de la espuma (HS). Es la altura a la que se estabiliza la espuma sin variar las condiciones de presión y flujo de CO<sub>2</sub>. Se corresponde con la persistencia de la corona y/o a la capacidad del vino para producir una espuma estable. Se mide en milímetros.
- ✓ TS (*stability time*) o tiempo de estabilidad de la espuma (TS). Es el tiempo que tarda en desaparecer completamente la espuma desde que se detiene la inyección de CO<sub>2</sub>. Representa el tiempo de vida de la corona de burbujas antes de desaparecer; se relaciona con el tiempo de estabilidad de la espuma cuando la efervescencia decrece. Se mide en segundos.

Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

### 3.3. ANÁLISIS SENSORIAL

La evaluación sensorial se llevó a cabo en la sala de catas del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, que cumple con la norma ISO 8589:2010.

El panel de cata estuvo compuesto por 12 catadores (7 hombres y 5 mujeres de 40 a 60 años), todos ellos técnicos y enólogos de diversas bodegas y Consejos Reguladores de diferentes D.O. de España, así como técnicos e investigadores del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Todos los vinos se evaluaron en la fase visual (color y calidad de la espuma), en la fase aromática (fracción volátil) y en la fase gustativa (equilibrio en boca). El análisis sensorial se realizó según la metodología descrita por González-San José y col. (14). Los términos descriptivos y sus definiciones se debatieron entre los catadores y, posteriormente, se compiló un vocabulario de consenso común. Los catadores seleccionaron dos atributos para evaluar el color, cinco atributos, previamente descritos en Gallart y col. (15), para la calidad de la espuma, seis para la fase aromática, y siete para la gustativa. Utilizando el vocabulario consenso, se empleó una escala de respuesta cuantitativa con 10 niveles de intensidad para las fases visual, olfativa y gustativa, donde 1 correspondía a la ausencia de percepción de la propiedad considerada, y 10 a la intensidad máxima de la misma. Los descriptores empleados para determinar la calidad sensorial de la espuma se evaluaron en una escala de 1 a 3. Además, los catadores puntuaron la valoración global de los vinos espumosos en una escala de 1 a 10, correspondiendo 1 a la mínima calificación del vino y 10 a la máxima, pudiendo realizar comentarios adicionales sobre las propiedades sensoriales de los vinos. La ficha de cata que recoge todos los atributos de las catas realizadas de los vinos tintos espumosos se presenta en la Figura 24.

Los vinos fueron evaluados por duplicado en dos sesiones diferentes. Se sirvieron de 50 a 60 mL de vino espumoso a una temperatura de entre 8 y 10 °C, en copas de vidrio estilo flauta de 100 mL sin ningún fallo ni marca. Cada botella de vino espumoso se abrió lentamente y sin agitar la botella. El vino se vertió lentamente en la copa para evitar la formación de burbujas de aire.

**FECHA DE LA CATA:**

**NOMBRE DEL CATADOR:**

**MUESTRA:**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>VISUAL</b>										
Intensidad de color										
Tonos Rojos (granate)										
<b>ESPUMA</b>	1	2	3							
Espuma inicial										
Superficie										
Corona										
Tamaño de burbuja										
Efervescencia										

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>OLFATIVO</b>										
Intensidad olfativa										
Verde										
Fermentativas										
Fruta										
Oxidado										
Reducido										

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>EN BOCA</b>										
Volumen en boca										
Acidez										
Amargor										
Astringencia										
Persistencia										
Frescura										
Equilibrio										

1 representa ausencia de percepción de la propiedad considerada y 10 la intensidad más alta de dicha propiedad.

Valoración global:

**Figura 24.** Ficha de cata empleada en el análisis sensorial de los vinos espumosos tintos

### 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos fueron sometidos, variable por variable, a un análisis de varianza (ANOVA o Kruscal-Wallis). Las diferencias se expresaron con un nivel de confianza mayor del 95%.

Se aplicó la técnica quimiométrica de Análisis de Componentes Principales (Principal Components Analysis, PCA) con el fin de establecer diferencias y similitudes entre los distintos vinos espumosos teniendo en cuenta la madurez de la uva empleada, los distintos momentos de elaboración y el tratamiento realizado, así como para establecer relaciones entre la composición química de los vinos y sus propiedades espumantes.

Los atributos sensoriales se analizaron mediante un Análisis de Procusters Generalizado (Generalized Procustes Analysis, GPA) que permitió también determinar si los catadores eran precisos (inter-variabilidad) y consistentes (intra-variabilidad). Se realizó además un test de permutación para comprobar que los resultados obtenidos eran significativos.

Los análisis estadísticos se realizaron con distintos paquetes informáticos, SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), XLSTAT Premium software (2018.3, Addinsoft, Nueva York, Estados Unidos) y Statgraphics Plus 5.0 (Manugistics Inc., Rockville, Estados Unidos). Para el análisis estadístico de los datos de cata se utilizó, además de los programas estadísticos comentados, el software específico de análisis sensorial Senstools Versión 3.3.2 (OP&P, Utrecht, Países Bajos).

### 3.5. REFERENCIAS

- (1) García-Martín, N., Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., González-Huerta, C., Mihnea, M., González-Sanjosé, M L., Palacio, L., Prádanos, P., & Hernández A. (2010). Sugar reduction in musts with nanofiltration membranes to obtain low alcohol-content wines. *Separation and Purification Technology*, 76, 158-170.
- (2) Salgado, C., Carmona, F.J., Palacio, L., Prádanos, P., & Hernández A. (2012). Evaluation of nanofiltration membranes for sugar reduction in red grape must. In *Proceedings of Euromembrane*. London, UK.
- (3) Salgado, C., Palacio, L., Prádanos, P., Hernández, A., González-Huerta, C., & Pérez-Magariño, S. (2015). Comparative study of red grape must nanofiltration: laboratory and pilot plant scales. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 610-620.
- (4) OIV. (1990). *Compendium of international methods of wine and must analysis*. Paris: International Organisation of Vine and Wine.
- (5) Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2<sup>ème</sup> partie. Mesure, origine et interprétation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18, 253-271.
- (6) Rodríguez-Bencomo, J. J., Ortega-Heras, M., & 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, 485-496.
- (7) Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2013). Multivariate analysis for the differentiation of sparkling wines elaborated from autochthonous Spanish grape varieties: volatile compounds, amino acids and biogenic amines. *European Food Research and Technology*, 236, 827–841.
- (8) Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618-626.
- (9) Guadalupe, Z., Soldevilla, A., Sáenz-Navajas, M. P., & Ayestarán, B. (2006). Analysis of polymeric phenolics in red wines using different techniques combined with gel permeation chromatography fractionation. *Journal of Chromatography A*, 1112, 112-120.

- (10) Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1740-1746.
- (11) Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., & García-Romero, E. (2007). Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 608-613.
- (12) Maujean, A., Poinssaut, P., Dantan, H., Brissonnet, F., & Cossiez, E. (1990). Etude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents. II. Mise au point d'une technique de mesure de la moussabilité de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bulletin de l'O.I.V.*, 63, 405-427.
- (13) Vanrell Truyols, G. (2002). *Estudi de l'evolució del comportament escumant i de la fracció coloidal del cava durant la seva elaboració; efecte de diferents tractaments*. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.
- (14) González-San José, M. L., Ortega-Heras, M., & Pérez-Magariño, S. (2008). Microoxygenation treatment and sensory properties of young red wines. *Food Science and Technology International*, 14, 123-130.
- (15) Gallart, M., Tomás, X., Suberbiola, G., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2004). Relationship between foam parameters obtained by gas-sparging method and sensory evaluation of sparkling wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 127-133.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



**4.1. Composición volátil, características de la espuma y propiedades sensoriales de vinos espumosos tintos de Tempranillo elaborados utilizando diferentes técnicas para obtener los vinos de base**

Volatile composition, foam characteristics and sensory properties of Tempranillo red sparkling wines elaborated using different techniques to obtain the base wines

Artículo publicado en:

*European Food Research and Technology*

2019 Vol. **245**: 1047-1059



## Resumen

El principal objetivo de este artículo fue estudiar la idoneidad de varias técnicas enológicas para obtener vinos base con las características adecuadas para la elaboración de vinos espumosos tintos de calidad por el método tradicional.

Se elaboraron diferentes vinos base a partir de la variedad Tempranillo, que fue vendimiada en dos estados diferentes de maduración, uvas pre-maduras (PM), que no habían alcanzado la madurez de la pulpa y uvas maduras (M), que habían alcanzado la madurez de la pulpa. Las técnicas enológicas estudiadas con uvas pre-maduras fueron: maceración pre-fermentativa en frío con hielo seco (PM-DI); *délestage* con eliminación parcial de semillas (PM-D) y vinificación tradicional en tinto (PM-C), que se empleó como vino control. Las técnicas enológicas estudiadas con uvas maduras fueron: reducción de azúcares en mosto mediante nanofiltración (M-SR); desalcoholización parcial del vino mediante ósmosis reversa (M-AR) y vinificación tradicional en tinto (M-C), que se empleó como vino control.

Los parámetros enológicos (pH, acidez total, grado alcohólico, acidez volátil, intensidad colorante y tonalidad) y la composición volátil se analizaron en el vino base (T0), en los vinos espumosos tintos tras 9 meses de crianza en presencia de lías (T9) y en los vinos espumosos tintos envejecidos nueve meses en presencia de lías seguidos de doce meses de envejecimiento en botella sin lías (T9+12). Los datos de la composición volátil del T9 no se incluyeron en el artículo porque las diferencias observadas entre las distintas elaboraciones fueron similares a las encontradas en los vinos espumosos tintos T9+12. La calidad de la espuma se estudió instrumentalmente a través de tres parámetros definidos por el método Mosalux (HM, HS y TS). Se realizó la medida instrumental de la espuma en los vinos espumosos tintos T9 y T9+12. Además, se realizó un análisis sensorial olfativo y de la espuma de los vinos espumosos T9+12. El análisis estadístico de los vinos se llevó a cabo mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA), para ver diferencias significativas entre los vinos en función de los tratamientos estudiados. Se realizó además un Análisis Factorial con todos los datos de los compuestos volátiles de los seis tipos de vinos estudiados en los tres momentos de envejecimiento para estudiar los factores que permitieran diferenciar a los vinos en función de la madurez de las uvas, el tratamiento aplicado o el momento de envejecimiento. Los datos del análisis sensorial se analizaron mediante un Análisis Procrusteano Generalizado (GPA) para evaluar si las percepciones olfativas y el análisis sensorial de la espuma permitían diferenciar los vinos espumosos finales.

Las técnicas empleadas para la reducción del grado alcohólico final de los vinos base consiguieron su objetivo, disminuyéndolo, en el caso de la nanofiltración un 1 % y en el de la ósmosis reversa un 2 %, con respecto al grado alcohólico del vino base control elaborado con uvas maduras.

Entre los vinos base control, los elaborados a partir de uvas maduras (M-C) mostraron una concentración total significativamente mayor de ésteres etílicos, ácidos, derivados de vainillina,  $\gamma$ -lactonas y fenoles volátiles. A su vez, los vinos base control elaborados a partir de uvas pre-maduras (PM-C) destacaron por su contenido significativamente mayor en acetatos de alcohol, alcoholes C6 y alcoholes superiores.

La maceración pre-fermentativa en frío con hielo seco y la desalcoholización parcial mediante ósmosis reversa fueron las técnicas que más influyeron en la composición volátil de los vinos base.

El vino base obtenido por maceración pre-fermentativa en frío con hielo seco (PM-DI) destacó por su contenido significativamente superior en acetatos de alcohol, compuestos relacionados con aromas frutales, con respecto al resto de vinos. Sin embargo, el contenido de alcoholes superiores del vino base PM-DI fue significativamente menor que el del vino base PM-C. Los alcoholes superiores se forman durante la fermentación y están relacionados con el metabolismo de los aminoácidos de las levaduras, lo que hace pensar que la maceración pre-fermentativa en frío podría no favorecer la extracción de aminoácidos, aunque la fracción de nitrógeno asimilable de las uvas también influye fuertemente en la formación de los aminoácidos. En general, la desalcoholización parcial del vino provocó una disminución significativa en el contenido de los compuestos volátiles, aunque los alcoholes superiores aumentaron con respecto al vino base control elaborado con uvas maduras.

El análisis factorial permitió diferenciar a los vinos en función del grado de madurez de las uvas empleadas en su elaboración, así como discriminar los vinos base de los espumosos y los distintos momentos de envejecimiento a partir de tres factores. El primer factor separó los vinos por el grado de madurez de las uvas empleadas en su elaboración, independientemente de la técnica enológica aplicada o el tiempo de envejecimiento. Los vinos elaborados con uva madura se caracterizaron por presentar un mayor contenido de derivados de vainillina, alcohol bencílico,  $\gamma$ -nonalactona y una concentración menor de alcoholes C6. El segundo y tercer factor separaron los vinos en función del tiempo de envejecimiento. El segundo factor permitió diferenciar los vinos base de los espumosos, independientemente de la técnica enológica aplicada y del grado de madurez de las uvas empleadas en su elaboración. Los vinos base tintos se caracterizaron por un mayor contenido de ésteres etílicos, ácido octanoico y ácido decanoico y los vinos espumosos tintos se caracterizaron por un mayor contenido de lactato de etilo, isovalerato de etilo,  $\alpha$ -terpineol y  $\gamma$ -butirolactona. El tercer factor permitió separar los vinos espumosos envejecidos con lías en botella (T9) de aquellos que además han seguido un envejecimiento en ausencia de lías en botella (T9+12). Los vinos T9+12 se localizaron en la zona negativa del tercer factor debido

a una disminución de algunos ácidos, los alcoholes C6, el 4-vinilfenol y el 2-feniletanol, cambios que se produjeron durante el envejecimiento en ausencia de lías en botella.

Las diferencias en la composición volátil de los vinos analizados fueron mayores debido al efecto de la madurez de las uvas empeladas en la elaboración que al efecto producido por las técnicas enológicas utilizadas.

En general, a pesar de los cambios observados en la composición volátil de los vinos durante el envejecimiento, las diferencias observadas en los vinos base control se mantuvieron en los vinos espumosos tintos. Los vinos espumosos tintos elaborados con uvas pre-maduras tuvieron un contenido significativamente mayor de acetatos de alcohol, alcoholes superiores y alcoholes C6 y un contenido significativamente menor de ésteres etílicos y derivados de la vainillina que los vinos espumosos tintos elaborados con uvas maduras. Los vinos espumosos PM-DI mostraron un contenido significativamente mayor de acetatos de alcohol y ésteres etílicos, y un contenido significativamente menor de alcoholes C6 y alcoholes superiores que los vinos espumosos PM-C. La maceración pre-fermentativa en frío permitió obtener vinos espumosos tintos con una composición volátil similar a la de los vinos espumosos obtenidos con uvas maduras. Los vinos espumosos tintos M-AR presentaron un contenido menor en acetatos de alcohol y lactonas y un contenido mayor en ésteres etílicos y alcoholes superiores que los vinos espumosos tintos control (M-C).

No se observó un efecto claro debido a las técnicas enológicas estudiadas en los parámetros instrumentales de la espuma. El parámetro instrumental HM aumentó durante el envejecimiento en ausencia de lías en todos los vinos tintos espumosos.

El GPA de la fase olfativa diferenció claramente los vinos espumosos tintos. Los vinos espumosos tintos elaborados con uvas pre-maduras mostraron una mayor correlación con las notas vegetales que los vinos espumosos tintos elaborados con uva madura, a excepción del vino espumoso M-SR, que también se correlacionó con las notas vegetales. El vino espumoso tinto M-AR se caracterizó por su alta intensidad olfativa y por los aromas frutales y fermentativos.

Con respecto al análisis sensorial de la espuma, los vinos espumosos se situaron de manera dispersa sin diferenciarse por el grado de madurez de las uvas empleadas. Los vinos espumosos PM-D y M-C se caracterizaron por una alta espuma inicial. Los vinos espumosos tintos PM-C y M-AR se correlacionaron con la efervescencia mientras que los vinos espumosos tintos PM-DI recibieron la mejor valoración sensorial de la espuma ya que correlacionaron con el área de la espuma, la corona y el tamaño de burbuja. Por el contrario, los vinos espumosos M-SR no se correlacionaron con ningún descriptor en concreto.

Desde el punto de vista de la composición volátil y el análisis sensorial de la espuma, los vinos elaborados con uvas maduras mostraron características más positivas que los elaborados con uvas pre-maduras. El tratamiento de maceración pre-fermentativa en frío produjo vinos espumosos tintos con una composición volátil similar a la de los vinos espumosos tintos elaborados por vinificación tradicional con uvas maduras.

**4.2. Efecto de diferentes técnicas enológicas en la elaboración de vinos base adecuados para la producción de vinos espumosos tintos: composición fenólica, propiedades sensoriales y parámetros de espuma**

Effects of different oenological techniques on the elaboration of adequate base wines for red sparkling production: phenolic composition, sensory properties and foam parameters

Artículo publicado en:

*Journal of the Science of Food and Agriculture*

2019 Vol. **99**: 4580-4592



## Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar cómo afectan a la composición fenólica, las propiedades sensoriales y los parámetros de la espuma distintas técnicas enológicas empleadas para elaborar vinos espumosos tintos de calidad.

Se elaboraron diferentes vinos base a partir de la variedad Tempranillo, que fue vendimiada en dos estados diferentes de maduración: uvas pre-maduras (PM), que no habían alcanzado la madurez de la pulpa, y uvas maduras (M), que habían alcanzado la madurez de la pulpa. Las técnicas enológicas estudiadas con uvas pre-maduras fueron: maceración pre-fermentativa en frío con hielo seco (PM-DI); *délestage* con eliminación parcial de semillas (PM-D) y vinificación tradicional en tinto (PM-C), que se empleó como vino control. Las técnicas enológicas estudiadas con uvas maduras fueron: reducción de azúcares en mosto mediante nanofiltración (M-SR); desalcoholización parcial del vino mediante ósmosis reversa (M-AR) y vinificación tradicional en tinto (M-C), que se empleó como vino control. El estudio se realizó con los vinos espumosos procedentes de las vendimias de 2012 y 2013. Los parámetros enológicos (pH, acidez total, grado alcohólico, acidez volátil, intensidad colorante, tonalidad y presión) y los compuestos fenólicos (antocianos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y proantocianidinas) se analizaron en los vinos base (T0), en los vinos espumosos tintos tras nueve meses de envejecimiento sobre lías en botella (T9) y en los vinos espumosos tintos tras nueve meses de envejecimiento sobre lías en botella seguidos de doce meses de crianza en botella sin lías (T9+12). En el artículo no se mostraron los datos del contenido de compuestos fenólicos en los vinos base porque las diferencias encontradas entre las distintas elaboraciones fueron muy similares a las de los vinos espumosos obtenidos. La calidad de la espuma se estudió instrumentalmente a través de tres parámetros definidos por el método Mosalux, HM, altura máxima de la espuma; HS, altura a la cual estabiliza la espuma; y TS, tiempo necesario para la desaparición completa de la espuma. La medida instrumental de la espuma y el análisis sensorial (fase visual, fase olfativa y fase gustativa) se realizó con los vinos espumosos tintos T9+12. Las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos se estudiaron mediante Análisis de la Varianza (ANOVA). Se llevaron a cabo Análisis de Componentes Principales (PCA) para caracterizar los vinos espumosos según sus propiedades gustativas y espumantes.

Los tratamientos empleados para la reducción del grado alcohólico (M-SR y M-AR) fueron efectivos en ambas vendimias, aunque en la vendimia de 2013 la diferencia de alcohol entre los vinos control de uvas pre-maduras y maduras fue menor. En la vendimia de 2012, los tratamientos aplicados sobre uvas maduras (M-AR y M-SR) incrementaron significativamente la intensidad colorante respecto al vino base control (M-C) mientras que el tratamiento de

*délestage* produjo una disminución significativa con respecto a su control (PM-C). En general, en los vinos procedentes de la añada de 2013 se encontraron menos diferencias significativas en los parámetros enológicos debido a que la diferencia de madurez entre uvas maduras y pre-maduras en esta vendimia fue menor. En la añada de 2012, se observó una disminución de la intensidad colorante durante la crianza de los vinos espumosos que puede deberse a la adsorción de algunos compuestos polifenólicos por el contacto con las lías.

Los vinos espumosos elaborados con uvas maduras mostraron un contenido significativamente mayor de antocianos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y proantocianidinas que los vinos espumosos tintos elaborados con uvas pre-maduras en ambas añadas.

El vino espumoso tinto elaborado a partir del vino base producido mediante maceración pre-fermentativa con hielo seco (PM-DI) mostró una concentración significativamente más alta de antocianos totales mientras que el tratamiento de *délestage* (PM-D) no incrementó el contenido de antocianos en ninguna de las añadas ni en los dos momentos de envejecimiento. En general, las técnicas aplicadas para la reducción del grado alcohólico (M-AR y M-SR) no afectaron de manera significativa a la concentración de los antocianos.

En general, ninguno de los tratamientos produjo diferencias estadísticamente significativas en el contenido del resto de compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y proantocianidinas) en las dos añadas estudiadas. Las diferencias encontradas en la composición química de los vinos estudiados se debieron al grado de madurez de las uvas empleadas en la elaboración, más que al efecto de las técnicas enológicas estudiadas.

Los vinos espumosos tintos sí mostraron diferencias significativas en el grado medio de polimerización de las proantocianidinas (mDP). El vino espumoso tinto elaborado a partir del vino base producido mediante *délestage* mostró un valor significativamente más alto de mDP en ambas añadas y en los dos momentos de envejecimiento estudiados, lo que se explicó por la eliminación parcial de las semillas que se llevó a cabo durante la aplicación de esta técnica enológica.

No se encontraron diferencias significativas en el análisis sensorial visual en los vinos espumosos tintos ni debido al grado de madurez de las uvas empleadas para su elaboración ni debido a los tratamientos enológicos aplicados en la elaboración de los vinos base.

El análisis de las propiedades sensoriales gustativas se realizó mediante un Análisis de Componentes Principales. Los vinos espumosos tintos se distribuyeron de acuerdo al grado de madurez de las uvas empleadas en su elaboración en ambas vendimias. En la vendimia de 2012, el vino espumoso tinto PM-D se caracterizó por sensaciones de astringencia, de acuerdo con los datos analíticos donde mostró el mayor mDP. Los vinos espumosos tintos elaborados con uvas

maduras se correlacionaron con sensaciones de frescura y amargor. Concretamente, los vinos tratados para la reducción del grado alcohólico (M-AR y M-SR) mostraron fuertes correlaciones con sensaciones de frescura, cuerpo, persistencia, equilibrio y percepción global. En la vendimia de 2013, el vino espumoso control elaborado con uvas pre-maduras (PM-C) y el vino espumoso tinto PM-D se correlacionaron con la astringencia, mientras que el vino espumoso tinto PM-DI se caracterizó por el descriptor de amargor. Entre los vinos espumosos tintos elaborados con uvas maduras, los vinos M-C y M-AR se caracterizaron por las sensaciones de cuerpo y persistencia; el vino espumoso tinto M-SR se caracterizó por las sensaciones de frescura, acidez, equilibrio y percepción global. En ambas vendimias los vinos espumosos tintos elaborados con uvas maduras obtuvieron las mejores puntuaciones en la fase gustativa.

Con respecto al análisis sensorial e instrumental de la espuma, en ambas vendimias los vinos espumosos tintos se distribuyeron por todo el espacio vectorial del PCA independientemente del grado de madurez de las uvas empleadas para su elaboración. Además, el vino espumoso tinto M-SR no se caracterizó por ningún descriptor en concreto. En la vendimia de 2012, el vino espumoso tinto PM-DI se caracterizó por el descriptor área de la espuma y los parámetros experimentales HM y HS (espumabilidad y estabilidad de la espuma), pudiendo relacionar el mayor contenido en antonianos de estos vinos con la espumabilidad. Los vinos espumosos tintos PM-C, PM-D, M-C y M-AR se correlacionaron positivamente con la espuma inicial y el parámetro instrumental de estabilidad de la espuma. Los vinos espumosos tintos M-AR y PM-DI de la vendimia de 2013 mostraron correlación con el área y la corona de la espuma, además de con los parámetros instrumentales espumabilidad y estabilidad de la espuma. Los vinos espumosos tintos PM-D y M-C se correlacionaron con la espuma inicial y el tamaño de burbuja, y al igual que en 2012, el vino espumoso tinto PM-C se correlacionó con la estabilidad de la espuma.

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento de la maceración pre-fermentativa en frío fue el único capaz de modificar la composición polifenólica incrementando la concentración de antonianos respecto al vino base control y el tratamiento de *délestage* con eliminación parcial de semillas afectó al valor de mDP, aumentándolo con respecto al vino base control. Los vinos espumosos tintos elaborados con uvas maduras mostraron una valoración más alta en la fase gustativa. Por último, cabe destacar que el análisis sensorial gustativo separó claramente los vinos espumosos tintos en función del grado de madurez de las uvas empleadas en su elaboración, mientras que el estudio sensorial e instrumental de la espuma no discriminó a los vinos espumosos tintos en función de la madurez de las uvas empleadas para su elaboración.



**4.3. Evaluación de la madurez de la uva, la maceración carbónica y la aplicación de enzimas pectolíticas para mejorar la calidad química y sensorial de los vinos espumosos tintos**

Evaluation of grape ripeness, carbonic maceration and pectolytic enzymes to improve the chemical and sensory quality of red sparkling wines

Artículo publicado en:

*Journal of the Science of Food and Agriculture*

2020 Vol.



## Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar cómo afectan a la composición fenólica, la composición volátil, las propiedades sensoriales y los parámetros de la espuma distintas técnicas enológicas empleadas en la elaboración de vinos base tintos para la producción de vinos tintos espumosos de calidad. En este estudio las uvas fueron vendimiadas en dos momentos de madurez diferentes: uvas pre-maduras (PM), que no habían alcanzado la madurez de la pulpa, con la acidez y el contenido de azúcares adecuados para la producción de vinos espumosos; y uvas maduras (M), que se vendimiaron cuando la pulpa había alcanzado la madurez.

Se elaboraron cuatro tipos de vino base tintos diferentes. Con uvas pre-maduras: i) vino base control elaborado siguiendo el protocolo de vinificación tradicional en tinto (PM-T); ii) vino base elaborado mediante maceración carbónica (PM-CM); iii) vino base elaborado siguiendo el protocolo de vinificación tradicional en tinto con adición de enzimas pectolíticas (PM-E). Con las uvas vendimiadas en su estado óptimo de maduración se elaboró un vino base control siguiendo el protocolo de vinificación tradicional en tinto (M-T). Los parámetros enológicos (pH, acidez total, grado alcohólico, acidez volátil, intensidad colorante, tonalidad y presión), los compuestos fenólicos (antocianos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y proantocianidinas) y los compuestos volátiles se analizaron en los vinos base (T0) y en los vinos espumosos tintos tras nueve meses de envejecimiento sobre lías en botella (T9). En el artículo no se muestran los datos del contenido de polifenoles y compuestos volátiles de los vinos base porque las diferencias encontradas entre las distintas elaboraciones fueron muy similares a las de los vinos espumosos tintos.

La calidad de la espuma se estudió instrumentalmente a través de tres parámetros definidos por el método Mosalux, HM, altura máxima de la espuma; HS, altura a la cual estabiliza la espuma; y TS, tiempo necesario para la desaparición completa de la espuma. La medida de los parámetros de la espuma (HM, HS y TS) y el análisis sensorial (fase visual, fase olfativa y fase gustativa) se realizó en los vinos (T9). Las diferencias significativas entre las distintas elaboraciones se estudiaron mediante Análisis de la Varianza (ANOVA). Se llevaron a cabo Análisis de Componentes Principales (PCA) para caracterizar los vinos espumosos según sus características sensoriales y espumantes.

Los vinos espumosos elaborados con uvas maduras y vinificación tradicional en tinto (M-T) mostraron un contenido significativamente mayor de antocianos, proantocianidinas y ácidos hidroxicinámicos que los vinos espumosos tintos control elaborados con uvas pre-maduras (PM-T). Con respecto a los compuestos volátiles, el vino espumoso M-T mostró un contenido significativamente mayor de esteres etílicos, alcohol acetatos y ácidos totales. En la evaluación

sensorial de la fase visual no se distinguieron los vinos espumosos tintos ni por efecto del grado de madurez de las uvas empleadas ni por las técnicas estudiadas. En el análisis sensorial, los vinos control elaborados con uvas maduras fueron los mejor valorados en la fase gustativa y de la espuma, y obtuvieron la puntuación más alta en intensidad olfativa y en la valoración global.

La maceración carbónica no aumento contenido polifenólico de los vinos espumosos tintos PM-CM, pero sí se incrementó el contenido de esteres etílicos y el cinamato de etilo. Sin embargo, el contenido de acetatos de alcohol, ácidos y alcoholes superiores fue menor que en los vinos espumosos tintos PM-C, probablemente por las condiciones restrictivas de oxígeno que se dan durante la fermentación intracelular. Sensorialmente estos vinos se caracterizaron por notas vegetales, y obtuvieron una buena valoración en los descriptores de la espuma pero gustativamente no destacaron en ningún atributo.

El tratamiento con enzimas pectolíticas no fue efectivo debido al estado de madurez de las uvas empleadas en la elaboración de los vinos espumosos PM-E. La adición de enzimas no incrementó el contenido de polifenoles de los vinos espumosos tintos PM-E con respecto al contenido de los vinos control PM-T. En relación a la composición volátil, no se pudo establecer un efecto claro debido al tratamiento enzimático. En la fase gustativa estos vinos destacaron por su frescura, equilibrio y acidez. En el análisis olfativo se caracterizaron por aromas frutales y alta intensidad olfativa y mostraron buenas características de la espuma.

En conclusión, los vinos espumosos tintos elaborados con uva madura fueron los mejor valorados en el análisis sensorial. Parece que la elaboración de vino base mediante vinificación tradicional en tinto y el empleo de uvas que han alcanzado la madurez de la pulpa es la mejor opción para elaborar vinos espumosos tintos de calidad.

#### **4.4. Efecto de distintas técnicas enológicas sobre el contenido de aminoácidos y de aminos biógenas en vinos espumosos tintos.**

Artículo publicado en:

La semana Vitivinícola

2019 Nº 3544, 806- 813



## Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diversas técnicas enológicas sobre el contenido de aminoácidos y aminas biógenas de los vinos base tintos y sus correspondientes vinos espumosos tintos elaborados mediante el método tradicional a partir de la variedad Tempranillo. Para este estudio, las uvas fueron vendimiadas en dos momentos de madurez diferentes: uvas pre-maduras, que no habían alcanzado la madurez de la pulpa, con la acidez y el contenido de azúcares adecuados para la producción de vinos espumosos; y uvas maduras, vendimiadas una vez que la pulpa había alcanzado la madurez. Se elaboraron cuatro tipos de vino base tintos diferentes. Con uvas pre-maduras: i) vino base control elaborado siguiendo el protocolo de vinificación tradicional en tinto (PM-C); ii) vino base elaborado mediante maceración carbónica (PM-CM); iii) vino base elaborado siguiendo el protocolo de vinificación tradicional en tinto con adición de enzimas pectolíticas (PM-E). Con las uvas vendimiadas en su estado óptimo de maduración se elaboró un vino base control siguiendo el protocolo de vinificación tradicional en tinto (M-C). Este estudio se realizó con vinos base (T0) y vinos espumosos tintos de la vendimia de 2014. Los vinos espumosos se analizaron tras 9 meses de crianza en presencia de lías en botella (T9).

El análisis estadístico de los vinos se llevó a cabo mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA) para ver diferencias significativas en el contenido de aminoácidos y aminas biógenas entre los vinos en función de los tratamientos estudiados.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido total de aminoácidos en los vinos base control elaborados con uvas pre-maduras y maduras. Los tratamientos estudiados sí que afectaron de forma significativa al contenido total de aminoácidos, tanto en los vinos base como en los vinos espumosos tintos. La maceración carbónica aumentó significativamente el contenido total de aminoácidos con respecto al vino base control elaborado con uvas pre-maduras, debido al metabolismo anaeróbico de la uva. Este incremento significativo se mantuvo durante el envejecimiento en presencia de lías. Contrariamente a lo esperado el tratamiento con enzimas pectolíticas produjo una disminución significativa en el contenido de aminoácidos con respecto al vino base control elaborado con uvas pre-maduras. La efectividad de las enzimas depende de numerosos factores, y al tratarse de uvas pre-maduras, no actuaron con la efectividad esperada.

El aminoácido mayoritario en todos los vinos, tanto base como espumosos, fue la prolina. Durante el envejecimiento en presencia de lías se observó una disminución generalizada del contenido total de aminoácidos, independientemente del tratamiento aplicado y el grado de

madurez de las uvas empleadas en la elaboración de los vinos, debido a reacciones de desaminación, descarboxilación y/o por la formación de compuestos aromáticos.

Con respecto a las aminas biógenas, en todos los vinos analizados su contenido fue inferior a 6 mg/L. La amina mayoritaria en todos los vinos fue la espermidina. Los tratamientos estudiados afectaron al contenido de aminas, siendo significativamente inferior el contenido de aminas biógenas en los vinos base elaborados con adición de enzimas pectolíticas que en los vinos control (PM-C). Los vinos base elaborados mediante maceración carbónica no mostraron diferencias significativas con su control (PM-C).

La crianza en presencia de lías produjo diversos efectos en el contenido de aminas biógenas según el método de elaboración empleado para los vinos base. Los vinos espumosos PM-CM y PM-C sufrieron un aumento en el contenido de aminas pero sin ser significativo. El contenido de aminas biógenas en los vinos espumosos PM-E aumentó de forma significativa, probablemente por la hidrólisis de proteínas y péptidos durante la crianza en presencia de lías. Los vinos control M-C experimentaron una disminución significativa en el contenido de aminas biógenas. Estos cambios hicieron que en los vinos espumosos tintos no se encontrasen diferencias estadísticamente significativas en el contenido de aminas biógenas.

## **5. CONCLUSIONES**

---



Las conclusiones de esta Tesis Doctoral pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Las diferencias en la composición química de los vinos analizados en esta tesis fueron mayores debido al grado de madurez de las uvas empleadas en la elaboración, que al efecto producido por las técnicas enológicas estudiadas.
2. Las técnicas empleadas para la reducción parcial del contenido alcohólico de los vinos base elaborados con uvas maduras, reducción de azúcares en mosto mediante nanofiltración y desalcoholización parcial del vino mediante ósmosis reversa, disminuyeron el grado alcohólico, produciendo vinos base tintos con un contenido alcohólico adecuado para la elaboración de vinos espumosos tintos de calidad.
3. En general las técnicas aplicadas para disminuir el contenido alcohólico no produjeron diferencias significativas en el contenido total de antocianos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y proantocianidinas. Por el contrario, sí que afectaron de manera significativa a la composición volátil de los vinos base y espumosos tintos, produciendo una disminución en algunas familias de compuestos volátiles.
4. En el análisis sensorial los vinos espumosos tintos elaborados por nanofiltración se correlacionaron con notas vegetales y los descriptores de equilibrio, acidez y frescura. La aplicación de la técnica de ósmosis reversa produjo vinos espumosos tintos similares a los obtenidos por vinificación tradicional con uvas maduras, obteniendo alta correlación con los descriptores de la espuma y las sensaciones de cuerpo y persistencia.
5. En uvas pre-maduras, la aplicación de la maceración pre-fermentativa en frío con hielo seco produjo un incremento significativo en el contenido de antocianos y una composición volátil similar a la de los vinos espumosos tintos elaborados con uvas maduras.
6. El tratamiento de *délestage* no tuvo efecto sobre el contenido total de ninguno de los compuestos fenólicos estudiados.
7. En el análisis sensorial tanto los vinos espumosos tintos obtenidos por maceración pre-fermentativa en frío con hielo seco como los vinos obtenidos por *délestage* mostraron una alta correlación con los descriptores de la espuma y se caracterizaron por notas vegetales. El vino espumoso tinto obtenido por maceración pre-fermentativa en frío se caracterizó por sensaciones de amargor mientras que los vinos espumosos tintos obtenidos por *délestage* se caracterizaron por sensaciones de astringencia.
8. La adición de las enzimas pectolíticas no fue efectiva debido al estado de madurez de las uvas. Los vinos espumosos tintos elaborados con adición de enzimas no incrementaron su contenido fenólico ni de aminoácidos, aunque mostraron el

contenido más alto de lactonas, produciendo vinos de alta intensidad olfativa y aromas frutales. En el análisis de la espuma destacaron por presentar el mayor valor de espumabilidad y las puntuaciones más altas en frescura, equilibrio y acidez.

9. Los vinos espumosos tintos elaborados mediante maceración carbónica mostraron el menor contenido en polifenoles totales, y altos contenidos en alcoholes C6, por lo que se caracterizaron por notas de aroma vegetal. La maceración carbónica produjo un aumento en la concentración de aminoácidos totales debido al metabolismo anaeróbico en la uva. En el análisis sensorial de la espuma mostraron una buena valoración caracterizándose por los descriptores de espuma inicial, área de la espuma y corona de la espuma.
10. Globalmente se puede concluir que los vinos tintos espumosos elaborados por vinificación tradicional en tinto con uvas maduras mostraron el mayor contenido en polifenoles, esteres etílicos, y compuestos ácidos volátiles. Sensorialmente obtuvieron una buena valoración, tanto en el análisis gustativo como de la espuma. Por lo tanto, la vinificación tradicional con uvas maduras parece ser la mejor opción para elaborar vinos tintos base para la producción de vinos espumosos tintos de calidad.
11. En el caso en que el grado alcohólico del vino base fuese muy elevado, la ósmosis reversa parece la mejor técnica de las estudiadas para elaborar vinos base tintos que produzcan vinos espumosos tintos de calidad. Aunque habría que tener en cuenta el elevado coste de la aplicación de esta técnica, así como, la posible depreciación de la composición volátil del vino espumoso tinto.